Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Effects of different levels of *Spearmint* (*Mentha spicata)* essential oil and methanolic extract on rumen fermentation parameters and methane production of dairy cattle *in vitro*

Ehsan Rezaei[1], Mostafa Malecky[2*], Daryoush Alipour[2]

[1] PhD student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran, Email: mmalecky@basu.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 03/07/2024
Revised: 04/22/2024
Accepted: 04/23/2024

Keywords:
Essential oil
Methane gas
Methanolic extract
Rumen fermentation
Spearmint (mentha spicata)

ABSTRACT

Background and Objectives: Given the escalating global population and its growing demand for animal protein resources, the significance of maximizing livestock production efficiency has doubled. Owing to the low efficiency of rumen fermentation, rumen manipulation has emerged as an effective strategy to improve feed efficiency and reduce nutrient wastage, thereby reducing environmental impact. In this context, the use of feed additives, particularly plant-derived secondary metabolites has attracted the attention of animal nutritionists as an effective strategy and sustainable solution in recent decades. Therefore, this study aimed to investigate *in vitro* the comparative effects of different levels of essential oil and extract of *spearmint* on gas volume production, rumen digestion parameters, and methane production.

Materials and Methods: The essential oil of *spearmint* (MSEO) was extracted by steam distillation method using a Clevenger apparatus, and its extract (MSEX) was obtained using 85% methanol followed by ultrasonic bath and centrifugation. In this study, the effects of *spearmint* essential oil and extract on rumen digestion and fermentation parameters of a high-concentrate diet for dairy cows were evaluated at six concentration levels: zero (as control), 150 (low dose), 300 and 450 (moderate doses), and 600 mg/L (high dose) and the treatment effects were analyzed statistically using a complete randomized design with combined analysis.

Results: The volume of gas produced after 24 h of incubation changed quadratically ($P<0.01$), and the percentage of methane production decreased linearly and non-linearly (linear and quadratic) with increasing dose of MSEO and MSEX, respectively ($P<0.01$), as the high dose of MSEO and MSEX resulted in an 8.2% and 12.7% reduction in the percentage of methane production, respectively, compared to the control ($P<0.01$). The true *in vitro* dry matter and organic matter digestibility of the substrate decreased linearly with increasing doses of both MSEO and MSEX ($P<0.01$). The microbial mass (MB) and efficiency of microbial biomass synthesis (EMBS) were affected only by MSEX, and increased non-linearly and

linearly, respectively, with increasing doses of MSEX (P< 0.01), with the highest MB and EMBS (16.7% and 25.3% increase, respectively, compared to the control) observed at 450 and 600 mg/L of MSEX, respectively (P<0.01). Ammonia concentration increased and decreased linearly with increasing dose of the essential oil and extract of *spearmint*, respectively (P<0.05), As at the high dose, MSEO increased ammonia by 46.5% while MSEX decreased ammonia by 13.6% compared to the control (P<0.05). Total volatile fatty acid concentration decreased linearly with both MSEO and MSEX dosages (P<0.01). The molar proportion of propionate increased non-linearly with both MSEO and MSEX dosages (P< 0.01), as the 150 mg/L level of MSEO and that of 600 mg/L of MSEX increased the proportion of propionate by 6.4% and 7.6% respectively compared to the control (P<0.01).

Conclusion: In conclusion, the results of this study showed that despite the negative effects of both MSEO and MSEX at high doses on rumen fermentation, the use of *spearmint* dry extract at low and moderate doses (equivalent to fairly 150 to 450 g/d for dairy cattle) could have promising effects in improving rumen fermentation. The reduction in methane and ammonia production and the improvement in microbial biomass and microbial biomass synthesis efficiency are indications of the beneficial effects of *spearmint* extract on rumen fermentation, which, in addition to improving production efficiency, may contribute to mitigating the environmental impact of ruminants, which requires further *in vivo* research under field conditions.

Cite this article: Rezaei, E., Malecky, M., Alipour, D. (2024). Effects of different levels of Spearmint (*Mentha spicata*) essential oil and methanolic extract on rumen fermentation parameters and methane production of dairy cattle *in vitro*. *Journal of Ruminant Research*, 12(4) 143-164.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2024.22255.1947
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی و عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای گاوهای شیری در شرایط آزمایشگاهی

احسان رضایی[۱]، مصطفی ملکی[۲*]، داریوش علی‌پور[۲]

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

[۲] دانشیار گروه علوم دامی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران، رایانامه: mmalecky@basu.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۷
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۲/۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۴

واژه‌های کلیدی:
تخمیر شکمبه
روغن اسانسی
عصاره متانولی
گاز متان
گیاه نعناع دشتی

چکیده

سابقه و هدف: نظر به افزایش روز افزون جمعیت و نیاز آن به منابع پروتئینی حیوانی، اهمیت افزایش بهره‌وری تولید دام‌ها دو چندان شده است. با توجه به کارایی پایین تخمیر شکمبه، دستکاری تخمیر شکمبه به‌عنوان یکی از راهکارهای مؤثر در جهت بهبود راندمان استفاده از خوراک و کاهش هدرروی مواد مغذی و جلوگیری از آلودگی محیط‌زیست مطرح‌شده است. در این راستا، استفاده از افزودنی‌های خوراکی، به خصوص متابولیت‌های ثانویه با منشأ گیاهی به‌عنوان راهکاری مؤثر و سازگار با دام‌پروری پایدار در دهه‌های اخیر موردتوجه محققین تغذیه دام قرارگرفته است. لذا، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات مقایسه‌ای سطوح مختلف روغن اسانسی و عصاره گیاه نعناع دشتی بر حجم گاز تولیدی، فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها: روغن اسانسی نعناع دشتی با استفاده از کلونجر به روش تقطیر با بخارآب و عصاره آن با استفاده از متانول ۸۵٪ و حمام اولتراسونیک و متعاقباً سانتریفیوژ استخراج گردید. در این تحقیق، اثرات روغن اسانسی و عصاره گیاه نعناع دشتی در ۶ سطح غلظتی، شامل سطوح صفر (به‌عنوان شاهد) و سطوح ۱۵۰ (دوز پایین)، ۳۰۰ و ۴۵۰ (دوزهای متوسط) و ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز بالا) بر فراسنجه‌های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای با یک جیره پر کنسانتره برای گاوهای شیری بررسی گردیده و اثرات تیمارها در قالب یک طرح کاملا تصادفی بصورت تجزیه مرکب مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته‌ها: به‌موازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع، حجم گاز تولیدشده بعد از ۲۴ ساعت به‌صورت درجه دوم تغییر کرد ($P< ۰/۰۱$) و درصد متان تولیدی به ترتیب به‌صورت خطی و غیرخطی(خطی و درجه دوم) کاهش یافت ($P<۰/۰۱$)، به‌طوری‌که استفاده از سطوح بالای اسانس و عصاره به ترتیب موجب کاهش ۸/۲ و ۱۲/۷ درصد متان تولیدی در مقایسه با شاهد گردید ($P<۰/۰۱$). میزان هضم حقیقی ماده خشک و مادهٔ آلی سوبسترا به ترتیب به‌موازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع به‌صورت خطی کاهش یافتند ($P<۰/۰۱$). توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی تنها تحت تأثیر عصاره نعناع قرارگرفته و با افزایش دوز عصاره به

ترتیب به‌صورت غیرخطی و خطی افزایش یافتند (P< ۰/۰۱)، بالاترین مقدار توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی به ترتیب با ۱۶/۷ و ۲۵/۳ درصد افزایش نسبت به شاهد به ترتیب در سطوح ٤٥٠ و ٦٠٠ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مشاهده گردید (P<۰/۰۱). غلظت آمونیاک شکمبه‌ای به‌موازات افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع به ترتیب به‌صورت خطی افزایش و کاهش یافت (P<۰/۰۵)، به‌طوری که سطح بالای اسانس موجب افزایش ٤٦/٥ درصدی و سطح بالای عصاره موجب کاهش ۱۳/٦ درصدی غلظت آمونیاک درمقایسه با شاهد شدند (P<۰/۰۵). غلظت کل اسیدهای چرب فرار تحت تأثیر هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱). درصد مولی پروپیونات با افزایش دوز اسانس و عصاره نعناع به‌صورت غیرخطی افزایش یافت (P<۰/۰۱)، به‌طوری سطح ۱۵۰ اسانس و سطح ٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره به ترتیب موجب افزایش ٦/٤ و ۷/٦ درصدی پروپیونات نسبت به شاهد گردیدند (P<۰/۰۱).

نتیجه‌گیری: درمجموع، نتایج این تحقیق نشان داد که با وجود اثرات منفی هر دو افزودنی اسانس و عصاره بر تخمیر شکمبه در دوز بالا، استفاده از عصاره خشک نعناع در دوزهای پایین و متوسط (معادل حدود ۱۵۰ تا ٤٥٠ گرم در روز برای گاوهای شیری) می‌تواند اثرات امید بخشی در بهبود تخمیر شکمبه داشته باشد. کاهش تولید گاز متان و آمونیاک و بهبود تولید و بازده سنتز توده میکروبی حاکی از اثرات مثبت عصاره نعناع بر تخمیر شکمبه می‌باشند که ضمن بهبود راندمان تولید می‌تواند موجب کاهش اثرات زیست‌محیطی نشخوارکنندگان گردد که این امر نیازمند تحقیق بیشتر در شرایط مزرعه‌ای و با استفاده از دام زنده می‌باشد.

استناد: رضایی، احسان؛ ملکی، مصطفی؛ علی‌پور، داریوش. (۱٤۰۳). اثرات سطوح مختلف روغن اسانسی و عصاره متانولی گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه ای گاوهای شیری در شرایط آزمایشگاهی. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۲(٤) ۱٦٤-۱٤۳.

DOI: 10.22069/ejrr.2024.22255.1947

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

افزایش روزافزون تقاضا برای فرآورده‌های دامی و محدودیت منابع در دسترس جهت تغذیه دام‌ها موجب ایجاد چالش‌های جدی در زمینه تأمین نیازهای غذایی دام‌ها شده که این موضوع لزوم افزایش بهره‌وری تولید دام‌ها جهت تأمین نیاز پروتئین جوامع انسانی را دو چندان کرده است. در این میان، نقش نشخوارکنندگان به دلیل داشتن یک جمعیت میکروبی همزیست در شکمبه و نگاری و امکان استفاده از ترکیبات لیگنوسلولزی غیرقابل استفاده برای سایر دام‌های مزرعه‌ای، بسیار پر رنگ‌تر از تک معده‌ای‌ها است (Schader و همکاران، ۲۰۱۵). با وجود نقش محوری اکوسیستم میکروبی شکمبه در هضم فیبر علوفه‌ها (Van Soest و همکاران،۱۹۹۱)، تخمیر میکروبی شکمبه اغلب منجر به هدر رفت بخشی از مواد مغذی جیره به صورت گاز متان و آمونیاک می‌گردد که این موضوع منجر به کاهش راندمان استفاده از خوراک و همچنین آلودگی محیط‌زیست می‌گردد (Hussain و همکاران، ۲۰۱۰؛ Hristov و همکاران، ۲۰۱۵؛Calabrò، ۲۰۱۵). از این رو، دستکاری تخمیر شکمبه به‌واسطه تغییر در جمعیت‌های میکروبی به‌عنوان یکی از راهکارهای مؤثر در جهت بهبود راندمان استفاده از خوراک و کاهش هدرروی مواد مغذی مطرح‌شده است (Adesogan،۲۰۰۹؛ Bodas و همکاران، ۲۰۱۲؛ Wencelová و همکاران، ۲۰۱۵؛ Sanjorjo و همکاران، ۲۰۲۳). در این راستا، استفاده از افزودنی‌های خوراکی، به خصوص متابولیت‌های ثانویه با منشأ گیاهی اثرات امیدبخشی در بهبود تخمیر شکمبه و کاهش هدر رفت مواد مغذی جیره داشته است (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kahvand و Malecky، ۲۰۱۸؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲؛ Orzuna-Orzuna و همکاران، ۲۰۲۲؛ Zhao و همکاران، ۲۰۲۳؛ Szulc و همکاران، ۲۰۲٤). نظر به مضرات استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره دام‌ها که منجر به مقاومت میکروبی در انسان می‌گردد و لذا ممنوعیت استفاده از آن‌ها در تغذیه دام و همچنین توجه روزافزون جامعه مصرف به فرآورده‌های ارگانیک، اهمیت استفاده از افزودنی‌های گیاهی در تغذیه دام را دوچندان نموده است (Kim و همکاران، ۲۰۱۹؛ Garcia-Galicia و همکاران، ۲۰۲۰؛ Dey و همکاران، ۲۰۲۱). اثرات مثبت متابولیت‌های ثانویه گیاهی (عمدتاً مشتمل بر اسانس‌ها و عصاره‌ها) در بهبود تخمیر شکمبه به اثرات ضدمیکروبی انتخابی آن‌ها در مقابل انواع میکروارگانیسم‌های شکمبه شامل باکتری‌ها، پروتوزوآها و قارچ‌ها مربوط می‌شود (Giordani و همکاران،۲۰۰٤؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱؛ Faniyi و همکاران، ۲۰۲۱). گیاه نعناع دشتی (*Mentha spicata*) یکی از گیاهان چندساله معطر متعلق به خانواده *Lamiaceae* می‌باشد که به صورت تجاری در سراسر جهان کشت می‌شود. مطالعات انجام شده روی عصاره‌های خام، اسانس یا ترکیبات خالص جداشده از این گیاه که عمدتاً شامل اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و لیگنان‌هاست اثرات بیولوژیک متعددی همچون اثرات ضد باکتریایی، ضد قارچی، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت، ضدالتهابی، فعالیت لاروکشی و ضد آندروژنی نشان داده است (Hussain و همکاران،۲۰۱۰؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸؛ Mahendran و همکاران، ۲۰۲۱). گیاه نعناع حاوی ۱/۲ تا ۱/۵ درصد بر اساس ماده خشک اسانس بوده که ترکیبات غالب آن عمدتاً شامل منتول (۵۹ درصد) ومنتون (۱۹ درصد) است (Sada و همکاران، ۲۰۰۳)، بااین‌وجود، ترکیبات غالب اسانس بسته به گونه موردنظر می‌تواند متفاوت باشد، به‌طوری‌که در گیاه نعناع دشتی ترکیبات غالب آن کارون (٤۰ تا ۵۲ درصد) ولیمونن (١٤ تا ۲۰ درصد) می‌باشند (Hussain و همکاران،۲۰۱۰؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bardaweel و همکاران،

۲۰۱۸). مطالعات پیشین انجام‌شده روی گیاه نعناع در تلیسه‌ها (به میزان ۲۰۰ گرم در روز) و روغن اسانسی آن در شرایط آزمایشگاهی (۲۵۰- ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) حاکی از اثرات مثبت آن بر تخمیر شکمبه به‌واسطه کاهش غلظت آمونیاک شکمبه و جمعیت پروتوزوآیی بدون تأثیر سوء بر هضم شکمبه‌ای خوراک بوده است (Ando و همکاران، ۲۰۰۳؛ Sada و همکاران، ۲۰۰۳؛ Taghavi-Nezhad و همکاران، ۲۰۱۳). در تحقیقی دیگر نشان داده شد که استفاده از گیاه نعناع به میزان ۵ درصد جیره در گاوهای هلشتاین بدون داشتن اثرات منفی بر تخمیر شکمبه و عملکرد دام، منجر به کاهش متان تولیدی گردید (Hosoda و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به ترکیب متفاوت ترکیبات مؤثره موجود در اسانس و عصاره گیاهان دارویی، استفاده از اسانس و عصاره یک گیاه به‌عنوان افزودنی جیره، اثرات متفاوتی بر تخمیر شکمبه می‌تواند داشته باشد. نظر به اثرت مثبت گیاه نعناع دشتی در معدود تحقیقات انجام شده بر بهبود تخمیر شکمبه وعدم وجود اطلاعات جامع در رابطه با اثرات اسانس و عصاره آن بر تخمیر شکمبه، آزمایش حاضر به منظور بررسی اثرات مقایسه‌ای سطوح مختلف اسانس و عصاره گیاه نعناع دشتی در جیره، بر حجم گاز تولیدی، فرا سنجه های هضم و تخمیر شکمبه و تولید گاز متان شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه های گیاهی نعناع دشتی و استخراج روغن اسانسی و عصاره متانولی: نمونه های گیاهی نعناع دشتی در اوایل مرحله گلدهی پس از تهیه از مرکز تحقیقات استان کرمانشاه باهم مخلوط گردیدند تا یک نمونه معرف به دست آید. سپس نمونه معرف تا رسیدن به یک وزن ثابت در سایه خشک گردید و برای استخراج اسانس و عصاره متانولی در کیسه های پلاستیکی دربسته نگهداری شد. روغن اسانسی نعناع دشتی[1] به روش تقطیر با بخارآب و با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج گردید. جهت استخراج عصاره متانولی نعناع دشتی[2]، نمونه معرف گیاهی ابتدا آسیاب شده، سپس توسط الک ۱ میلی متری غربال گردید. در مرحله بعد مقدار ۵ گرم نمونه الک شده در متانول ۸۵٪ به نسبت ۱: ۵ (وزنی/حجمی) حل و به مدت ۲۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار گرفت، سپس با سرعت 8000×g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و عصاره مواد گیاهی باقی مانده مجدداً با همان حجم استخراج گردید. مایع استخراج‌شده رویی دو مرحله استخراج جمع‌آوری و باهم ترکیب شده و سپس توسط روتاری تغلیظ گردید و تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Skendi و همکاران، ۲۰۱۷).

تیمارها و انکوباسیون‌ها: در تحقیق حاضر روغن اسانسی و عصاره گیاه نعناع دشتی در ٦ سطح غلظتی، شامل سطوح صفر (به عنوان شاهد) و سطوح ۱۵۰ (دوز پایین)، ۳۰۰ و ٤۵۰ (دوزهای متوسط) و ٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (دوز بالا) موردمطالعه قرار گرفتند. انکوباسیون نمونه‌ها به مدت ۲٤ ساعته در ۳ تکرار برای هر سطح تیماری انجام شد و تولید گاز ۲٤ ساعته، هضم سوبسترا، شاخص‌های تخمیر و تولید متان اندازه گیری شد. همه انکوباسیون‌ها در سه روز مختلف تکرار گردید.

آزمون تولید گاز: آزمون تولید گاز مطابق با روش Menke و Steingass (۱۹۸۸) انجام شد. در این آزمایش مایع شکمبه از ۱۰ رأس گاو کشتار شده در کشتارگاه جمع آوری گردیده و پس از مخلوط شدن و تهیه یک نمونه معرف، با استفاده از پارچه متقال چهار لایه صاف شد و داخل یک فلاسک عایق حرارتی به آزمایشگاه منتقل گردید و تحت جریان گاز دی اکسید کربن در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد تا

1. Mentha spicata essential oil (MSEO)
2. Mentha spicata extract (MSEX)

شروع آزمایش نگهداری شد. سوبسترای تخمیر در این آزمایش یک جیره غذایی برای گاوهای شیرده در اوایل شیردهی بود (جدول ۱).

جهت انکوباسیون نمونه‌ها، مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم از سوبسترای تخمیر به همراه ۳۹/۸ میلی‌لیتر مایع شکمبه بافری شده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی سطوح مختلف اسانس یا عصاره گیاه نعناع دشتی به مدت ۲٤ ساعت به‌صورت بی‌هوازی در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری در ۳ تکرار انکوبه گردید (Makkar و همکاران،۱۹۹۵). مایع شکمبه بافری شده با مخلوط نمودن مایع شکمبه و بافر (جدول ۲) به نسبت ۱: ۲ (حجمی–حجمی) تهیه شد. همچنین تعداد سه سرنگ حاوی مایع شکمبه بافری شده بدون سوبسترا به عنوان بلانک استفاده شد. با توجه به محدودیت حجم سرنگ ها، گاز تولیدی در زمان های ٦، ۱۲ و ۲٤ ساعت بعد از انکوباسیون اندازه گیری شده و پس از تخلیه، حجم گاز تجمعی محاسبه گردید. در پایان انکوباسیون، تمامی محتویات سرنگ‌ها به لوله‌های فالکون منتقل شده و بلافاصله در آب یخ خنک شد تا تخمیر متوقف شود.

سپس نمونه‌ها در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ٤٥ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و پس از فیلتراسیون با کاغذ صافی واتمن، نمونه های ٤ میلی‌لیتری از مایع شکمبه فیلتر شده با یک میلی لیتر اسید ارتوفسفریک ۲۵ درصد مخلوط شده و جهت تعیین محتوی اسیدهای چرب فرار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیائی سوبسترای تخمیر (بر اساس ماده خشک)

Table 1. The ingredients and chemical composition of fermentation substrate (DM basis)

درصد در جیره (%)	Ingredients اجزای خوراکی	
20.00	Alfalfa hay	علف یونجه
20.00	Corn Silage	سیلاژ ذرت
22.00	Barley grain	دانه جو
11.00	Corn grain	دانه ذرت
3.00	Wheat bran	سبوس گندم
8.00	Soybean Meal	کنجاله سویا
4.00	Canola meal	کنجاله کانولا
2.00	Corn gluten meal	گلوتن ذرت
7.60	Linseed	دانه کتان
0.70	Sodium bicarbonate	بی کربنات سدیم
0.46	Salt	نمک
0.74	Vitamin and mineral premix	مکمل ویتامینه و معدن [1]
0.50	Calcium Carbonate	کربنات کلسیم
	Chemical composition	ترکیب شیمیایی
16.50	Crude protein	پروتئین خام
33.00	NDF	الیاف نامحلول در شوینده خنثی
2.60	Metabolizable Energy (Mcal/Kg)	انرژی متابولیسمی (مگاکالری بر کیلوگرم)

[1] حاوی ویتامین A (۱۳۰۰ کیلو واحد بین المللی بر کیلوگرم)، ویتامینD (۲٦۰ کیلو واحد بین المللی بر کیلوگرم)، ویتامینE (۱۰۰۰۰ واحد بین المللی بر کیلوگرم)، کلسیم(۱۵۰گرم بر کیلوگرم)، منیزیوم (۳۰گرم بر کیلوگرم)، منگنز (۱۵۰۰۰میلی گرم بر کیلوگرم)، کبالت (۳٤میلی گرم. بر کیلوگرم)، مس(۳۷۰۰میلی‌گرم. بر کیلوگرم)، ید (۱۸۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، روی (۱۵۰۰۰ میلی‌گرم. بر کیلوگرم)، سلنیوم (۱۰۰ میلی‌گرم. بر کیلوگرم)، آهن (۱۰۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم).

1- Contains 1300 KIU of Vitamin A; 260 KIU of Vitamin D3 and 10000 IU of Vitamin E and 150 g Ca, 30 g Mg, 1500mg Mn, 34 mg Co,3700 mg Cu, 180 mg I, 15000 mg Zn, 100 mg Se and 1000 mg Fe per Kg.

جدول ۲- ترکیب بافر استفاده شده برای محیط کشت

Table 2. The composition of the buffer used for inoculum

(میلی‌لیتر در لیتر) ml.L	اجزای بافر Ingredients	
237	Macro-minerals solution	محلول معدنی ماکرو[1]
0.12	Micro-minerals solution	محلول معدنی میکرو[2]
237	Bicarbonate buffer solution	محلول بافر بی‌کربنات[3]
1.22	Resazurin solution	محلول رزازورین[4]
50	Reducing solution	محلول احیاکننده[5]
474.7	Distilled water	آب مقطر

۱-حاوی۵/۷ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ٦/۲ گرم دی پتاسیم هیدروژن فسفات، ۰/٦گرم سولفات منیزیم در لیتر

1.Contains 5.7 g Na_2HPO_4, 6.2 g KH_2PO_4, 0.6 g $MgSO_47H_2O$ per liter.

۲-حاوی ۱۳/۲گرم کلرید مس، ۱۰ گرم کلرید منگنز ،۱ گرم کلرید کبالت، ۸ گرم کلرید آهن در۱ لیتر

2.Contains 13.2 g $CuCl_22H_2O$, 10.0 g $MnCl_24H_2O$, 1.0 g $CoCl_26H_2O$, 8.0 g $FeCl_26H_2O$ and made up to 100 ml per liter.

۳-حاوی ۳۵ گرم بی کربنات سدیم و٤ گرم کربنات آمونیوم در ۱ لیتر

3.Contains 35 g $NaHCO_3$ and 4 g NH_4HCO_3 added up to 1,000 ml per liter.

٤-حاوی۵،۰ گرم رزازورین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر

4.Contains 0.5 g resazurin in 100 ml distilled water.

۵-حاوی۹۵ میلی لیترآب مقطر، ٤ میلی لیتر سود ۱ نرمال و ٦۲۵ میلی‌گرم دی سدیم سولفید

5.Contains 95 ml H_2O, 4 ml 1 N-NaOH and 625 mg Na_2S9H_2O

همچنین نمونه‌هایی با حجم ٤ میلی‌لیتر از مایع شکمبه فیلتر شده با حجم مساوی اسیدکلریدریک ۰/۲ نرمال تثبیت و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد برای آنالیز محتوی آمونیاک شکمبه‌ای ذخیره شد. باقیمانده هضم نشده سوبسترا در لوله‌ها به مدت ٤۸ ساعت در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک‌شده و وزن آن‌ها تعیین گردید. سپس بقایای خشک شده به مدت ۱ ساعت در محلول شویندهٔ خنثی جوشانده شده و با استفاده از پارچه پلی استر (با قطر منافذ ٤۰ میکرومتر) صاف و دوباره به مدت ٤۸ ساعت در دمای ٦۰ درجهٔ سانتی‌گراد خشک‌شده و میزان هضم آزمایشگاهی ماده خشک[1] سوبسترا تعیین گردید. میزان هضم آزمایشگاهی ماده آلی[2] نیز پس از اندازه‌گیری محتوی خاکستر بقایای خشک حاصله از مرحلهٔ قبل برآورد گردید. در این آزمایش، نسبت ماده آلی هضم شدهٔ حقیقی (میلی‌گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی‌لیتر) بعد از ۲٤ ساعت انکوباسیون به‌عنوان فاکتور تفکیک (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷a) و اختلاف وزنی (بر اساس ماده خشک) بین بقایای هضم نشده سوبسترا در انتهای انکوباسیون و مقدار باقیمانده بعد از شستشو در محلول شویندهٔ خنثی به‌عنوان زیست‌تودهٔ میکروبی در نظر گرفته شد (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷b). همچنین نسبت توده میکروبی[3] (میلی‌گرم) تولیدشده بر ماده آلی هضم شده (میلی‌گرم) به عنوان راندمان سنتز توده میکروبی[4] در نظر گرفته شد.

اندازه‌گیری گاز متان: به‌منظور تعیین غلظت متان در حجم گاز تولیدی در سرنگ‌ها، گاز تولیدی در طی ۲٤ ساعت انکوباسیون در بطری‌های در بسته ضد گاز جمع آوری گردید و در نهایت نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری از گاز معرف ۲٤ ساعت به دستگاه کروماتوگراف گازی تزریق گردید. برای این منظور از دستگاه کروماتوگراف‌گازی[5] مجهز به آشکارساز هدایت

1- *In vitro* true dry matter degradability (IVTDMD)

2-*In vitro* true organic matter degradability (IVTOMD)

3. Microbial Biomass

4. Efficiency of Microbial Biomass Synthesis

5 -GC-TCD, USA, HP 5890 Series, Agilent Technologies

حرارتی[1] و ستون پرشده استیل[2] استفاده شد. هلیم به‌عنوان گاز حامل با نرخ دبی ثابت ۲۰ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. همچنین دمای ستون در ٦۰ درجه سانتی‌گراد و دمای آشکارساز در ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. جهت شناسایی و تعیین غلظت گاز متان و دی‌اکسید کربن ازگازهای خالص مربوطه به‌عنوان استاندارد استفاده گردید.

آنالیزهای شیمیایی: تمامی آزمایشات مربوط به آنالیز شیمیایی خوراک در آزمایشگاه تغذیه دام وابسته به دانشگاه بوعلی سینا همدان انجام گردید. محتوی ماده خشک و ماده آلی نمونه‌ها مطابق با روش‌های انجمن رسمی شیمی‌دانان کشاورزی[3] اندازه‌گیری شد (AOAC، ۲۰۰۰). غلظت آمونیاک شکمبه‌ای با استفاده از روش فنل هیپوکلریت و به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر تعیین گردید (Broderick و Kang، ۱۹۸۰). غلظت اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از یک دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به یک آشکارساز یونش شعله‌ای[4] و یک ستون مویین[5] (۵۰ متر× ۰/۵۳ میلی‌متر، ضخامت فیلم = ۲ میکرومتر) اندازه‌گیری شد (Ottenstein و Bartley، ۱۹۷۱). از هیدروژن به‌عنوان گاز حامل با نرخ دبی ثابت ۳۰ میلی لیتر در دقیقه استفاده شد. دمای ستون در ابتدا در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه نگهداری شد، سپس با نرخ ۳۰ درجه در دقیقه تا دمای ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این دما به مدت ۵ دقیقه باقی ماند. دمای انژکتور (تزریق کننده) و آشکارساز به ترتیب در دمای ۲۲۰ و ۲٤۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید.

آنالیز آماری: تمامی انکوباسیون‌ها در سه روز مختلف تکرار گردید و داده‌ها در قالب یک طرح کاملاً تصادفی در ۵ سطح (سطوح مختلف اسانس یا عصاره نعناع) و به‌صورت تجزیه مرکب به کمک رویه MIXED نرم افزار SAS و با استفاده از مدل زیر مورد تجزیه‌وتحلیل آماری قرار گرفت:

$$Yijkl = \mu + Ai + Dj + Ai \times Dj + e(ij)k$$

که در آن

μ: میانگین، Ai: اثر تیمار، Dj: اثر روز، e(ij)k: اثر خطا می باشند که در مدل استفاده شده، تیمارها (شامل دوزهای مختلف اسانس و عصاره نعناع) به‌عنوان اثر ثابت و روز، تیمار × روز و تکرار تست شده در روز به عنوان اثرات تصادفی در نظر گرفته شدند. برای ارزیابی روند پاسخ (خطی و درجه دو) متغیرهای مختلف به سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع از مقایسه‌های اورتوگونال استفاده شد. در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمارها، حداقل مربعات میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی کرامر در سطح معنی داری ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. همچنین سطح احتمال بین ۵ و ۱۰ درصد محدوده تمایل به معنی‌داری در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی

بر تولید گاز کل و گاز متان: داده‌های مربوط به اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر تولید گاز ۲٤ ساعته و متان در جدول ۳ ارائه شده است. بر اساس نتایج جدول ۳، حجم گاز کل تولیدی[6] با افزایش دوز هردو افزودنی (اسانس و عصاره) به صورت درجه دو تغییر یافت (P<۰/۰۵). بااین حال مؤلفه مذکور تنها در سطوح مختلف عصاره نعناع دشتی تحت تأثیر تیمار قرار گرفت (P<۰/۰۱)،

1. Thermal Conductivity Detector
2. Porapak-Q, 1.8 m × 2 mm i.d. 80/100 mesh size
3. Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2000)
4. GC-FID, USA, HP 5890 Series, Agilent Technologies
5. CP-Wax 58 FFAP CB
6. Gas produced after 24 h of incubation (GP_{24})

به‌طوری‌که حجم گاز تولیدی در سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره بالاترین مقدار و در سطح ٦۰۰ میلی-گرم بر لیتر پایین‌ترین مقدار را داشت. تغییرات حجم گاز دی‌اکسید کربن نیز تقریباً مشابه با گاز کل بود و تحت تأثیر عصاره به‌صورت درجه دو تغییر کرد (P<۰/۰۵). بااین حال، حجم گاز متان تولیدی فقط تحت تأثیر عصاره نعناع به‌صورت غیرخطی (خطی و درجه دو) کاهش یافت (P<۰/۰۵). درصد دی‌اکسید کربن تحت تأثیر هیچ‌کدام از افزودنی‌ها قرار نگرفت (P>۰/۰۵). بااین وجود، درصد متان تولیدی، تحت تأثیر هر دو افزودنی (اسانس و عصاره) قرار گرفت و به‌موازات افزایش دوز اسانس به‌صورت خطی (P<۰/۰۱) و تحت تأثیر عصاره به‌صورت غیرخطی (P<۰/۰۱) کاهش یافت. بر این اساس، درصد گاز متان تحت تأثیر اسانس و عصاره نعناع به ترتیب به میزان ۸/۲ و ۱۲/۷ درصد در بالاترین سطوح کاهش یافت. همچنین، نسبت متان به گازکربنیک مشابه با درصد متان تولیدی تحت تأثیر هردو افزودنی (اسانس و عصاره) قرار گرفت و با افزایش دوز اسانس به صورت خطی (P<۰/۰۱) و تحت تأثیر عصاره به‌صورت غیرخطی (P<۰/۰۱) کاهش یافت.

در آزمایش حاضر، کاهش میزان گاز تولیدی در سطح بالای عصاره نعناع دشتی با کاهش میزان هضم شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی در این سطح همسو بود و این می‌تواند درنتیجه اثرات مهاری این افزودنی بر فعالیت میکروبی شکمبه باشد (Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۳؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸). بااین‌وجود، علیرغم کاهش هضم شکمبه‌ای ماده خشک و آلی در سطح بالا و تا حدودی در سطوح متوسط اسانس، عدم‌تغییر قابل‌توجه در گاز تولیدی می‌تواند درنتیجه تولید گاز از منشأ غیر سوبسترا باشد. عدم همسویی گاز تولیدی با تولید کل اسیدهای چرب فرار نیز می‌تواند مؤید این احتمال باشد. در این راستا، تحقیقات گذشته نشان داده است که ترکیبات ثانویه گیاهی، ازجمله ترکیبات روغن‌های اسانسی ممکن است توسط میکروب‌های شکمبه تجزیه شوند (Broudiscou و همکاران، ۲۰۰۲؛ Malecky و همکاران، ۲۰۱۲) و این می‌تواند منجر به تولید گاز بدون تولید اسیدهای چرب فرار گردد.

کاهش درصد متان تولیدی و نسبت متان تولیدی به دی‌اکسید کربن به موازات افزایش هر دو افزودنی (اسانس و عصاره) می‌تواند عمدتاً به دلیل اثرات مهاری مستقیم ترکیبات مؤثره موجود در نعناع به خصوص در بخش عصاره آن بر متانوژن‌ها و یا پروتوزوآها باشد. در این رابطه، در تحقیقات پیشین یک اثر ضد متانوژنیک قوی از ترکیبات موثره اسانس نعناع گزارش شده است (Agarwal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Delgadillo-Ruiz و همکاران، ۲۰۲۱). با این حال، بخشی از اثرات مهاری اسانس و عصاره نعناع بر تولید متان به خصوص در غلظت بالا می‌تواند به طور غیرمستقیم و در نتیجه محدودیت پیش‌سازهای آن برای متانوژن‌ها مانند دی‌اکسید کربن و دی هیدروژن باشد (Patra و Yu، ۲۰۱۲).

این امر با توجه به کاهش حجم دی‌اکسید کربن در سطح بالای اسانس و بخصوص عصاره نعناع دشتی تا حدی قابل تائید است. در برخی از مطالعات گزارش‌شده است که گیاه نعناع به دلیل داشتن برخی از متابولیت‌های ثانویه مانند ال کارون، دی هیدروکارون، فلاندرن، منتول و منتون (Lawless و همکاران، ۱۹۹۵)، دارای اثرات ضد پروتوزوآیی و کاهش‌دهنده متانوژن‌هاست (Ando و همکاران، ۲۰۰۳؛ Agarwal و همکاران، ۲۰۰۸؛ Delgadillo-Ruiz و همکاران، ۲۰۲۱).

جدول ۳ -اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر تولید گاز ۲٤ ساعته و متان

Table 3. Effects of different doses of *Mentha spicata* essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on 24-h *in vitro* gas and methane production

P-Value			SEM	MSEO (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.045	0.934	0.152	4.41	105.9	119.3	114.7	113.5	109.1	تولیدگاز۲٤ساته GP_{24}
0.191	0.253	0.387	0.74	15.4	17.7	17.3	17.0	17.2	تولیدمتان(میلی لیتر) CH_4(ml.24h)
0.092	0.825	0.335	3.20	83.5	92.6	90.0	78.2	85.0	تولید دی اکسید کربن (میلی‌لیتر) CO_2(ml.24h)
0.696	0.001	0.013	0.19	14.5^{b}	14.8^{b}	15.1^{ab}	15.3^{ab}	15.8^{a}	درصد متان CH_4%
0.813	0.717	0.417	0.43	78.6	77.6	78.5	78.5	77.8	درصد دی اکسیدکربن CO_2%
0.826	0.006	0.054	0.003	0.18^{b}	0.19^{ab}	0.19^{ab}	0.19^{ab}	0.2^{a}	متان به دی اکسید کربن CO_2. CH_4
P-Value			SEM	MSEX (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.002	0.391	0.017	4.11	97.1^{b}	107.9^{ab}	115.8^{ab}	106.7^{ab}	101.9^{ab}	تولیدگاز۲٤ساته GP_{24}
0.019	0.002	0.007	0.48	13.0^{b}	14.9^{ab}	16.5^{a}	15.5^{a}	16.1^{a}	تولیدمتان(میلی لیتر) CH_4(ml.24h)
0.003	0.220	0.023	2.67	73.3^{b}	83.3^{ab}	90.1^{a}	83.3^{ab}	79.5^{ab}	تولید دی اکسید کربن(میلی لیتر) CO_2(ml.24h)
0.007	<0.001	<0.001	0.14	13.7^{c}	13.8^{c}	14.2^{bc}	14.6^{b}	15.7^{a}	درصد متان CH_4%
0.353	0.907	0.456	0.42	77.3	77.3	77.3	78.1	78.0	درصد دی اکسیدکربن CO_2%
0.023	<0.001	<0.001	0.003	0.175^{b}	0.177^{b}	0.180^{b}	0.187^{b}	0.203^{a}	متان به دی اکسید کربن CO_2. CH_4

SEM: انحراف استاندارد میانگین‌ها، P-Value (تیمار =Tr، خطی=L، درجه دوم=Q) و حروف بالا^{a,b} در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ می‌باشد.

SEM: standard error of the means, P-Values (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), ^{a,b}: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.

از این رو، همان‌طور که اشاره شد، در مطالعه حاضر بخشی از کاهش تولید متان ممکن است با کاهش نسبی جمعیت‌های پروتوزوآی شکمبه که زیستگاه طبیعی برخی از جمعیت های متانوژنیک هستند و در تأمین دی هیدروژن به متانوژن‌ها نقش دارند، مرتبط باشد (Hegarty و Klieve، ۱۹۹۹؛ Moss و همکاران، ۲۰۰۰؛ Khejornsart و همکاران، ۲۰۲۱؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲).

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه: نتایج مربوط به اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه در جدول ٤

آمده است. براساس نتایج جدول مذکور به‌موازات افزایش سطوح هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع دشتی میزان هضم حقیقی ماده خشک و میزان هضم حقیقی مادهٔ آلی سوبسترا به‌صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵). بااین‌حال، فقط سطوح ٤۵۰ و ٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس و سطح بالای عصاره منجر به کاهش معنی‌دار هضم ماده خشک و آلی در مقایسه با شاهد گردید (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه افزودنی های نعناع دشتی (اسانس و عصاره) حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات فنلی (کارون و لیمونن در بخش اسانس و ترکیبات فلاونوئیدی در بخش عصاره) می باشند (Hassan و همکاران، ۲۰۱٤؛ Snoussi و همکاران، ۲۰۱۵؛ Bardaweel و همکاران، ۲۰۱۸)، لذا می‌توانند در سطوح بالا علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان بازدارنده (اثرات ضد میکروبی غیراختصاصی) عمل کنند و از این طریق باعث کاهش فعالیت میکروارگانیسم‌های درگیر در هضم خوراک شوند. در این رابطه برخی از محققان نشان دادند که استفاده از گیاه نعناع در سطوح ۵ درصد در جیره‌های گاوهای هلشتاین منجر به کاهش قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی گردید (Hosoda و همکاران، ۲۰۰۵). همچنین در مطالعه‌ای دیگری مشخص شد که استفاده از سطوح بالای روغن اسانس نعناع منجر به کاهش فرایند هضم و تخمیر می‌شود (Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱). با توجه به این نتایج، به نظر می‌رسد که روغن اسانسی نعناع اثرات آنتی میکروبی قوی‌تری نسبت به عصاره نعناع دارد و در سطوح ٤۵۰ میلی‌گرم بر لیتر و بالاتر موجب کاهش فعالیت عمومی میکروبی شکمبه می‌گردد که در مجموع موجب افت عملکرد شکمبه می‌گردد.

فاکتور تفکیک[1] تنها تحت تأثیر عصاره نعناع دشتی قرار گرفت و به‌موازات افزایش دوز عصاره به‌صورت درجه دو تغییر کرد (P < ۰/۰۵)، بااین‌حال، اسانس نعناع نیز تمایل به تغییر این فاکتور به‌صورت خطی داشت. در واقع فاکتور تفکیک بیانگر نسبت توزیع ماده آلی هضم شده بین مسیرهای متابولیکی تخمیر (تولید اسیدهای چرب فرار و گاز) و مسیر تولید توده میکروبی می‌باشد (Blummel و همکاران، ۱۹۹۷b)، بااین‌حال در محاسبه آن که از نسبت ماده آلی هضم شده به گاز تولیدشده به دست می‌آید، میزان توده میکروبی و یا اسیدهای چرب فرار تولیدشده لحاظ نشده و در صورت تولید گاز از منابع آلی غیرمغذی، این مؤلفه نمی‌تواند شاخص دقیقی از توزیع ماده آلی هضم شده در مسیرهای دوگانه متابولیکی یادشده در شکمبه باشد. در آزمایش حاضر کاهش فاکتور تفکیک در سطوح متوسط اسانس و عصاره می‌تواند به دلیل افزایش گاز تولیدی در این سطوح باشد. درصورتی‌که روند تغییرات اسیدهای چرب فرار کل در هر دو افزودنی و همچنین پاسخ توده میکروبی به سطوح عصاره نعناع به صورت خطی می‌باشد، لذا در این شرایط می‌توان انتظار داشت که روند تغییرات توده میکروبی متفاوت از پاسخ فاکتور تفکیک باشد. در تحقیق حاضر، توده میکروبی و بازده سنتز توده میکروبی تنها تحت تأثیر افزودنی عصاره نعناع دشتی قرار گرفتند، بااین‌حال، راندمان سنتز توده میکروبی تحت تأثیر اسانس نعناع نیز به صورت خطی تمایل به افزایش داشت (P=۰/۰۸۳). در این رابطه، با افزایش غلظت عصاره، توده میکروبی و همچنین بازده سنتز توده میکروبی به‌صورت خطی افزایش‌یافته (P<۰/۰۵) و بالاترین مقدار توده میکروبی با افزایش ۱٦/۷ درصدی نسبت به شاهد در سطح ٤۵۰ و بالاترین بازده سنتز توده میکروبی با افزایش ۲۵/۳

1. Partitioning Factor

درصدی نسبت به شاهد در سطح ۶۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مشاهده شد. همچنین، غلظت آمونیاک شکمبه‌ای نیز به‌طور متفاوتی تحت تأثیر اسانس و عصاره نعناع قرار گرفت، به طوری‌که غلظت آن به‌موازات افزایش دوز اسانس به‌طور خطی افزایش (P<۰/۰۱) و با افزایش دوز عصاره به صورت خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱). در این رابطه، سطح بالای اسانس موجب افزایش ۴۶/۵ درصدی آمونیاک و سطح بالای عصاره موجب کاهش ۱۳/۶درصدی غلظت آمونیاک در مقایسه با شاهد شدند (P<۰/۰۵). اثرات کاملاً متفاوت اسانس و عصاره نعناع بر تولید توده میکروبی و همین‌طور غلظت آمونیاک شکمبه‌ای می‌تواند به ماهیت ترکیبات متفاوت موجود در این دو افزودنی نعناع دشتی مربوط باشد.

در این تحقیق، افزایش توده میکروبی و راندمان سنتز آن بهنگام استفاده از عصاره نعناع با تغییرات غلظت آمونیاک شکمبه‌ای همسو بود، لذا می‌توان اذعان داشت که افزایش راندمان سنتز توده میکروبی که مبین استفاده بهینه از نیتروژن در دسترس جهت سنتز پروتئین میکروبی می‌باشد (Jouany، ۱۹۹۶؛ Santoso و همکاران، ۲۰۰۷؛ Joch و همکاران، ۲۰۱۹)، منجر به کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای بهنگام استفاده از عصاره نعناع شده است. در نگاه کلی‌تر و با توجه به اثر پررنگ‌تر عصاره نعناع در مقایسه با اسانس آن در کاهش گاز متان ازیک‌طرف و همچنین نقش مهم پروتوزوآها در تولید متان و آمونیاک (Bach وهمکاران، ۲۰۰۵) و همچنین ترن آور میکروبی و در نتیجه کاهش راندمان سنتز پروتئین میکروبی (Santoso و همکاران، ۲۰۰۷؛ El-Zaiat و Abdalla، ۲۰۱۹) از طرف دیگر، می‌توان نتیجه گرفت که بخشی از اثرات مثبت عصاره نعناع می‌تواند در نتیجه کاهش جمعیت پروتوزوآیی شکمبه باشد. تحقیقات انجام شده در این زمینه حاکی از اثرات ضد پروتوزوآیی تانن‌ها و فلاونوئید (ترکیبات غالب در عصاره نعناع) بر جمعیت پروتوزوآیی شکمبه است (Patra و همکاران، ۲۰۰۶؛ Wang و همکاران، ۲۰۱۳؛ El-Zaiat و همکاران، ۲۰۱۹). در مقابل، افزایش میزان غلظت نیتروژن آمونیاکی به‌موازات افزایش دوز اسانس، باوجود کاهش نسبی هضم ماده آلی در دوزهای متوسط می‌تواند ناشی از اثرات ضد میکروبی قوی‌تر اسانس و لذا مهار رشد میکروبی و حتی لیز آن‌ها باشد. لازم به ذکر است غلظت آمونیاک در شکمبه حاصل تعادل بین تجزیه پروتئین جیره‌ای و لیز میکروب‌ها ازیک طرف و جذب آن توسط میکروب‌ها (در شرایط آزمایشگاهی) و جذب از دیواره شکمبه (در دام زنده) از طرف دیگر می‌باشد (Nolan و Dobos، ۲۰۰۵). لذا، افزایش غلظت شکمبه‌ای آمونیاک به‌موازات افزایش دوز اسانس باوجود کاهش نسبی هضم ماده آلی، نمی‌تواند در نتیجه افزایش تجزیه پروتئین جیره‌ای باشد. همان طور که قبلاً اشاره شد، بالاتر بودن اثر ضد میکروبی اسانس نعناع در مقایسه با عصاره آن می‌تواند منجر به لیز باکتری‌ها شده باشد که این می‌تواند یکی از دلایل افزایش آمونیاک شکمبه‌ای توسط اسانس در آزمایش حاضر باشد (Cleff و همکاران، ۲۰۱۵).

جدول ٤- اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر شاخص‌های هضم و تخمیر شکمبه

Table 4. Effects of different doses of *Mentha spicata* essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on rumen digestibility and fermentation

P-Value			SEM	MSEO (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.840	0.001	0.007	1.03	77.2^{b}	78.4^{b}	81.3^{ab}	83.0^{a}	84.5^{a}	تجزیه‌پذیری حقیقی ماده خشک TIVDMD(%)
0.999	0.001	0.008	1.04	77.5^{c}	78.7^{bc}	81.4^{abc}	82.9^{ab}	84.8^{a}	تجزیه‌پذیری حقیقی ماده آلی TIVOMD(%)
0.057	0.071	0.089	0.15	3.64	3.31	3.57	3.69	3.89	فاکتور تفکیک PF
0.408	0.153	0.454	3.58	141.0	141.3	141.7	142.9	147.0	توده میکروبی MB(mg)
0.427	0.083	0.336	0.01	0.365	0.359	0.348	0.345	0.347	بازده سنتز توده میکروبی EMBS (mg)
0.490	0.003	0.020	0.74	14.5^{a}	12.1^{ab}	12.0^{ab}	11.3^{ab}	9.91^{b}	آمونیاک $NH3(mmol\ L^{-1})$

P-Value			SEM	MSEX (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.720	0.001	0.008	1.14	77.8^{b}	79.6^{ab}	80.7^{ab}	82.4^{a}	84.3^{a}	تجزیه‌پذیری حقیقی ماده خشک TIVDMD(%)
0.736	0.001	0.009	1.22	77.6^{b}	79.6^{ab}	80.6^{ab}	82.5^{a}	83.4^{a}	تجزیه‌پذیری حقیقی ماده آلی TIVOMD(%)
0.002	0.265	0.015	0.14	4.02^{a}	3.70^{ab}	3.50^{b}	3.88^{ab}	4.13^{a}	فاکتور تفکیک PF
0.291	0.003	0.022	5.75	141.7^{ab}	144.11^{a}	138.4^{ab}	126.4^{ab}	123.5^{b}	توده میکروبی MB(mg)
0.520	0.001	0.012	0.02	0.366^{b}	0.363^{b}	0.344^{ab}	0.307^{ab}	0.292^{b}	بازده سنتز توده میکروبی EMBS (mg)
0.115	0.008	0.039	0.74	8.81^{b}	8.17^{b}	9.05^{ab}	9.34^{ab}	10.2^{a}	آمونیاک $NH_3(mmol\ L^{-1})$

SEM: انحراف استاندارد میانگین‌ها، P-Value (تیمار =Tr، خطی=L، درجه دوم=Q)و حروف بالا^{a,b} در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ می‌باشد.

SEM: standard error of the means, P-Value (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), ^{a,b}: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.

اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه:

بر اساس نتایج جدول ۵، غلظت کل اسیدهای چرب فرار با افزایش سطح اسانس و عصاره نعناع دشتی به ترتیب به‌صورت غیرخطی (خطی ودرجه دوم) و خطی کاهش یافت (P<۰/۰۱)، به‌طوری‌که سطح بالای هر دو افزودنی (٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) به ترتیب موجب کاهش ۲۰ و ۲۸ درصدی غلظت کل اسیدهای چرب فرار در مقایسه با شاهد گردید.

همچنین، پروفایل اسیدهای چرب فرار نیز تحت تأثیر اسانس و عصاره نعناع دشتی تغییر کرد. در این راستا، مهم‌ترین تغییر مربوطه به افزایش درصد مولی پروپیونات بود که تحت تأثیر هر دو افزودنی به‌صورت غیرخطی افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بالاترین درصد مولی آن با افزایش ٦/٤ درصدی نسبت به شاهد در سطح

۱۵۰ میلی‌گرم بر لیتر اسانس و با افزایش ۷/٦ درصدی نسبت به شاهد در سطح ٦۰۰ میلی‌گرم بر لیتر عصاره مشاهده شد. بر همین اساس، نسبت استات به پروپیونات به صورت غیرخطی تحت تأثیر اسانس و عصاره نعناع کاهش یافت (P<۰/۰۵). همچنین، با افزایش دوز اسانس نعناع، درصد مولی بوتیرات به‌صورت خطی کاهش (P<۰/۰۱) و درصد مولی ایزو بوتیرات به‌صورت خطی افزایش (P<۰/۰۱) یافت. دراین‌بین، درصد مولی ایزو والرات نیز تحت تأثیر اسانس به‌صورت غیرخطی تغییر کرد (P<۰/۰۵)، هر چند اثر تیمار بر آن معنی‌دار نبود.

در این تحقیق، با وجود همسویی تغییرات غلظت کل اسیدهای چرب فرار با تغییرات هضم ماده آلی در هر دو تیمار اسانس و عصاره، کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌خصوص با افزایش دوز عصاره نعناع با شیب بیشتری همراه بود. لذا، همانطورکه قبلاً اشاره شد، به نظر می‌رسد که علاوه بر کاهش فعالیت میکروبی در دوز بالا و تا حدودی در دوزهای متوسط، تغییر مسیر توزیع مواد مغذی هضم شده به سمت تولید توده میکروبی، عامل مهم کاهش پررنگ‌تر غلظت کل اسیدهای چرب فرار در تیمارهای عصاره نعناع باشد. این نتایج با نتایج مربوط به توده میکروبی و راندمان سنتز توده میکروبی هم‌خوانی دارد. در این رابطه، برخی از مطالعات پیشین نشان داده‌اند که استفاده از اسانس نعناع و یا ترکیبات مؤثره (کارون) آن می‌تواند منجر به افزایش PH و کاهش اسیدهای چرب فرار گردد (Busquet و همکاران، ۲۰۰٦؛ Taghavi Nezhad و همکاران، ۲۰۱۱)، در برخی دیگر از این تحقیقات مشخص شده که کاهش PH می‌تواند هم تجزیه پذیری و هم سنتز پروتئین میکروبی را کاهش دهد (Wenner و همکاران، ۲۰۱۷) که می‌تواند موئید این امر باشد که تغییرات PH می‌تواند تخمیر شکمبه‌ای را به‌طور ثانویه تحت تأثیر قرار دهد.

در تحقیق حاضر، افزایش نسبت پروپیونات به استات به‌موازات افزایش دوز هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع، به طور عمده ناشی از افزایش نسبت مولی پروپیونات بود. این امر حاکی از بهبود نسبی شرایط تخمیر شکمبه جهت افزایش تولید پروپیونات و میکروب‌های تولیدکننده این متابولیت می‌باشد. این نتایج با تغییرات درصد تولید متان نیز همسو می‌باشد که مبین شیفت اکی والان‌های احیا از مسیر تولید متان به سمت تولید پروپیونات می‌باشد (Patra و Yu، ۲۰۱۳؛ Ungerfeld، ۲۰۱۵؛ Golbotteh و همکاران، ۲۰۲۲). علاوه بر این، افزایش نسبت مولی پروپیونات به خصوص در تیمارهای عصاره می‌تواند تا حدی ناشی از کاهش جمعیت پروتوزوآها باشد. در این راستا، مطالعات صورت گرفته نشان داده که کاهش جمعیت پروتوزوآیی می‌تواند موجب افزایش غلظت مولی پروپیونات و افزایش نسبت پروپیونات به استات گردد (Patra و همکاران، ۲۰۰٦، El-Zaiat و همکاران، ۲۰۱۹؛ Torres و همکاران، ۲۰۲۰).

غلظت اسیدهای چرب فرار شاخه دار عموماً با تجزیه پروتئین و دآمیناسیون اسیدهای آمینه ازیک طرف و جذب آن‌ها توسط میکروب‌های شکمبه برای سنتز پروتئین میکروبی در ارتباط است (Roman-Garcia و همکاران، ۲۰۱٦؛ Roman-Garcia و همکاران، ۲۰۲۱). در مطالعه حاضر، نظر به کاهش هضم ماده خشک و آلی، افزایش نسبت مولی ایزوبوتیرات به‌موازات افزایش اسانس می‌تواند درنتیجه کاهش برداشت میکروبی برای این اسید چرب باشد که این نتایج با افزایش غلظت آمونیاک و عدم‌تغییر در توده میکروبی علیرغم بهبود نسبی راندمان تولید میکروبی در این تیمارها همخوانی دارد.

جدول ۵ -اثرات سطوح مختلف اسانس و عصاره نعناع دشتی بر پروفایل اسیدهای چرب فرار شکمبه

Table 5. Effects of different doses of Mentha spicata essential oil (MSEO) and extract (MSEX) on rumen volatile fatty acid (VFA) profiles.

P-Value			SEM	MSEO (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.001	<0.001	<0.001	1.06	80.0^{c}	83.5^{c}	83.6^{c}	89.4^{b}	100.3^{a}	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA (Mmol.L)
پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acids profiles (Mmol 100^{-1} Mmol)									
0.591	0.447	0.675	0.27	49.6	49.7	49.4	49.2	49.5	استات Acetate
0.011	0.010	0.014	0.21	23.1^{a}	23.2^{a}	23.0^{a}	23.3^{a}	21.9^{b}	پروپیونات Propionate
0.381	<0.001	0.001	0.01	2.10^{a}	2.04^{b}	2.05^{ab}	1.99^{bc}	1.94^{c}	ایزوبوتیرات Iso-butyrat
0.185	0.002	0.021	0.10	16.4^{b}	16.4^{b}	16.6^{ab}	16.6^{ab}	17.0^{a}	بوتیرات Butyrate
0.045	0.016	0.061	0.16	5.60^{ab}	5.57^{b}	5.62^{ab}	5.65^{ab}	6.36^{a}	ایزووالرات Iso-valerat
0.649	0.187	0.424	0.10	3.20	3.08	3.29	3.26	3.35	والرات Valerate
0.011	0.021	0.016	0.02	2.15^{b}	2.14^{b}	2.15^{b}	2.11^{b}	2.26^{a}	نسبت استات به پروپیونات Acetate: Propionate
P-Value			SEM	MSEX (میلی‌گرم بر لیتر)					فرا سنجه
Q	L	Tr		600	450	300	150	صفر	
0.461	<0.001	<0.001	1.89	69.5^{c}	76.1^{c}	85.8^{b}	90.9^{ab}	97.1^{a}	کل اسیدهای چرب فرار Total VFA(Mmol.L)
پروفایل اسیدهای چرب فرار (میلی مول بر ۱۰۰ میلی مول) volatile fatty acid profiles (Mmol 100^{-1} Mmol)									
0.137	0.122	0.229	1.06	44.2	46.5	47.3	47.1	46.7	استات Acetate
0.027	<0.001	<0.001	0.26	22.7^{a}	22.3^{a}	21.0^{b}	20.6^{b}	21.1^{b}	پروپیونات Propionate
0.538	0.987	0.961	0.56	7.84	7.38	7.36	7.67	7.71	ایزوبوتیرات Iso-butyrat
0.251	0.978	0.501	0.41	16.2	15.2	15.6	15.9	15.9	بوتیرات Butyrate
0.775	0.758	0.967	0.42	5.89	5.48	5.64	5.69	5.57	ایزووالرات Iso-valerat
0.601	0.252	0.755	0.14	3.26	3.12	3.10	3.01	3.05	والرات Valerate
0.014	<0.001	0.003	0.05	1.95^{b}	2.09^{ab}	2.24^{a}	2.28^{a}	2.21^{a}	نسبت استات به پروپیونات Acetate: propionate

SEM: انحراف استاندارد میانگین‌ها، P-Value (تیمار =Tr، خطی=L، درجه دوم=Q)و حروف بالا^{a,b} در هر ردیف نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح خطای ۰/۰۵ می‌باشد.

SEM: standard error of the means, P-Value (Tr: treatment, L: linear, Q: quadratic), ^{a,b}: different superscript letters indicate differences (P<0.05) between the treatments.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده ازهر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع دشتی موجب کاهش درصد گاز متان گردید، بااین‌حال، عصاره نعناع اثرات بارزتری در کاهش تولید متان داشت. علیرغم کاهش خطی میزان هضم شکمبه‌ای ماده خشک و آلی توسط هر دو افزودنی، استفاده از عصاره نعناع در سطوح پایین و متوسط و استفاده از اسانس نعناع تا سطح ۳۰۰ میلی‌گرم بر لیتر اثر معنی‌داری در کاهش هضم شکمبه‌ای نداشت. کاهش غلظت اسیدهای چرب فرار توسط هر دو افزودنی اسانس و عصاره نعناع با تغییر پروفایل اسیدهای چرب فرار به سمت افزایش نسبت مولی پروپیونات همراه بود که این امر حاکی از مقاومت بالاتر باکتری‌های آمیلولایتیک به این افزودنی‌ها می‌باشد. درعین‌حال، کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار به‌هنگام استفاده از عصاره نعناع با افزایش توده میکروبی و راندمان سنتز توده میکروبی و همچنین کاهش غلظت آمونیاک شکمبه‌ای همراه بود که همگی مبین بهبود راندمان استفاده از مواد مغذی جیره به‌موازات بهبود سنتز پروتئین میکروبی می‌باشد. در مجموع، به نظر می‌رسد استفاده از عصاره نعناع در سطوح پایین و متوسط می‌تواند موجب بهبود تخمیر شکمبه و کاهش هدر رفت مواد مغذی جیره و در نتیجه کاهش اثرات زیست‌محیطی پرورش نشخوارکنندگان گردد.

منابع

Adesogan, A.T. (2009). Using dietary additives to manipulate rumen fermentation and improve nutrient utilization and animal performance. *20th Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*. 13-38.

Agarwal, N., Shekar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C., & Amra, D.N. (2008). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology,*.148:321-327.

Ando, S., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., & Bayaru, E. Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82(2): 245-248.

AOAC. 2000. Official methods of analysis,17th ed. *Association of official analytical chemists*., VA, USA.

Bach, A., Calsamiglia, S., & Stern, M.D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 88: E9-E21.

Bardaweel, S. K., Bakchiche, B., ALSalamat, H. A., Rezzoug, M., Gherib, A., & Flamini, G. (2018). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and Antiproliferative activities of essential oil of Mentha spicata L.(*Lamiaceae*) from Algerian Saharan atlas. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18: 1-7.

Blummel, M., Makkar, H. P. S., &Becker, K. (1997a). *In vitro* gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 77: 24-34.

Blummel, M., Steingaβ, H., & Becker, K. (1997b). The relationship between *in vitro* gas production, *in vitr*o microbial biomass yield and 15 N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. *British Journal of Nutrition*, 77: 911-921.

Bodas, R., Prieto, N., García-Gonzáles, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., & López,S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane produc-tion with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 78–93.

Broderick, G. A., & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*, 63: 64-75.

Broudiscou, L.-P., Papon, Y., & Broudiscou, A.F. (2002). Effects of dry plant extracts on feed degradation and the production of rumen microbial biomass in a dual outflow fermenter. *Animal Feed Science and Technology*, 101: 183–189.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. & Kamel, C. (2006). Plant extracts affect *in vitro* rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89: 761–771.

Calabrò, S. (2015). Plant secondary metabolites. Rumen microbiology:From evolution to revolution, *Springer,* New Delhi, India, 400p.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., & Ferret, A.(2007). Invited Review: Essential Oils as Modifiers of Rumen Microbial Fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580–2595.

Cleff, M.B., Meinerz, A. R., Xavier, M., Schuch, L.F., Schuch, L.F., Araújo & Meireles, M.C. (2010). *In vitro* activity of origanum vulgare essential oil against Candida species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41:116–23.

Delgadillo-Ruiz, L., Bañuelos-Valenzuela, R., Gallegos-Flores, P., Echavarría-Cháirez, F., Meza-López, C., & Gaytán-Saldaña, N. (2021). Modification of ruminal fermentation *in vitro* for methane mitigation by adding essential oils from plants and terpenoid compounds. *Abanico veterinário*, 11:1-12.

Dey, A., Paul, S. S., Lailer, P. C., & Dahiya, S. S. (2021). Reducing enteric methane production from buffalo (*Bubalus bubalis*) by garlic oil supplementation in *in vitro* rumen fermentation system. *SN Applied Sciences*, 3(2): 187.

El-Zaiat, H.M., & Abdalla, A.L.(2019). Potentials of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on ruminal methanogenesis, feed degradability, and enzyme activities *in vitro*. *Environmental Science and Pollution Research*, 26: 30220–30228.

El-Zaiat, H.M., Ré, D.D., Patino, H.O., & Sallam, S.M. (2019). Assessment of using dried vinasse rice to replace soybean meal in lambs diets: *In vitro*, lambs performance and economic evaluation. *Small Ruminant Research*, 173: 1–8.

Faniyi, T. O., Adewumi, M. K., Jack, A. A., Adegbeye, M. J., Elghandour, M. M., Barbabosa-Pliego, A., & Salem, A. Z. (2021). Extracts of herbs and spices as feed additives mitigate ruminal methane production and improve fermentation characteristics in West African Dwarf sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 53: 1-8.

Garcia-Galicia, I. A., Arras-Acosta, J. A., Huerta-Jimenez, M., Rentería-Monterrubio, A. L., Loya-Olguin, J. L., Carrillo-Lopez, L. M., & Alarcon-Rojo, A. D. (2020). Natural oregano essential oil may replace antibiotics in lamb diets: Effects on meat quality. *Antibiotics*, 9(5), 248.

Giordani, R., Regli, P., Kaloustian, J., Mikail, C., Abou, L., & Portugal, H. (2004). Antifungal effect of various essential oils against Candidaalbicans. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18(12): 990-995.

Golbotteh, M. M., Malecky, M., Aliarabi, H., Zamani, P., & Ganjkhanlou, M. (2022). Dose-response effects of the Savory (*Satureja khuzistanica*) essential oil and extract on rumen fermentation characteristics, microbial protein synthesis and methane production *in vitro*. *Annals of Animal Science*, 22(3): 1001-1014.

Hassan, R. A., Hamed, H. B., Sanad, M. I., & Said Ahmed, K. A. (2014). Free radicals scavenging activity of spearmint methanolic extract. *Journal of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 5(7): 189-200.

Hegarty, R., & Klieve, A.(1999). Opportunities for biological control of ruminal methanogenesis. *Australian Journal of Agricultural Research.* 50: 1315-1320.

Hosoda, K., Nishida, T., Park, W. Y., & Eruden, B. (2005). Influence of Mentha× piperita L.(*peppermint*) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18(12): 1721-1726.

Hristov, A.N., Oh, J., Giallongo, F., Frederick, T.W., Harper, M.T., Weeks, H.L., Branco, A.F., Moate, P.J., Deighton, M.H., Williams, S.R.O., Kindermann, M., & Duval, S. (2015). An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative

effect on milk production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* USA. 112 (34): 10663e10668.

Hussain, A. I., Anwar, F., Shahid, M., Ashraf, M., & Przybylski, R. (2010). Chemical composition, and antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of spearmint (*Mentha spicata L.*) from Pakistan. *Journal of Essential Oil Research*, 22(1): 78-84.

Joch, M., Kudrna, V., Hakl, J., Božik, M., Homolka, P., Illek, J., Tyrolová, Y., & Výborná, A. (2019). *In vitro* and *in vivo* potential of a blend of essential oil compounds to improve rumen fermentation and performance of dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 251:176–186.

Jouany, J.P. (1996). Effect of rumen protozoa on nitrogen utilization by ruminants. *Journal of Nutrition*, 126:1335S–1346S.

Kahvand, M., & Malecky, M. (2018). Dose-response effects of sage (*Salvia officinalis*) and yarrow (*Achillea millefolium*) essential oils on rumen fermentation *in vitro*. *Annals of Animal Science*, 18: 125–142.

Khejornsart, P., Cherdthong, A., & Wanapat, M. (2021). *In vitro* screening of plant materials to reduce ruminal protozoal population and mitigate ammonia and methane emissions. *Fermentation*, 7(3): 166.

Kim, H., Jung, E., Lee, H. G., Kim, B., Cho, S., Lee, S., & Seo, J. (2019). Essential oil mixture on rumen fermentation and microbial community–an *in vitro* study. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 32(6): 808.

Lawless, J. (1995). The Illustrated Encyclopaedia of Essential Oils. *Element Books Ltd*, 256p.

Mahendran, G., Verma, S.K. & Rahman, L.U. (2021)."The traditional uses, phytochemistry and pharmacology of spearmint (*Mentha spicata L.*): A review." *Journal of Ethnopharmacology* 278: 114266.

Makkar, H., Blümmel, M., & Becker, K. (1995). Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas production and true digestibility in *in vitro* techniques. *British Journal of Nutrition*, 73: 897-913.

Malecky, M., Albarello, H., & Broudiscou, L.P. (2012). Degradation of terpenes and terpenoids from Mediterranean rangelands by mixed rumen bacteria *in vitro*. *Animal* 6: 612-616.

Matthews, C., Crispie, F., Lewis, E., Reid, M., O'Toole, P. W., & Cotter, P. D. (2019). The rumen microbiome: a crucial consideration when optimising milk and meat production and nitrogen utilisation efficiency. *Gut Microbes*, 10(2): 115-132.

Menke, K., & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*, 28: 7-55.

Moss, A.R., Jouany, J.-P., & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming, Annales de zootechnie, EDP Sciences, pp. 231-253.

Nolan, J.V., & Dobos, R.C. (2005). Nitrogen Transactions in Ruminants. In: Quantitative aspects of ruminant digestion and metabolism,Dijkstra J., Forbes J.M., France J. (eds.). *CABI Publishing*. Walingford, UK, pp. 177–206.

Orzuna-Orzuna, J.F., Dorantes-Iturbide, G., Lara-Bueno, A., Miranda-Romero, L.A., Mendoza-Martínez, G.D. & Santiago-Figueroa, I. (2022). A meta-analysis of essential oils use for beef cattle feed: rumen fermentation, blood metabolites, meat quality, performance and, environmental and economic impact. *Fermentation*, 8: 254.

Ottenstein, D., & Bartley, D. (1971). Separation of free acids C2–C5 in dilute aqueous solution column technology. *Journal of Chromatographic Science*, 9: 673-681.

Patra, A.K., & Yu, Z.(2012).Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78: 4271–4280.

Patra, A.K., & Yu, Z. (2013). Effects of gas composition in headspace and bicarbonate concentrations in media on gas and methane production, degradability, and rumen fermentation using *in vitro* gas production techniques. *Journal of Dairy Science*, 96: 4592–4600.

Patra, A., Kamra, D., & Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis ,enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*. 128: 276-291.

Roman-Garcia, Y., Mitchell, K. E., Denton, B. L., Lee, C., Socha, M. T., Wenner, B. A., & Firkins, J. L. (2021). Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. II: Relation with solid passage rate and pH on neutral detergent fiber degradation and microbial function in continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 104(9): 9853-9867.

Roman-Garcia, Y., White, R. R., & Firkins, J. L. (2016). Meta-analysis of postruminal microbial nitrogen flows in dairy cattle. I. Derivation of equations. *Journal of Dairy Science*, 99(10): 7918-7931.

Sada, A., Nishida, T., Ishida, M., Hosoda, K., & Bayaru, E. (2003). Effect of peppermint feeding on the digestibility, ruminal fermentation and protozoa. *Livestock Production Science*, 82:245-248.

Sanjorjo, R. A., Tseten, T., Kang, M. K., Kwon, M., & Kim, S. W. (2023). In pursuit of understanding the rumen microbiome. *Fermentation*, 9(2): 114.

Santoso, B., Kilmaskossu, A., & Sambodo, P. (2007). Effects of saponin from Biophytum petersianum Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. *Animal Feed Science and Technology,* 137:58–68.

Schader, C., Muller, A., Scialabba, N E-H., Hecht, J., Isensee, A., Erb, K-H., Smith, P.,Makkar ,HPS., Klocke, P., Leiber, F., Schwegler, P., Stolze, M., & Niggli, U. (2015).Impacts of feeding less food-competing feedstuffs to livestock on global food system sustainability. *Journal of the Royal Society Interface* 12: 20150891.

Skendi, A., Irakli, M., & Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 6, 62-69.

Snoussi, M., Noumi, E., Trabelsi, N., Flamini, G., Papetti, A., & De Feo, V. (2015). *Mentha spicata* essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of Vibrio spp. strains. *Molecules*, 20(8): 14402-14424.

Szulc, P., Nowak, B., Hassan, M. U., Lechniak, D., Ślusarczyk, S., Bocianowski, J., & Cieslak, A. (2024). Potential of Paulownia Leaves Silage in Lamb Diet to Improve Ruminal Fermentation and Fatty Acid Profile– An Study. *Annals of Animal Science*, 24(1): 211-221.

Taghavi Nezhad, M., Alipour, D., Torabi Goudarzi, M., Zamani, P., & Khodakaramian, G. (2011). Dose response to carvone rich essential oils of spearmint (*Mentha spicata L.*): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 13(7): 1013-1020.

Taghavi-Nezhad, M., Alipour, D., Flythe, M. D., Zamani, P., & Khodakaramian, G. (2013). The effect of essential oils of *Zataria multiflora* and *Mentha spicata* on the *in vitro* rumen fermentation, and growth and deaminative activity of amino acid-fermenting bacteria isolated from Mehraban sheep. *Animal Production Science*, 54(3): 299-307.

Torres, R., Moura, D., Ghedini, C., Ezequiel, J., & Almeida, M., (2020). Meta-analysis of the effects of essential oils on ruminal fermentation and performance of sheep. *Small Ruminant Research*. 189: 106-148.

Ungerfeld, E.M. (2015). Limits to dihydrogen incorporation into electron sinks alternative to methanogenesis in ruminal fermentation. *Frontiers in microbiology*, 6: 1272.

Van Soest, P. J., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.

Wang, D., Huang J., Zhang Z., Tian X., Huang H., Yu Y., Zhang G.,Ding J., & Huang, R. (2013). Influences of *Portulaca oleracea* extracts on *in vitro* methane emissions and rumen fermentation of forage. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11: 483–488.

Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihaliková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D., & Kišidayová, S. (2015). Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial

community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Ruminant Research,* 125, 64–72.

Wenner, B.A., de Souza, J., Batistel, F., Hackmann, T.J., Yu, Z., & Firkins, J.L. (2017). Association of aqueous hydrogen concentration with methane production in continuous cultures modulated to vary pH and solids passage rate. *Journal of Dairy Science*, 100(7): 5378-5389.

Zhao, Y., Liu, M., Jiang, L., & Guan, L. (2023). Could natural phytochemicals be used to reduce nitrogen excretion and excreta-derived N2O emissions from ruminants?. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 14(1): 140.