"Research article" DOI: 10.30495/JVCP.2019.669193

The effect of oil extracted from *borago officinalis* L. whole plant at flowering stage on some ruminal fermentation parameters of sheep

Kazemi, M.[1]*, Eskandari Torbaghan, Y.[2]

1- Assistant Professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran.
2- M.Sc. Graduate of Immunology, Khalil Abad Health Center, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.
*Corresponding author's email: phd1388@gmail.com.
(Received: 2019/5/12 Accepted: 2019/10/14)

Abstract

Borago officinalis L. is a plant of *Boraginaceae* family, which is commonly used for medicinal purposes. The oil of this plant is rich in essential compounds, which is likely to cause changes in the ruminal fermentation pattern. Hence, this study was carried out with the aim of extracting the oil of *borago officinalis* L. after flowering by Soxhlet apparatusand investigating its effect (at four different levels of 0, 0.15, 0.30 and 0.45 mg/ml) on some ruminal fermentation parameters in an *in vitro* batch culture. The findings indicated that after oil addition, there was no change in gas production parameters (except for constant rate of gas production), microbial mass yield, efficiency of microbial mass synthesis, partitioning factor and protozoal population of the culture medium, but pH was significantly (linear, p=0.04) decreased compared to the control group, and total volatile fatty acids increased (linear, p=0.0006) subsequently. Also, methane yield decreased significantly (linear, p=0.0005) when the level of oil increased in the medium, but in contrast, the degradability of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber increased. The overall results showed that the oil extracted from *Borago officinalis* L. can modify the ruminal fermentation pattern responsible for animal performance and reduce the emission of methane gas. Also, it seems that 0.45 mg/ml of oil produces the maximum effect on the fermentation pattern.

Conflict of interest: None declared.
Keywords: Vegetable oil, *Borago officinalis* L., Ruminal fermentation, Sheep.

"مقاله پژوهشی" DOI: 10.30495/JVCP.2019.669193

اثر روغن استخراج‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در مرحلهٔ گلدهی بر برخی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای گوسفند

محسن کاظمی[1*]، یاسر اسکندری تربقان[2]

۱- استادیار گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت‌جام، تربت‌جام، ایران.
۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد ایمونولوژی، مرکز بهداشت خلیل‌آباد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران.
*نویسنده مسئول مکاتبات: phd1388@gmail.com

(دریافت مقاله: ۹۸/۲/۲۲ پذیرش نهایی: ۹۸/۷/۲۲)

چکیده

گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) گیاهی از خانوادهٔ بوراژیناسه بوده که اغلب برای مصارف دارویی استفاده می‌گردد. روغن موجود در این گیاه، سرشار از ترکیبات ضروری بوده و این امکان وجود دارد که الگوی تخمیر شکمبه‌ای را دستخوش تغییراتی نماید. بدین‌منظور، این مطالعه با هدف استخراج روغن خام گیاه کامل گاوزبان اروپایی در زمان گلدهی با دستگاه سوکسله و بررسی تأثیر سطوح مختلف آن (صفر، ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بر برخی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای در یک محیط کشت ثابت آزمایشگاهی انجام شد. یافته‌ها نشان داد که تغییری در فراسنجه‌های تولید گاز (به‌استثنای نرخ ثابت تولید گاز)، تودهٔ میکروبی تولیدی، راندمان سنتز تودهٔ میکروبی، ضریب تفکیک‌پذیری (partitioning factor) و جمعیت پروتوزوآی محیط کشت در اثر افزودن روغن، وجود ندارد. همچنین pH آن به‌طور معنی‌داری (خطی، p=۰/۰۴) نسبت به تیمار شاهد کاهش، ولی اسیدهای چرب فرار کل (خطی، p=۰/۰۰۰۶) افزایش نشان دادند. از طرف دیگر، با افزایش سطح روغن در محیط کشت، تولید متان به‌طور معنی‌داری (خطی، p=۰/۰۰۰۵) کاهش یافته ولی در مقابل تجزیه‌پذیری ماده‌خشک، ماده آلی و الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی افزایش یافتند. نتایج کلی نشان داد که روغن استخراج‌شده از گاوزبان اروپایی می‌تواند الگوی تخمیر شکمبه‌ای مسئول در عملکرد دام‌ها را تغییر داده و تولید متان را کاهش دهد. به‌نظر می‌رسد که سطح ۰/۴۵ میلی‌گرم بر لیتر از روغن مذکور، بیشترین تأثیرگذاری بر شرایط تخمیر را دارد.

کلیدواژه‌ها: روغن گیاهی، گاوزبان اروپایی، تخمیر شکمبه‌ای، گوسفند.

مقدمه

تغییر الگوی تخمیر شکمبه‌ای با کمک افزودنی‌های خوراکی، یک استراتژی مهم در جهت بهبود بازدهی تولید در نشخوارکنندگان در دهه‌های اخیر بوده است. اثبات شده‌است که آنتی‌بیوتیک‌ها به‌عنوان افرودنی خوراکی می‌توانند مانع اتلاف انرژی و نیتروژن موجود در خوراک به‌دنبال مصرف آن‌ها توسط نشخوارکنندگان گردند (McGuffey *et al.*, 2001). اما اخیراً استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در خوراک دام، نگرانی‌هایی را در خصوص ورود باقیمانده‌های آن‌ها به شیر و سایر فرآورده‌های دامی برای پرورش‌دهندگان دام ایجاد کرده‌است که در نتیجهٔ آن، مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در اتحادیهٔ اروپا ممنوع شده‌است (Russel and Houlihan, 2003). از این‌رو متخصصین حوزهٔ تغذیهٔ دام، تمایل بیشتری به‌سمت استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیکی همچون گیاهان دارویی و عصاره‌های مختلف آن‌ها پیدا کرده‌اند. به‌طوری‌که یافته‌های مطالعات اخیر درخصوص استفاده از گیاهان دارویی، منجر به بهبود در الگوی تخمیر شکمبه‌ای نیز شده‌است (Kamra, 2005; Wanapat *et al.*, 2008).

گاوزبان اروپایی، گیاهی یکساله و متعلق به خانوادهٔ بوراژیناسه (Boraginaceae) می‌باشد که مصارف دارویی فراوانی برای آن ذکر شده‌است. در مطالعه‌ای مواد مؤثره‌ای همچون بتاکاریوفیلن (۲۶ درصد)، P-cymene-8-ol (۱۹/۷ درصد)، نونادکان (۰/۷ درصد) و هگزانول (۰/۷ درصد) در روغن دانهٔ گاوزبان اروپایی شناسایی و گزارش شد (Pieszak *et al.*, 2012). همچنین ترکیباتی همچون منوترپن‌ها (۱۷/۲ درصد) و سزکوئی‌ترپن‌ها (۲۶ درصد) در روغن دانهٔ این گیاه شناسائی شده‌است (Pieszak *et al.*, 2012). از طرف دیگر اسیدهای چربی همچون گاما لینولنیک اسید (۲۸-۱۰ درصد)، اسید لینولئیک (۴۰-۳۵ درصد)، آلفا لینولنیک اسید (۵-۴ درصد)، اولئیک اسید (۱۶/۳ درصد) و اوروسیک اسید (۲/۹ درصد) از روغن این گیاه استخراج شده‌است (Barre and Holub, 1992; Pieszak *et al.*, 2012). همچنین گزارش شده‌است که اندام‌های هوایی گاوزبان اروپایی دارای آلکالوئیدهای پیرولیزیدین بوده که اثرات سمی بر بافت پارانشیمی سلول‌های کبدی دارند و اثرات ضد سرطانی آن‌ها روی سایر حیوانات بررسی شده‌است (Pieszak *et al.*, 2012). برگ‌های گاوزبان اروپایی نیز حاوی اسیدهای آلی، موکوس، کاروتن و مقادیر کمتری نیترات پتاسیم می‌باشد (Duke, 2000).

لازم به ذکر است که روغن‌های گیاهی، سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع بوده و تغییر در الگوی تخمیر شکمبه‌ای در نتیجهٔ مصرف آن‌ها بستگی به پروفیل اسیدهای چرب موجود در آن، منشأ و درجهٔ اشباعیت آن‌ها دارد (Jenkins, 1993). وجود لینولئیک اسید و گاما لینولنیک اسید در روغن دانهٔ گاوزبان اروپایی هم، به‌نظر می‌رسد که از اهمیت ویژه‌ای در تأمین اسیدهای چرب غیراشباع در بدن نشخوارکنندگان برخوردار باشد (Szumacher-Strabel *et al.*, 2009). بایستی توجه کرد که اسیدهای چرب غیراشباع، بسیار سمی‌تر از اسیدهای چرب اشباع بوده و با قدرت بیشتری می‌توانند از فعالیت‌های تخمیری در شکمبه جلوگیری به‌عمل آورند (Jenkins, 1993). از روغن‌های غیراشباع (عمدتاً لینولئیک اسید) اغلب به‌عنوان مکمل غذایی برای افزایش غلظت مواد حدواسط در بیوهیدروژناسیون و

متعاقباً افزایش اسیدلینولئیک مزدوج (conjugated linoleic acid) و واکسینیک اسید در فرآورده‌های نشخوارکنندگان استفاده می‌شود (Szumacher-Strabel *et al.*, 2009). در این بین کاهش تولید متان از آن جهت با اهمیت می‌باشد که تولید آن در نشخوارکنندگان می‌تواند ۱۲-۲ درصد از انرژی خام موجود در خوراک را هدر دهد (Johnson and Johnson, 1995)، علاوه بر این متان از زمرهٔ گازهای گلخانه‌ای بوده که ۲۳ برابر بیشتر از دی‌اکسیدکربن می‌تواند باعث گرمتر شدن کرهٔ زمین گردد (IPCC, 2001). در این خصوص اعلام شده که در واقع باکتری‌های متانوژنز موجود در شکمبه، هیدروژن تولیدشده در اثر تخمیر را مصرف می‌کنند تا از این طریق بتوانند تولید متان را جایگزین تولید دی‌اکسیدکربن نمایند (Morgavi *et al.*, 2010).

با توجه به این‌که اطلاعات مستندی در خصوص تأثیر روغن حاصله از گیاه کامل گاوزبان اروپایی بر پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای گزارش نشده‌است، از این‌رو این مطالعه با هدف بررسی اثر روغن خام استخراج‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی در مرحلهٔ گلدهی بر برخی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

- نحوهٔ استخراج روغن خام از گیاه مورد آزمایش: بدین منظور نمونهٔ کاملی از گیاه گاوزبان اروپایی (*Borago officinalis* L.) در زمان گلدهی و در اوایل تابستان ۱۳۹۷ از گلخانهٔ آموزشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام (مجهز به سیستم سرمایشی-گرمایشی اکونوپک گلخانه‌ای) جمع‌آوری و بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام انتقال داده شد. نمونه‌ها در داخل آون (Behdad Co., Iran) با دمای ۶۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. روغن خام نمونه‌های خشک‌شده (شامل ساقه، برگ و گل گیاه مذکور)، پس از آسیاب (Wiley mill, Arthur H Thomas, Philadelphia, USA) به ذراتی با قطر ۲ میلی‌متر، با کمک دستگاه سوکسله (بخشی، ایران) استخراج شده (AOAC, 1999) و در لوله‌های مخصوص ریخته شد. همهٔ روغن خام گیاهی تهیه‌شده بدین شکل، تا انجام مراحل بعدی آزمایش در یخچال با دمای ٤ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند.

-پروتکل‌های آزمایشگاهی: خوراک گرمخانه‌گذاری‌شده در محیط کشت (جدول ۱)، بر اساس احتیاجات تغذیه‌ای یک برهٔ پرواری شش ماههٔ بلوچی با وزن تقریبی معادل ۳۸ کیلوگرم تهیه شد (NRC, 2007). برای تهیهٔ مایع شکمبه از دو رأس برهٔ نر بلوچی (۳۰/۵±۳ کیلوگرم) دارای فیستولای شکمبه‌ای که با یک خوراک در حد نگه‌داری (شامل کاه جو و یک کنسانتره تجاری با انرژی معادل ۱۰/۱۵ مگاژول/کیلوگرم ماده خشک) تغذیه می‌شدند، استفاده شد. محلول‌های آماده‌شده برای آزمون تولید گاز و تعیین تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی با نسبت دو به یک با مایع شکمبه مخلوط شدند (Menke and Steingass, 1988). ثبت فشار و حجم گاز به‌صورت منظم در زمان‌های ۳، ٦، ۹، ۱۲، ۲٤، ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت دورهٔ گرمخانه‌گذاری انجام شد (Theodorou *et al.*, 1994).

جدول ۱- اجزای تشکیل‌دهندهٔ خوراک تهیه‌شده جهت گرمخانه‌گذاری در محیط کشت ثابت

اجزاء تشکیل‌دهندهٔ خوراک	مقدار (درصدی از ماده خشک خوراک)
جو	۲۰
ذرت	۲۰
تفالهٔ چغندرقند	٦
کنجالهٔ سویا	٦
کنجالهٔ تخم پنبه	٦
سبوس گندم	٥
یونجهٔ خشک	۱۱
سیلاژ ذرت	۱۱
کاه جو	۸
اکسید منیزیم	۱/٥
مکمل ویتامینی- معدنی[۱]	۱/٥
بیکربنات سدیم	۱/٥
نمک	۱/٥
کربنات کلسیم	۱
ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهندهٔ خوراک	
الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (درصد)	۳۲/۱
خاکستر (درصد)	۱۲/٤
چربی خام (درصد)	۲/۷
پروتئین خام (درصد)	۱٥/۲
کربوهیدرات‌های غیر الیافی (درصد)	۳۹/۸
انرژی قابل متابولیسم (مگاکالری در هر کیلوگرم ماده خشک)	۲/۳٤
کلسیم (درصد)	۰/۷۲

۱-حاوی۳ درصد کلسیم، ۱/۲ درصد فسفر، ٤ درصد سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم مس، ٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم ید، ٦۰ میلی‌گرم در کیلوگرم کبالت، ۱۱۰۰۰ میلی‌گرم منیزیم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم منگنز، ۲۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم روی و ۳۰۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آهن، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۲۰ میلی‌گرم ویتامین B_2، ٤۰۰۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی در کیلوگرم ویتامین D می‌باشد.

مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از خوراک تهیه‌شده مطابق جدول ۱، پس از آسیاب شدن (Wiley mill, Arthur H Thomas, Philadelphia, USA) با قطر ابعاد یک میلی‌متری، به‌داخل شیشه‌های با حجم ۱۲۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس روغن گاوزبان اروپایی استخراج‌شده، در مقادیر صفر میلی‌گرم/میلی‌لیتر محیط کشت (به عنوان تیمار شاهد) و ۰/۱۵، ۰/۳۰ و ۰/۴۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر (به‌عنوان تیمارهای تجربی) به شیشه‌های مربوطه اضافه گردید. در ادامه مقدار ۳۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی همراه با مایع شکمبه (به‌ترتیب با نسبت ۲ به ۱) به‌داخل شیشه‌ها ریخته شد. بلافاصله درب آن‌ها با کمک درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی بسته شده و به حمام آب گرم با حرارت ۳۹ درجهٔ سلسیوس انتقال داده شدند (لازم به ذکر است که برای هر سطح از روغن مورد استفاده، ٤ تکرار در نظر گرفته شد). پس از اتمام زمان ۹٦ ساعتهٔ دورهٔ گرمخانه‌گذاری، درب شیشه‌ها باز و بلافاصله محتوای هضم‌نشدهٔ هر شیشه با پارچه پلی‌استری (قطر ٤٥ میکرون) صاف و به‌داخل بوته‌های چینی از قبل توزین‌شده انتقال داده شد تا پس از خشک شدن کامل نمونه‌ها، درصد تجزیه‌پذیری ماده خشک تعیین گردد. در ادامه پس از خاکستر کردن نمونه‌های داخل بوته‌های چینی در دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس طی مدت زمان ٤ ساعت، درصد تجزیه‌پذیری ماده آلی نیز محاسبه شد. درصد تجزیه‌پذیری الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی (neutral detergent fiber; NDF) نیز پس از تعیین میزان NDF در نمونهٔ خوراکی گرمخانه‌گذاری‌شده و شستشوی باقی‌ماندهٔ خوراک پس از اتمام زمان گرمخانه‌گذاری ۹٦ ساعته با محلول شویندهٔ خنثی، تعیین شد. لازم به ذکر است که برای تعیین درصد تجزیه‌پذیری NDF نیز چهار شیشهٔ مجزا در نظر گرفته شد. همچنین pH محتویات داخل شیشه‌ها نیز بلافاصله بعد از صاف شدن، به‌کمک pHمتر (Metrohm model 691, Herisau, Switzerland) تعیین شد. در ادامه ۵ میلی‌لیتر از نمونهٔ صاف‌شده همراه با ۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و تا زمان اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی به‌کمک دستگاه کجلدال (بخشی، V40، ایران) در فریزر با دمای ۱۸- درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند (Komolong *et al.*, 2001).

نمونه‌گیری از محیط کشت و ذخیره‌سازی آن‌ها برای اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل بر اساس روش‌های توصیه شدهٔ گتاچیو و همکاران انجام شد (Getachew *et al.*, 2004) و در نهایت تعیین مقدار اسیدهای چرب فرار کل به‌کمک دستگاه مارخام شیشه‌ای (Schott Duran, Germany) انجام شد (Barnett and Reid, 1957). همچنین تعداد ٤ شیشهٔ مجزا برای هر یک از مقادیر روغن خام گیاهی استفاده‌شده برای اندازه‌گیری مقدار متان تولیدشده در نظر گرفته شد که بدین منظور پس از ثبت حجم گاز تولیدی در انتهای زمان ۲٤ ساعته دورهٔ گرمخانه‌گذاری، مقدار ٤ میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار (Merck, Germany) به محتوای هر یک از شیشه‌ها اضافه گردید. در حقیقت با تزریق سود ۱۰ مولار (Merck, Germany)، گاز دی‌اکسید کربن توسط آن جذب شده و در نهایت حجم گاز باقی‌مانده در هر شیشه به‌عنوان حجم گاز متان اندازه‌گیری شد (Fievez *et al.*, 2005).

از روش مشابه تکنیک تولید گاز (با استفاده از تعداد ٤ شیشهٔ مجزا از آزمون تولید گاز) جهت تعیین

ضریب تفکیک‌پذیری و تودهٔ میکروبی تولیدشده استفاده شد (Menke and Steingass, 1988)، به‌طوری‌که پس از اتمام زمان ۹۶ ساعتهٔ دورهٔ گرمخانه‌گذاری، درب شیشه‌ها باز و محتویات آن‌ها به‌داخل ارلن‌های مخصوص ریخته شده و پس از شستشو با محلول شویندهٔ خنثی به‌مدت یکساعت در دمای ۱۰۰ درجهٔ سلسیوس، بقایای ماده خشک آن‌ها جهت تعیین میلی‌گرم سوبسترای تجزیه شدهٔ حقیقی جمع‌آوری شده و در نهایت با سوزاندن این بقایا در کوره با دمای ۵۵۰ درجهٔ سلسیوس به مدت ٤ ساعت، مقدار ماده آلی تجزیهٔ شدهٔ حقیقی نیز محاسبه شد (Vercoe *et al.*, 2010).

ضریب تفکیک‌پذیری (partitioning factor) نیز از تقسیم میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شدهٔ حقیقی بر میلی‌لیتر گاز تولیدشده در زمان ۹۶ ساعتهٔ دورهٔ گرمخانه‌گذاری (رابطهٔ ۱) محاسبه شد (Vercoe *et al.*, 2010; Makkar, 2010):

رابطهٔ ۱:

PF=TDOM/IVGF

در رابطهٔ مذکور، TDOM (true degradation of organic matter) معادل ماده آلی تجزیه‌شدهٔ حقیقی پس از اتمام یک دورهٔ ۹۶ ساعتهٔ گرمخانه‌ای بوده و همچنین در این رابطه، IVGP (*in vitro* gas production) معادل گاز تجمعی تولیدشده در زمان ۹۶ ساعتهٔ دورهٔ گرمخانه‌گذاری می‌باشد.

همچنین تودهٔ میکروبی تولیدشده (microbial mass yield; MMY) نیز بر اساس رابطهٔ ۲ محاسبه شد که در این رابطه NGP (net gas production) معادل میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون و عدد ثابت ۲/۲ نیز ضریب استوکیومتری بود (Makkar, 2010):

رابطهٔ ۲:

MMY (میلی‌گرم) = سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (میلی‌گرم)- [NGP (میلی‌لیتر) × ۲/۲]

راندمان سنتز تودهٔ میکروبی هم از تقسیم مقدار محاسبه‌شده برای تودهٔ میکروبی تولیدی بر مادهٔ آلی حقیقی هضم‌شده، محاسبه شد.

از طرف دیگر برای شمارش جمعیت پروتوزوآ، پنج میلی‌لیتر از مایع شکمبه به پنج میلی‌لیتر محلول فرمالین ۵۰ درصد اضافه شد. سپس دو قطره رنگ سبز درخشان به آن اضافه و به‌خوبی تکان داده شد. ٢٤ ساعت بعد از اضافه کردن رنگ، شمارش پروتوزوآ با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ×۱۰۰) و لام نئوبار در آزمایشگاه مرکز بهداشت خلیل‌آباد انجام شد (Dehority, 2003).

- **تحلیل آماری داده‌ها:** از مدل آماری $Yij=\mu+Ti+eij$ در این پژوهش استفاده شد که در آن Y_{ij}= مقدار هر مشاهده، μ= میانگین کل، T_i= اثر تیمار و e_{ij}= خطای آزمایش بود. همچنین داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌کمک نرم‌افزار SAS (نسخهٔ ۹/۱) آنالیز شدند. اختلاف آماری بین تیمارها در سطح ۵ درصد و با استفاده از آزمون دانکن تعیین شد. داده‌های حاصله از آزمون گاز نیز بر اساس معادلهٔ $Y = b(1 - e^{-ct})$ آنالیز شدند که در آن، Y= حجم گاز تولیدی در زمان t، b= گاز تولیدشده از بخش دارای پتانسیل تولید گاز پس از ۹۶ ساعت گرمخانه‌گذاری (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده‌خشک)، c= ثابت نرخ تولید گاز برای مقدار b (میلی‌لیتر در ساعت) و t= مدت زمان

گرمخانه‌گذاری (ساعت) می‌باشد (Ørskov and McDonald, 1979).

یافته‌ها

میزان نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآ تحت تأثیر افزودن روغن گاوزبان به محیط کشت قرار نگرفتند ولی در مقابل pH محیط کشت با افزایش سطوح روغن و نیز غلظت اسیدهای چرب فرار کل، به‌ترتیب کاهش (خطی، p=۰/۰٤) و افزایش (خطی، p=۰/۰۰۰٦) معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند (جدول ۲).

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف روغن استحصال‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی بر برخی فراسنجه‌های تخمیری*

میزان افزوده‌شده از روغن (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	مقدار پروتوزوآی کل (۱۰^۵/میلی‌لیتر)	میزان اسیدهای چرب فرارکل (میلی‌مول/لیتر)	pH	میزان نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر)
صفر (شاهد)	٤/۳۲	۲۹/۷۵^{c}	٦/۷۲^{ab}	۳۵/۲۷
۰/۱۵	٤/۲۲	۳۳/۸۷^{b}	٦/۷٦^{a}	۳۲/۲۵
۰/۳۰	۳/٦٤	۳۵/٦۲^{ab}	٦/٦۹^{ab}	۳۲/۹٦
۰/٤۵	۳/۷۲	۳۸/۰۰^{a}	٦/٦٤^{b}	۳۱/۱۲
خطای استاندارد میانگین	۰/۲۷	۱/۲۷	۰/۰۳	۱/۳٤
سطح معنی‌داری				
خطی	۰/۰۷	۰/۰۰۰٦	۰/۰٤	۰/۰۸
درجه دو	۰/۷۳	۰/۵۰	۰/۱۳	۰/٦۷
درجه سه	۰/۳۵	۰/٦۱	۰/۳۷	۰/۳۱

a,b,c :حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر معنی‌داری بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

* کلیهٔ فراسنجه‌های تخمیری ارائه‌شده در این جدول بعد از اتمام زمان ۹٦ ساعت گرمخانه‌گذاری محاسبه شده‌اند.

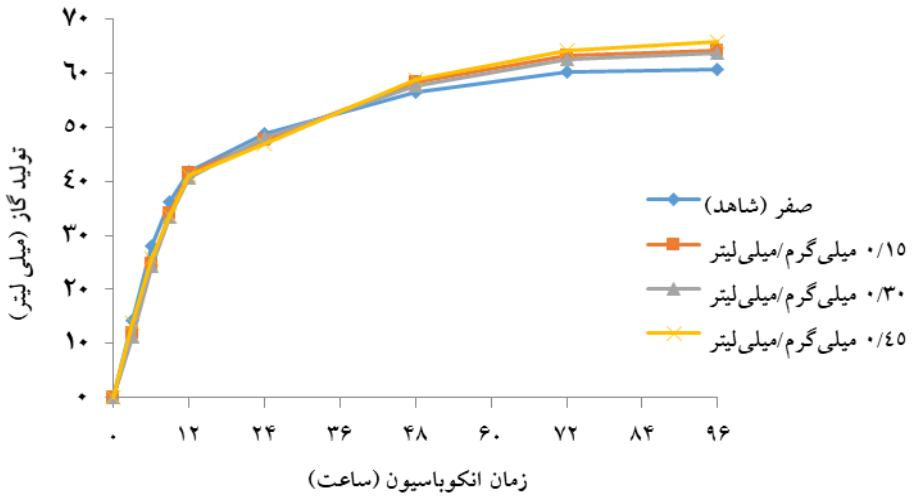
همچنین مشخص گردید که در اثر افزودن سطوح مختلف روغن گاوزبان اروپایی به محیط کشت، تغییری در مقدار فراسنجه‌های تولید گاز (شامل تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲، ۲٤، ٤۸ و ۷۲ ساعت بعد از گرمخانه‌گذاری و پتانسیل تولید گاز) به استثنای ثابت نرخ تولید گاز ایجاد نشده‌است. هر چند که در مقابل، ثابت نرخ تولید گاز و تولید متان، کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (جدول ۳). طبق نمودار ۱ روند تولید گاز در کلیهٔ تیمارها تقریباً مشابه یکدیگر بود.

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف روغن استحصال‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی بر برخی فراسنجه‌های تولید گاز و متان تولیدی در دورهٔ گرمخانه‌گذاری

میزان افزوده‌شده از روغن (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	میزان تولید متان[1] (میلی‌لیتر)	پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر)	ثابت نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر/ساعت)	میزان گاز تولیدی بعد از ۲٤ساعت (میلی‌لیتر)	میزان گاز تولیدی بعد از ۲٤ساعت (میلی‌لیتر)	میزان گاز تولیدی بعد از ٤۸ساعت (میلی‌لیتر)	میزان گاز تولیدی بعد از ۷۲ساعت (میلی‌لیتر)
صفر (شاهد)	۱۳/۸۹[a]	۵۸/٤۹	۰/۱۰[a]	٤۱/۷۲	٤۸/۷۷	۵٦/۵۰	٦۰/۲۱
۰/۱۵	۱۱/۷۹[b]	٦۱/۷۸	۰/۰۸۱[b]	٤۱/۵۲	٤۷/۷۲	۵۸/۳۵	٦۳/۱۷
۰/۳۰	۱۰/۷۳[b]	٦۱/۰۱	۰/۰۸۱[b]	٤۰/٦۵	٤۸/۰۵	۵۷/۵۷	٦۲/۵۵
۰/٤۵	۹/۷٦[b]	٦۲/٦۹	۰/۰۸۰[b]	٤۱/۰۵	٤۷/۰۰	۵۸/۹٤	٦٤/۳۲
خطای استاندارد میانگین	۰/٦٤	۱/۹٦	۰/۰۰۱	۱/۳۵	۱/٦٦	۱/۹۸	۱/۹۲
سطح معنی‌داری							
خطی	۰/۰۰۰۵	۰/۲۰	<۰/۰۰۰۱	۰/٦٤	۰/۵۱	۰/٤۷	۰/۲۰
درجه دو	۰/۳۹	۰/٦۹	<۰/۰۰۰۱	۰/۸۳	۰/۹۹	۰/۹۰	۰/۷٦
درجه سه	۰/۷٤	۰/٤۷	۰/۰۱	۰/۷۵	۰/۷۲	۰/٦۰	۰/۵۰

a,b: حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

[1]گاز متان تولیدی پس از اتمام زمان ۲٤ ساعت از دورهٔ گرمخانه‌گذاری محاسبه شده‌است.



نمودار ۱- روند تولید گاز ناشی از افزودن سطوح مختلف روغن گاوزبان اروپایی به محیط کشت ثابت

همچنین مطابق جدول ٤ تغییری در ضریب تفکیک‌پذیری، تولید تودهٔ میکروبی و راندمان سنتز تودهٔ میکروبی در اثر افزودن روغن گاوزبان اروپایی به محیط کشت ایجاد نشد، ولی در مقابل تجزیه‌پذیری ماده خشک (p=۰/۰۰۰۵)، ماده آلی (p=۰/۰۰۰۲) و الیاف نامحلول در شوینده‌ٔ خنثی (p=۰/۰۰۳) در تیمارهای حاوی روغن (به‌ویژه در تیمار ۰/٤٥ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) افزایش معنی‌داری نشان دادند.

جدول ٤- تأثیر سطوح مختلف روغن استحصال‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی بر تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی، الیاف نامحلول در شوینده‌ٔ خنثی و برخی فراسنجه‌های میکروبی*

میزان افزوده‌شده از روغن (میلی‌گرم/میلی‌لیتر)	تجزیه‌پذیری ماده خشک (درصد)	تجزیه‌پذیری ماده آلی (درصد)	تجزیه‌پذیری الیاف نامحلول در شوینده‌ٔ خنثی (درصد)	ضریب تفکیک‌پذیری (میلی‌گرم ماده آلی حقیقی هضم‌شده/میلی‌لیتر گاز تولیدشده)	تودهٔ میکروبی تولیدی (میلی‌گرم/۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و بافر)	بازده سنتز تودهٔ میکروبی (درصد)
صفر (شاهد)	۷۵/۵۹^{c}	۷۹/۰۵^{c}	۵۵/۸۹^{c}	۳/۰۳	۵۰/۰٦	۲۷/۲۹
۰/۱۵	۷۵/۵۲^{bc}	۸۳/٦۹^{b}	۵۷/٤۰^{bc}	۲/۸۷	٤۹/۸٦	۲۷/۰۵
۰/۳۰	۸۲/٦٦^{ab}	۸٦/۱۱^{ab}	٦۰/٦٦^{ab}	۲/۹۲	۵۱/٦۳	۲۷/۹۵
۰/٤٥	۸٤/۲۰^{a}	۸۷/٦۰^{a}	٦۲/۳۰^{a}	۲/۸۲	٤۹/۱۳	۲٦/۵٦
خطای استاندارد میانگین	۱/۳۹	۱/۱٦	۱/۳۷	۰/۰۹	۱/۵۰	۰/۸۱
			سطح معنی‌داری			
خطی	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۳	۰/۱۷	۰/۸۸	۰/۷۲
درجه دو	۰/٤۰	۰/۲۰	۰/۹٦	۰/۷۸	۰/٤٦	۰/٤۹
درجه سه	۰/۹۰	۰/۸۰	۰/۵۹	۰/۳۵	۰/۳۷	۰/۳۷

a,b,c حروف غیرمشابه در هر ستون بیانگر معنی‌دار بودن اختلاف بین میانگین‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

* کلیهٔ پارامترهای ارائه‌شده در این جدول بعد از اتمام زمان ۹٦ ساعت گرمخانه‌گذاری محاسبه شده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

در این مطالعه، افزودن روغن بالنگو منجر به تغییر برخی پارامترهای تخمیری همچون افزایش اسیدهای چرب فرار کل و یا کاهش pH محیط کشت به‌ویژه در سطوح بالاتر روغن (۰/٤٥ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) شد. اثرات عصاره‌های روغنی بیشتر بستگی به ترکیبات موجود در آن‌ها دارد (Patra and Saxena, 2009). از آنجایی‌که روغن حاصله از گاوزبان اروپایی غنی از اسید چرب لینولئیک می‌باشد، گزارش شده‌است که روغن‌های دارای اسید لینولئیک زیاد، معمولاً به‌عنوان مهارکننده‌های تخمیر شکمبه‌ای عمل کرده به‌طوری‌که می‌توانند بر هضم کربوهیدرات‌ها تأثیر بگذارند و معمولاً به‌دنبال آن تولید اسیدهای چرب فرار کاهش یافته و نیز نسبت استات به پروپیونات نیز کاهش می‌یابد (Doreau and Chilliard, 1997) که این موارد در تناقض با نتایج تحقیق حاضر می‌باشد. اما در مطالعه‌ای مشخص شده که استفاده از ۵ درصد روغن دانهٔ گاوزبان اروپایی در جیره، تأثیر منفی بر پروسهٔ تخمیر در محیط کشت نداشته است (Szumacher-Strabel *et al.*, 2009) که این یافته در تطابق با نتایج

مطالعهٔ حاضر می‌باشد (جدول ۲). شاید علت این اثرات ضد و نقیض در بین نتایج محققین با نتایج ما، مربوط به استفاده از سطوح متفاوت روغن در جیره و یا ترکیب متفاوت روغن استخراج‌شده از گاوزبان اروپایی با توجه به شرایط مختلف آب و هوایی و منطقه‌ای باشد و نیز به‌نظر می‌رسد که در مطالعهٔ فعلی سطح مورد استفاده از روغن در حدی نبوده که بتواند اثر منفی بر شرایط تخمیر در محیط کشت داشته باشد (جدول ۲).

همچنین در مطالعهٔ حاضر تمایل برای کاهش در جمعیت پروتوزوآ (خطی، p=۰/۰۷) و نیتروژن آمونیاکی (خطی، p=۰/۰۸) در تیمارهای دارای روغن گیاه گاو-زبان اروپائی مشاهده گردید (جدول ۲). در این خصوص گزارش شده‌است که کاهش جمعیت پروتوزوآ می‌تواند با کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی همراه باشد (Hristov *et al.*, 2005). البته گزارشات متناقض متعددی در خصوص تأثیر افزودن روغن‌های مختلف بر میزان نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای وجود دارد، به‌طوری‌که در برخی مطالعات، هیچ اثری از روغن بر غلظت نیتروژن آمونیاکی مشاهده نشده‌است (Jalc *et al.*, 2005)، درحالی‌که برخی هم کاهش (Doreau *et al.*, 1991) و برخی دیگر نیز افزایش در غلظت نیتروژن آمونیاکی را گزارش کرده‌اند (Jalc and Cresnakova, 2002). اگرچه که در مطالعهٔ حاضر تک تک اسیدهای چرب فرار اندازه‌گیری نشد ولی گزارش شده که تولید متان در شکمبه معمولاً با افزایش تولید پروپیونات و کاهش نسبت استات به پروپیونات همراه می‌باشد (Russel, 1998). اگرچه که در مطالعه‌ای شمار پروتوزآی هولوتریش و اسپیروتریش‌ها در اثر افزایش سطوح روغن نعنا فلفلی (به‌دلیل وجود برخی ترکیبات شیمیایی مشترک با روغن گاوزبان) به محیط کشت، کاهش معنی‌داری پیدا کردند (Agarwal *et al.*, 2009)، ولی در مطالعهٔ حاضر، افزودن سطوح مختلف روغن گاوزبان اروپایی به محیط کشت، تأثیر معنی‌داری بر جمعیت کل پروتوزوآ نداشت.

در مطالعاتی که با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی انجام شد، حضور بسیاری از ترکیبات مؤثره همچون اسیدهای فنولیک (همچون وانیلیک اسید، P-کوماریک اسید، P-هیدروکسی بنزوئیک، جنتیسیک اسید، کافئیک اسید و رزمارینیک اسید)، اسکوپولتین و فلاوونوئیدها (همچون کوئرستین، ایزورامنتین و کامفرول) در روغن دانهٔ گاوزبان اروپایی شناسایی شده‌است (Gudej and Tomczyk, 1996; Pieszak *et al.*, 2012). علاوه بر این شاخ و برگ گاوزبان اروپایی حاوی ۲۰ درصد ترکیبات موکوسی، ۵-۳ درصد تانن، نمک‌های معدنی (شامل ۲/۲-۱/۵ درصد سیلیکای محلول، ۳ درصد نیترات کلسیم و پتاسیم)، اسیدهای آلی (شامل اسید آسکوربیک، اسید مالیک، اسید سیتریک، اسید استیک و لاکتیک اسید)، ساپونین‌ها، الانتوئین (۱-۰/۵ درصد)، ویتامین‌ها، کولین، بورنزیتول، ترکیبات سیانوژنیک (۱۵ میلی‌گرم/کیلوگرم) و توکوفرول‌ها می‌باشد (Guarrera *et al.*, 2006; Mhamdi *et al.*, 2009; Pieszak *et al.*, 2012).

عصاره‌های روغنی عمدتاً ترکیبی از چند نوع ترکیب مختلف از جمله ترپن‌ها، فنیل پروپانوئیدها و سایر موادی هستند که با هدف‌های مختلفی کاربرد دارند، به‌طوری‌که در دهه‌های اخیر، مطالعات متعددی برای ارزیابی ویژگی ضد باکتریائی آن‌ها انجام شده‌است (Jansen *et al.*, 1987; Ricci *et al.*, 2005). همچنین

گزارش شده که، زمانی استفاده از آن‌ها در تغذیهٔ نشخوارکنندگان سودمند خواهد بود که استفاده از سطوح مربوطه علاوه بر داشتن اثرات مثبت و سازنده، نتیجهٔ سوئی بر تخمیر شکمبه‌ای نداشته باشند (Conner, 2003). در مطالعه‌ای هم، گزارش شده که عصاره‌های روغنی در صورتی دارای اثرات مثبت هستند که بتوانند شرایط تخمیر را در شکمبه در جهت تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار کل (به‌ویژه افزایش تولید پروپیونات و کاهش تولید استات) و تولید کمتر نیتروژن آمونیاکی تغییر دهند (Castillejos *et al.*, 2008). در مطالعهٔ حاضر تمایل برای کاهش نیتروژن آمونیاکی (p=۰/۰۸) در اثر افزایش سطوح مختلف روغن گاوزبان اروپایی به محیط کشت وجود داشت (جدول ۲). البته مطالعات متعددی هم نشان داده که اغلب روغن‌های گیاهی که از دوزهای بالای آن‌ها (۳۰۰۰ تا ۵۰۰۰ میلی‌گرم/لیتر) درمحیط کشت استفاده شده‌است، دارای اثرات مهارکنندگی تخمیر از طریق تأثیر بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها و متعاقباً کاهش تولید TVFA می‌باشند (Cardozo *et al.*, 2005; Busquet *et al.*, 2006; Castillejos *et al.*, 2006).

در مطالعهٔ کنونی، pH محیط کشت به‌صورت خطی (p=۰/۰٤) با افزایش سطح روغن گاوزبان اروپایی، کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲) ولی در مقابل در مطالعهٔ دیگری، اگرچه که میانگین pH مایع شکمبه بعد از مصرف خوراک توسط دام در شرایط حیوان زنده معادل ۷/۱ گزارش شد، ولی این pH تحت تأثیر افزودن اسانس به جیره قرار نگرفت (Newbold *et al.*, 2004)، که همسو نبودن این آزمایشات با یکدیگر، احتمالاً مربوط به اجرای متفاوت آن‌ها در شرایط *in vivo* و *in vitro* بوده و یا تفاوت در دز مصرفی روغن‌ها نیز باشد. در مطالعه‌ای، کاهش پروتوزوآ، کاهش نیتروژن آمونیاکی را به‌دنبال داشته است و عنوان شده که جمعیت پروتوزوآ اولین تولید کننده‌های آمونیاک در شکمبه محسوب می‌گردند (Francis *et al.*, 2002). در مطالعهٔ حاضر اگر چه تولید اسیدهای چرب فرار در تیمار ۰/٤٥ میلی‌گرم/میلی‌لیتر از روغن گیاهی، در بالاترین مقدار خود قرار داشت (جدول ۲)، ولی در مقابل pH محیط کشت نیز در این غلظت، در کمترین مقدار خود نسبت به تیمار شاهد بود که شاید افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار کل در محیط کشت (به‌دلیل ماهیت اسیدی بودن آن‌ها)، عامل اصلی کاهش pH در محیط کشت بوده است (جدول ۲).

گزارش شده‌است که کاهش تولید متان در اثر افزودن اسیدهای چرب غیراشباع به این معنی‌است که این اسیدهای چرب در طی فرآیند بیوهیدروژناسیون شکمبه‌ای، می‌توانند به‌عنوان پذیرندهٔ یون‌های هیدروژن عمل کرده و در نهایت هیدروژن را از دسترس باکتری‌های متانوژنز خارج کنند (Hegarty, 1999). همچنین اعلام شده که اسیدهای چرب غیراشباع با زنجیرهٔ بلند، ترکیبات غیرقابل تخمیر بوده و می‌توانند تولید گاز متان را در حجم کل گاز تولیدشده در شرایط *in vitro* کاهش دهند (Johnson and Johnson, 1995). با توجه به وجود اسیدهای چرب غیراشباع در روغن گاوزبان اروپایی، نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر هم در این خصوص (جدول ۳) در تطابق با گزارش مذکور می‌باشد. همچنین گزارش شده که کاهش تولید متان به‌دنبال کاهش جمعیت پروتوزوآ در نتیجهٔ افزودن چربی به جیره اتفاق می‌افتد (Sallam *et al.*, 2009). در

مطالعهٔ حاضر نیز تمایل برای کاهش جمعیت کل پروتوزوآ در اثر استفاده از روغن گاوزبان اروپایی وجود داشت و به‌دنبال آن تولید متان نیز کاهش معنی‌داری نشان داد (جدول ۳). در تطابق با گزارش ما، اعلام شده زمانی‌که روغن نارگیل به جیره اضافه می‌شود، تولید گاز متان نیز متعاقباً کاهش می‌یابد (Machmuller and Kreuzer, 1999). علی‌رغم کاهش تولید متان (جدول ۳) و یا تمایل برای کاهش جمعیت پروتوزوآ (جدول ۲) در مطالعهٔ حاضر، گزارش شده‌است که تولید متان زمانی‌که پروتوزوآ وجود داشته و یا جمعیت آن بیشتر شود، افزایش می‌یابد (Jouany and Lassalas, 1997). در مقابل اعلام شده‌است که تنها نسبت کوچکی از کل متان تولیدی مربوط به حضور متانوژنزهای مرتبط با پروتوزوآی مژکدار می‌باشد (Hes *et al.*, 2003).

ضریب تفکیک‌پذیری، شاخصی از بازدهی سنتز تودهٔ میکروبی در شرایط *in vitro* می‌باشد (Blummel *et al.*, 2003). علی‌رغم اینکه در مطالعه‌ای ضریب تفکیک‌پذیری که دلالت بر بازده تولید تودهٔ میکروبی دارد، با افزودن عصارهٔ روغنی به محیط کشت افزایش یافت (Pawar *et al.*, 2014)، ولی در مطالعهٔ ما (جدول ٤) سطوح مختلف روغن تأثیر معنی‌داری بر این ضریب نداشت. در مطالعهٔ فعلی، ضریب تفکیک‌پذیری در واقع حاصل تقسیم ماده آلی حقیقی هضم‌شده بر تولید تجمعی گاز بود و عدم تغییر در PF در تیمارهای مورد مطالعه بدین معنی است که سهم تقریباً مساوی از ماده آلی تجزیه‌شده در تولید تودهٔ میکروبی مشارکت داشته است و این به معنی عدم تغییر در بازده سنتز تودهٔ میکروبی در این مطالعه برای تیمارهای فوق می‌باشد. همچنین اگرچه که PF بالا همراه با کاهش متان در مطالعه‌ای مشاهده شد (Blummel *et al.*, 2003)، اما در مطالعهٔ ما عدم تغییر در PF (جدول ٤) همراه با کاهش در تولید متان (جدول ۳) در اثر افزودن روغن گاوزبان اروپایی مشاهده گردید. به‌خاطر شناسایی تعداد بی‌شماری از ترکیبات موثرهٔ فعال در روغن‌های گیاهی، مکانیسم‌های متنوعی در خصوص اثرات آن‌ها بر رشد و جمعیت باکتری‌ها گزارش شده‌است (Calsamiglia *et al.*, 2007). در مطالعه‌ای، مکمل‌کردن جیره با روغن ماهی منجر به کاهش باکتری‌های متانوژنز گردید (Van Nevel *et al.*, 1974). همچنین در مطالعهٔ دیگری افزودن روغن ماهی به جیره تأثیری بر قابلیت هضم الیاف خوراک در شکمبه نداشت (Keady and Mayne, 1999). کاهش باکتری‌های متانوژنز اغلب افزایش تولید پروپیونات را به‌دنبال داشته (Demeyer and Van Nevel., 1995) و در اغلب موارد متعاقباً کاهش تجزیه‌پذیری الیاف خام را به‌همراه خواهد داشت. در مطالعهٔ حاضر اگرچه تولید متان در هر کدام از سه سطح روغن گاوزبان اروپایی (جدول ۳)، کاهش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان داد ولی در مقابل تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی به‌ویژه در سطوح بالاتر روغن (۰/۳۰ و ۰/٤٥ میلی‌گرم/لیتر) افزایش معنی‌داری نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (جدول ٤). برخی محققین پیشنهاد می‌کنند که کاهش تولید متان در اثر افزودن چربی به جیره زمانی اتفاق خواهد افتاد که هضم فیبر خوراک کاهش یافته باشد (Johnson and Johnson, 1995).

به‌نظر می‌رسد که تأثیر عصاره‌های روغنی بر تجزیه‌پذیری نشاسته و یا پروتئین انتخابی باشد، به‌طوری‌که گروهی از محققین دریافتند که عصارهٔ

روغنی، نرخ تجزیه‌پذیری کنجالهٔ آفتابگردان و نخود سبز را کاهش داده اما تأثیری بر هضم کنجالهٔ سویا، پودر ماهی و دانه‌های لوبیا نداشت (Molero *et al.*, 2014). همچنین در گزارش دیگری، استفاده از عصارهٔ روغنی، نرخ تجزیه‌پذیری ماده خشک کنجالهٔ سویا را کاهش داده ولی تأثیری بر قابلیت هضم کنجالهٔ کلزا یا علوفهٔ خشک در شکمبهٔ گوسفندان نداشت (Newbold *et al.*, 2004). اگر چه که در مطالعهٔ حاضر از جیرهٔ کاملاً مخلوط‌شده و پرواری استفاده شد، ولی تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و NDF در اغلب تیمارهای دارای روغن گاوزبان اروپایی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان دادند.

در مجموع تحقیق حاضر نشان داد که که روغن استحصال‌شده از گیاه کامل گاوزبان اروپایی می‌تواند اکوسیستم شکمبه‌ای را دستخوش تغییرات مثبتی نماید، به‌طوری‌که غلظت اسیدهای چرب فرار کل، تجزیه‌پذیری ماده خشک، ماده آلی و الیاف نامحلول در شویندهٔ خنثی با افزودن روغن مذکور به محیط کشت، افزایش معنی‌داری در مقابل تیمار شاهد نشان دادند. همچنین روغن گاوزبان اروپایی توانست در هر یک از سطوح بکاررفتهٔ آن، تولید متان را کاهش دهد. از طرف دیگر تمایل برای کاهش جمعیت پروتوزوآ و نیتروژن آمونیاکی در نتیجهٔ افزایش سطوح روغن گل گاوزبان نیز وجود داشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد که کاربرد روغن گاوزبان اروپایی تا سطح ۰/۴۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بدون هیچ اثر منفی می‌تواند منجر به بهبود برخی پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای گردد. البته در خصوص تعیین اثرات روغن گاوزبان اروپایی بر سایر پارامترهای تخمیری و سایر جمعیت‌های میکروبی، نیاز به مطالعات گسترده‌تر و نیز تحقیق بر روی حیوان زنده هم می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی مصوب در شورای پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام بوده، بنابراین نویسندگان محترم مقاله از حمایت‌های مالی این مجتمع در جهت انجام این پژوهش تقدیر و تشکر می‌نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافعی ندارند.

منابع

- Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. and Kamra, D.N. (2009) Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. Animal Feed Science and Technology, 148(2-4): 321-327.
- AOAC. (1999). Official Methods of Analysis. 16th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Barnett, A.J.G. and Reid, R. (1957). Studies on the production of volatile fatty acids from grass in artificial rumen. 1. Volatile fatty acids production from fresh grasses. The Journal of Agricultural Science (Cambridge), 48(3): 315-321.

- Barre, D.E. and Holub, B.J. (1992). The effect of borage oil consumption on the composition of individual phospholipids in human platelets. Lipids, 27(5): 315-20.
- Blummel, M., Karsli, A. and Russel, J.R. (2003). Influence of diet on growth yields of rumen microorganisms in vitro and in vivo: Influence on growth yields of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition, 90(3): 625-634.
- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 89(2): 761-771.
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. Journal of Dairy Science, 90(6): 2580-2595.
- Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2005). Screening for the effects of natural plant extracts at two pH level on in vitro rumen microbial fermentation of a high-concentrate diet for beef cattle. Journal of Animal Science, 83(11): 2572-2579.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S. and Ferret, A. (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in in vitro systems. Journal of Dairy Science, 89(7): 2649-2658.
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J. and Ter Wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. Animal Feed Science and Technology, 145(1-4): 259-270.
- Conner, D.E. (1993). Naturally occurring compounds. In: Antimicrobials in Foods. Davidson, P.M. and Branen, A.L. editors. 2th ed., USA: New York, Marcel Dekker, pp: 441-468.
- Dehority, B.A. (2003). Rumen Microbiology. England: Nottingham University Press, pp: 372.
- Demeyer, D. and Van Nevel, C. (1995). Transformations and effects of lipids in the rumen: Three decades of research at Gent University. Archives of Animal Nutrition, 48(1-2): 119-134.
- Doreau, M. and Chilliard, Y. (1997). Digestion and metabolism of dietary fat in farm animals. British Journal of Nutrition, 78(1): S15-S35.
- Doreau, M., Legay, F. and Bauchart, D. (1991). Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. Journal of Dairy Science, 74(7): 2233-2242.
- Duke, J.A. (2000). Handbook of phytochemical constituents of grass herbs and other economic plants. 2nd ed., London: CRC Press, pp: 680.
- Fievez, V., Babaymo, O.J. and Demeyer, D. (2005). Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. Animal Feed Science and Technology, 123-124(1): 197-210.
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S. and Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: reviews. British Journal of Nutrition, 88(6): 587-605.
- Getachew, G., Robinson, P.H., DePeters, E.J. and Taylor, S.J. (2004). Relationships between chemical composition, dry matter degradation and in vitro gas production of several ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 111(1-4): 57-71.
- Guarrera, P.M., Salerno, G. and Caneva, G. (2006). Food, flavouring and feed plant traditions in the Tyrrhenian sector of Basilicata. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 37(2): 1-6.
- Gudej, J. and Tomczyk, M. (1996). Badania chromatograficzne zwiazkow polifenolowych w zielu Borago officinalis L. Herba Polonica, 42(4): 252-256.
- Hegarty, R.S. (1999). Reducing rumen methane emission through elimination of protozoa. Australian Journal of Agricultural Research, 50(8): 1321-1327.
- Hess, H.D., Kreuzer, M., Diaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E. and Solvia, C.R. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunated and defaunated fluid. Animal Feed Science and Technology, 109(1-4): 79-94.
- Hristov, A.N., Kennington, L.R., McGuire, M.A. and Hunt, C.W. (2005). Effect of diets containing linoleic acid or oleic acid rich oils on ruminal fermentation and nutrient digestibility, and

performance and fatty acid composition if adipose and muscle tissues of finishing cattle. Journal of Animal Science, 83(6): 1312-1321.
- IPCC. (2001). Climate Change 2001: The Scientific Basis. New York: Cambridge University Press.
- Jalc, D. and Ceresnakova, Z. (2002). Effect of plant oils and malate on rumen fermentation in vitro. Czech Journal of Animal Science, 47(3): 106-111.
- Jalc, D., Potkanski, A., Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A. and Certic, M. (2005). Effect of microbial oil, evening primrose oil and borage oil on rumen fermentation in vitro. Veterinary Medicine-Czech, 50(11): 480-486.
- Janssen, A.M., Scheffer, J.J. and Baerheim Svendsen, A. (1987). Antimicrobial activity of essential oils: a 1976-1986 Literature review. Aspects of the test methods. Planta Medica, 53(5): 395-398.
- Jenkins, T.C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 76(12): 3851-3863.
- Johnson, K.A. and Johnson, D.E. (1995). Methane emissions from cattle. Journal of Animal Science, 73(8): 2483-2492.
- Jouany, J.P. and Lassalas, B. (1997). Study of the adaptation of the rumen ecosystem to the antimethanogenic effect of monensin measured in vivo. Reproduction Nutrition Development, 37(1): 69-70.
- Kamra, D.N. (2005). Rumen microbial ecosystem. Current Science, 89(1): 124-135.
- Keady, T.W.J. and Mayne, C.S. (1999). The effects of level of fish oil inclusion in the diet on rumen digestion and fermentation parameters in cattle offered grass silage based diets. Animal Feed Science and Technology, 81(1-2): 57-68.
- Komolong, M.K., Barber, D.G. and McNeill, D.M. (2001). Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (Medicago sativa) with increasing levels of quebracho tannins. Animal Feed Science and Technology, 92(1-2): 59-72.
- Machmuller, A. and Kreuzer, M. (1999). Methane suppression by coconut oil and associated effects on nutrient and energy balance in sheep. Canadian Journal of Animal Science, 79(1): 65-72.
- Makkar, H.P.S. (2010). In vitro screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: In vitro screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants, Nuclear and related methodologies. Vercoe, P.E., Makkar, H.P.S. and Schlink, A.C. editors, USA: New York, Springer, pp: 107-144.
- McGuffey, R.K., Richardson, L.F. and Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionophores for dairy cattle: current status and future outlook. Journal of Dairy Science, 84(E. Suppl.): E194-E203.
- Menke, K.H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and in vitro gas production using rumen fluid. Animal Research Development, 28: 7-55.
- Mhamdi, B., Wannes, W.A., Bourgou, S. and Marzouk, B. (2009). Biochemical characterization of borage (Borago officinalis L.) seeds. Journal of Food Biochemistry, 33(3): 331-341.
- Molero, R., Ibars, A., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. Animal Feed Science and Technology, 114(1-4): 91-104.
- Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. Animal, 4(7): 1024-1036.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R. and Wallace, R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. Animal Feed Science and Technology, 114(1-4): 105-112.
- NRC. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. 6th ed., USA: Washington, National Academy Press, 384p.
- Ørskov, E.R. and McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agricultural Science, 92(2): 499-503.

- Patra, A.K. and Saxena, J. (2009). A review of the effect and mode of action of saponins on microbial population and fermentation in the rumen and ruminant production. Nutrition Research Reviews, 22(2): 204-219.
- Pawar, M.M., Kamra, D.N., Agarwal, N. and Chaudhary, L.C. (2014). Effects of essential oils on in vitro methanogenesis and feed fermentation with buffalo rumen liquor. Agricultural Research, 3(1): 67-74.
- Pieszak, M., Mikolajczak, P.L. and Manikowska, K. (2012). Borage (Borago officinalis L.) - A valuable medicinal plant used in herbal medicine. Herba Polonica, 58(4): 95-103.
- Ricci, D., Fraternale, D., Giamperi, L., Bucchini, A., Epifano, F., Burini, G., *et al*. (2005). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of Teucrium marum (Lamiaceae). Journal of Ethnopharmacology, 98(1-2): 195-200.
- Russell, J.B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. Journal of Dairy Science, 81(12): 3222-3230.
- Russell, J.B. and Houlihan, A.J. (2003). Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. FEMS Microbiology Reviews, 27(1): 65-74.
- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Brigide, P., Godoy, P.B., Vittii, D.M.S.S. and Abdalla, A.L. (2009). Efficiency of eucalyptus oil on in vitro ruminal fermentation and methane production. Nutritional and Foraging Ecology of Sheep and Goats, 85(1): 267-272.
- SAS Institute INC. (2002). Sas user's Guide: statistics. Statistical Analysis Systems Institute Inc. Cary NC.
- Szumacher-Strabel, M., Cieslak, A. and Nowakowska, A. (2009.) Effect of oils rich in linoleic acid on in vitro rumen fermentation parameters of sheep, goats and dairy cows. Journal of Animal and Feed Sciences, 18(3): 440-452.
- Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B. and France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. Animal Feed Science and Technology, 48(3-4): 185-197.
- Van Nevel, C.J., Prins, R.A. and Demeyer. D.I. (1974). On the inverse relationship between methane and propionate in the rumen. Zeitschrift fur Tierphysiologie, 33(3): 117-125.
- Vercoe, E.P., Makkar, H.P.S. and Schlink, A.C. (2010). In vitro screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. In: In vitro screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. Makkar, H.P.S. editor. USA: New York, Springer, pp: 107-144.
- Wanapat, M., Cherdthong, A., Pardee, P. and Wanapat, S. (2008). Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (Cymbopogon citrates Stapf.) powder supplementation. Journal of Animal Science, 86(12): 3497-3503.