تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۸
صفحه‌های ۴۷۳-۴۶۱

ترکیب شیمیایی و تأثیر خوشاریزه و پولیکاریا بر فراسنجه‌های تخمیر، متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه با روش برون‌تنی

سید محسن حسینی[۱]، جواد رضائی[۲*]، یوسف روزبهان[۳]
۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۶/۲۹

چکیده

مطالعه حاضر به‌منظور تعیین ترکیب شیمیایی خوشاریزه (گونه *sibthorpiana*) و پولیکاریا (گونه *dysenterica*)، و تأثیر گنجاندن گیاهان مذکور در جیره بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه و قابلیت هضم با روش برون‌تنی انجام شد. ترکیب شیمیایی گیاهان موردمطالعه با روش‌های استاندارد اندازه‌گیری و سطوح مختلف هر گیاه در جیره گنجانده شد. آزمون تولید گاز برون‌تنی با هفت تیمار (جیره شاهد، جیره‌های حاوی ۱۵، ۳۰ یا ۴۵ درصد خوشاریزه، و جیره‌های حاوی ۱۵، ۳۰ یا ۴۵ درصد پولیکاریا) و سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد که میزان پروتئین خام و قابلیت هضم ماده آلی خوشاریزه (به‌ترتیب ۱۰/۴ و ۶۱/۸ درصد) بیش‌تر از پولیکاریا (به‌ترتیب ۷/۸۵ و ۵۲/۵ درصد) بود (P<۰/۰۵). گنجاندن خوشاریزه در جیره، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز را افزایش داد، درصورتی‌که مصرف پولیکاریا فراسنجه‌های مذکور را کاهش داد (P<۰/۰۵). غلظت آمونیاک شکمبه‌ای با مصرف خوشاریزه در جیره کاهش یافت (P<۰/۰۵)، اما تحت تأثیر پولیکاریا قرار نگرفت. گنجاندن خوشاریزه و پولیکاریا در جیره، جمعیت پروتوزوا و تولید متان را کاهش داد (P<۰/۰۵). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شیرابه شکمبه با واردنمودن خوشاریزه و پولیکاریا در جیره افزایش یافت (P<۰/۰۵). براساس نتایج حاصل، استفاده از خوشاریزه تا ۴۵ درصد، و پولیکاریا تا ۳۰ درصد ماده خشک در جیره نشخوارکنندگان قابل‌توصیه است. به هر حال، در زمان تغذیه پولیکاریا در دام‌های پر تولید، نسبت علوفه به کنسانتره باید کاهش داده شود. از سوی دیگر، مصرف خوشاریزه و پولیکاریا موجب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه و کاهش آزادسازی متان به محیط زیست می‌شود.

کلیدواژه‌ها: پروتوزوا، تولید گاز، تولید متان، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت هضم، گیاه مرتعی.

Chemical composition and effect of *Echinophora sibthorpiana* and *Pulicaria dysenterica* on *in vitro* ruminal fermentation parameters, methane and antioxidant capacity

Sayyed Mohsen Hosseini[1], Javad Rezaei[2*], Yousef Rouzbehan[3]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
Received: May 5, 2019 Accepted: September 20, 2019

Abstract

The present study was conducted to determine the chemical composition of *Echinophora sibthorpiana* and *Pulicaria dysenterica* and the effect of dietary inclusions of these plants on *in vitro* ruminal fermentation parameters and digestibility. Chemical composition of the experimental plants was determined using standard methods and different levels of each plant were included in the diet. *In vitro* gas production technique was performed with seven treatments (control diet, diets containing 15, 30 or 45 percentage of *Echinophora* and diets containing 15, 30 or 45 percentage of *Pulicaria*) and three replicates. Results indicated that crude protein and organic matter digestibility (OMD) of *Echinophora* (10.4 and 61.8 percentage, respectively) were higher than *Pulicaria* (7.85 and 52.5 percentage, respectively) (P<0.05). Inclusion of *Echinophora* in the diet increased OMD and metabolizable energy, while using *Pulicaria* reduced these parameters (P<0.05). Ruminal ammonia decreased with inclusion of *Echinophora* in the diet (P<0.05), but it was not affected by *Pulicaria*. Dietary inclusions of *Echinophora* and *Pulicaria* decreased protozoa population and methane production (P<0.05). The ruminal antioxidant capacity was improved by inclusions of *Echinophora* and *Pulicaria* in the diet (P<0.05). Based on the results, the use of *Echinophora* up to 45 percentage and *Pulicaria* up to 30 percentage of diet dry matter is recommended in ruminants. However, the forage to concentrate ratio should be reduced when feeding *Pulicaria* in high-performance animals. On the other hand, using *Echinophora* and *Pulicaria* improves ruminal antioxidant capacity and reduces methane release to the environment.

Keywords: Antioxidant capacity, digestibility, gas production, methanogenesis, pasture fodder, protozoa.

* نویسنده مسئول Email: rezaei.j@modares.ac.ir

مقدمه

فرآیند تخمیر میکروبی در شکمبه با اتلاف انرژی به‌صورت متان، و اتلاف پروتئین به‌صورت آمونیاک همراه است و موجب آزادسازی آلاینده‌ها به محیط زیست می‌شود. بنابراین، لازم است بازده مواد مغذی با تغییر در اکوسیستم میکروبی شکمبه بهبود یابد. به این منظور، افزودنی‌های خوراکی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها، یونوفرها، مهارکننده‌های تولید متان و ترکیبات ضد پروتوزوایی در جیره استفاده شده، اما این افزودنی‌ها ممکن است برای حیوان میزبان مضر باشند و یا باعث ایجاد مقاومت میکروبی شوند [۱۶]. از سوی دیگر، شرایط اقلیمی حاکم و به‌ویژه کمبود منابع آب، موجب کاهش تولید علوفه‌های رایج (مانند یونجه و ذرت) در بسیاری از نقاط کشور شده است. در چنین شرایطی، شناسایی و استفاده بهینه از گیاهان بومی و مرتعی در تغذیه دام امری ضروری است. در این راستا باید گیاهانی را بررسی نمود که به شرایط محیطی سازگار باشند و ضمن دارابودن ارزش غذایی مناسب، به نهاده‌های کم‌تری نیاز داشته باشند [۲۳].

دامداران کشور هر ساله مقادیر قابل‌توجهی از گیاهان محلی را از مراتع جمع‌آوری کرده و به‌منظور تغذیه زمستانه دام‌ها انبار می‌نمایند. گونه‌های مرتعی معمولاً حاوی متابولیت‌های ثانویه هستند که دفع متان و نیتروژن را کاهش می‌دهند، بنابراین می‌توان از این گیاهان برای بهبود فعالیت میکروبی و تخمیر شکمبه استفاده نمود [۲۴]. به هر حال، ارزش غذایی و ترکیبات مؤثره چنین گیاهانی تحت تأثیر اقلیم و محیط قرار دارد و یک گونه رشدیافته در نقاط جغرافیایی مختلف ممکن است ترکیب متفاوتی داشته باشد [۱۶ و ۲۰].

خوشاریزه (*Echinophora sibthorpiana*) و پولیکاریا (*Pulicaria dysenterica*) از گیاهان ارزشمند موجود در مراتع کشور (به‌ویژه منطقه الموت قزوین) هستند. این دو گیاه توسط دامداران محلی برای تغذیه زمستانه دام‌ها انبارشده و یا مورد چرای مستقیم دام قرار می‌گیرند. گزارش‌هایی از متابولیت‌های ثانویه ارزشمند موجود در اسانس این گیاهان منتشر شده است [۱، ۱۳]، اما اطلاعات مستندی درباره ترکیب شیمیایی و تأثیر مواد مؤثره این گیاهان بر دام وجود ندارد. خوشاریزه گیاهی علفی و معطر از تیره *چتریان* (*Apiaceae*) است و چهار گونه آن در ایران رویش دارد. ارتفاع آن بین ۳۰ تا ۱۰۰ سانتی‌متر است و بیش‌تر در شمال و غرب، منطقه البرز و بخش مرکزی ایران پراکنش دارد [۱۱]. هرچند داده‌هایی در مورد تأثیر خوشاریزه بر عملکرد دام و تخمیر شکمبه وجود ندارد، اما دامداران محلی آن را به مصرف چرای دام می‌رسانند و برای معطرکردن فرآورده‌های لبنی هم استفاده می‌شود [۱۱]. جنس خوشاریزه دارای اسانس‌ها و متابولیت‌های ثانویه زیادی از جمله ساپونین‌ها، فلاونوییدها، آلکالوئیدها، متیلوگنول، فلاندرن، کارین و سیمین است [۱۳]، که این متابولیت‌ها ممکن است دارای آثار مفیدی بر تخمیر شکمبه، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و سلامت حیوان باشند [۱۳، ۲۰ و ۲۴].

پولیکاریا یک گیاه علفی چندساله از خانواده *آستراسه* (*Asteraceae*) است و بیش‌تر در دامنه ارتفاعات کوهستانی خشک تا نیمه‌خشک کشور پراکنش دارد. هم‌چنین، در آبراهه‌های مراتع کوهستانی و نیمه‌کوهستانی دیده شده است و ارتفاعی بین ۲۰ تا ۵۰ سانتی‌متر دارد [۴ و ۲۵]. در مورد ارزش غذایی پولیکاریا نیز اطلاعات خاصی وجود ندارد، اما دامداران منطقه الموت (قزوین)، آن را به‌صورت تازه در تغذیه گوسفند، و به‌صورت خشک در تغذیه گاو استفاده می‌کنند و معتقدند که خوش‌خوراکی مناسبی دارد. هم‌چنین، برخی از دامداران پولیکاریا را به‌منظور تغذیه زمستانه دام‌ها انبار می‌کنند. پولیکاریا دارای مواد مؤثره متنوعی از جمله فلاونوییدها، تیمول، اسید بنزوئیک، استروئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنلی است [۱]. این متابولیت‌ها تخمیر شکمبه‌ای و

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی خون را بهبود می‌دهند و می‌توان از آنها برای کاهش اتلاف مواد مغذی و بهبود عملکرد و سلامت دام استفاده نمود [۱، ۲۰ و ۲۱].

در مجموع، یافته‌های علمی مستندی درباره ارزش غذایی خوشاریزه و پولیکاریا، و تأثیر آن‌ها بر قابلیت هضم جیره و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه وجود ندارد و انجام مطالعه در این زمینه ضروری است. بنابراین هدف از پژوهش حاضر، بررسی ترکیب شیمیایی خوشاریزه و پولیکاریا، و تأثیر سطوح مختلف آنها در جیره بر قابلیت هضم، فراسنجه‌های تخمیر، جمعیت پروتوزوا، تولید متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه با روش برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

خوشاریزه و پولیکاریا در نیمه دوم تیرماه ۱۳۹۶ از مراتع ناحیه الموت (قزوین)، واقع در طول جغرافیایی ۵۰ درجه و ۳۰ دقیقه تا ۵۰ درجه و ۵۱ دقیقه شرقی، و عرض جغرافیایی ۳۶ درجه و ۲۴ دقیقه تا ۳۶ درجه و ۴۶ دقیقه شمالی، جمع‌آوری شد. میانگین دمای ماهانه و مجموع بارندگی سالانه آن به‌ترتیب ۱۳/۸ درجه سانتی‌گراد و ۴۰۱ میلی‌متر می‌باشد (میانگین آمار ۱۳۸۱ تا ۱۳۹۶). هر دو گیاه در مرحله پس از گل‌دهی به‌صورت تصادفی از چندین نقطه مرتع نمونه‌گیری شده و نمونه‌های هر گیاه با هم مخلوط گردید. سپس، نمونه‌های پولیکاریا و خوشاریزه جمع‌آوری‌شده خشک و آسیاب شدند.

خاکستر خام نمونه‌ها با سوزاندن در کوره الکتریکی (شیمی فن، ایران)، پروتئین خام توسط روش کلدال (Gerhardt، آلمان) و عصاره اتری توسط دستگاه سوکسله دستی اندازه‌گیری شد [۳]. الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) با جوشاندن نمونه‌ها در محلول شوینده خنثی و الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) با جوشاندن نمونه‌ها در محلول شوینده اسیدی اندازه‌گیری شد. برای تعیین لیگنین، ابتدا ADF جدا شد. سپس، لیگنین با حل‌کردن سلولز موجود در ADF توسط اسید سولفوریک ۷۲ درصد (به مدت سه ساعت) اندازه‌گیری شد [۳]. قابلیت هضم و انرژی قابل سوخت‌وساز نمونه‌ها توسط آزمون تولید گاز برآورد شد [۱۷].

تأثیر گنجاندن خوشاریزه و پولیکاریا در جیره، بر فراسنجه‌های تخمیر برون‌تنی توسط آزمون تولید گاز بررسی شد. به این منظور، یک جیره شاهد (فاقد گیاه مرتعی) با نسبت علوفه به کنسانتره ۶۰ به ۴۰ و در حد نیاز رشد گوسفند [۱۸] متوازن شد. سپس، سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا (۱۵، ۳۰ و ۴۵ درصد ماده خشک) در جیره جایگزین یونجه گردید. اجزای خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱ ارائه شده است.

جیره‌ها حاوی انرژی و پروتئین برابر بودند و سایر اجزای شیمیایی آنها نیز نسبتاً مشابه بود. نسبت علوفه به کنسانتره در جیره‌های حاوی خوشاریزه شبیه جیره شاهد بود (نسبت ۶۰ به ۴۰). اما پولیکاریا ارزش غذایی کم‌تری داشت و اجباراً نسبت کنسانتره در جیره‌های حاوی پولیکاریا حدود سه تا هفت درصد افزایش داده شد تا سطح مناسب پروتئین و انرژی فراهم شود.

برای آزمون تولید گاز برون‌تنی، شیرابه شکمبه از سه رأس گوسفند نر نژاد شال، مجهز به فیستوله شکمبه، پیش از خوراک‌دهی صبح‌گاهی جمع‌آوری و با استفاده از چهار لایه پارچه مخصوص صاف شد. سپس، بزاق مصنوعی تهیه شد و به نسبت دو به یک با شیرابه شکمبه مخلوط گردید. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از هر جیره در داخل سرنگ‌های ویژه آزمون گاز ریخته شد و ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط شیرابه شکمبه- بزاق مصنوعی، تحت جریان CO_2، به داخل سرنگ‌ها تزریق گردید. پس از یادداشت حجم در زمان صفر، سرنگ‌ها در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت انکوباسیون شدند.

جدول ۱. اجزای خوراکی، ترکیب شیمیایی (درصد ماده خشک) و انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) جیره‌های آزمایشی

اجزای خوراکی	جیره شاهد	جیره حاوی خوشاریزه (درصد)			جیره حاوی پولیکاریا (درصد)		
		۱۵	۳۰	۴۵	۱۵	۳۰	۴۵
یونجه	۵۳/۵	۳۹	۲۲	۱۰	۳۵	۱۷	۵
کاه	۶/۵	۶	۸	۵	۷	۶	۳
گیاه مرتعی	۰	۱۵	۳۰	۴۵	۱۵	۳۰	۴۵
جو	۱۱	۱۲/۲	۸/۵	۸	۷/۶	۹	۷/۲
ذرت	۱۳	۹	۹/۷	۱۰/۸	۱۲/۷	۱۲/۵	۱۱/۷
سبوس گندم	۴	۶/۵	۷	۷	۵	۴	۱
گندم	۸/۵	۸	۸	۶/۵	۱۱/۸	۱۱/۱	۱۲
کنجاله سویا	۲/۴	۳	۵	۳/۳	۳	۵	۶
کنجاله تخم پنبه	۰/۵	۰/۵	۱	۳	۱	۳	۱/۵
گلوتن ذرت	۰/۱	۰/۳	۰/۳	۰/۸	۰/۶۵	۰/۹	۰/۹
پودر چربی	۰	۰	۰	۰	۰/۳	۰/۶	۱
اوره	۰	۰	۰	۰/۱	۰/۱۵	۰/۱	۰/۴
پرمیکس	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵
علوفه به کنسانتره	۶۰ به ۴۰	۶۰ به ۴۰	۶۰ به ۴۰	۶۰ به ۴۰	۵۷ به ۴۳	۵۳ به ۴۷	۵۳ به ۴۷
ترکیب شیمیایی							
پروتئین خام	۱۳/۳۶	۱۳/۳۲	۱۳/۳۵	۱۳/۳۹	۱۳/۳۵	۱۳/۳۹	۱۳/۳۴
NDF	۳۴/۵۶	۳۴/۱۷	۳۳/۸۳	۳۲/۲۲	۳۲/۸۳	۳۰/۳۹	۲۸/۶۵
ADF	۲۳/۳۸	۲۴/۷۴	۲۲/۵۱	۲۱/۳۰	۲۲/۶۸	۲۱/۱۶	۲۰/۷۲
لیگنین	۴/۶۳	۴/۶۳	۴/۷۱	۴/۶۳	۴/۷۳	۴/۷۹	۴/۸۴
خاکستر خام	۶/۳۱	۶/۸۳	۷/۲۹	۷/۶۷	۶/۹۰	۷/۵۱	۸/۲۴
عصاره اتری	۲/۵۰	۲/۶۰	۲/۷۶	۲/۶۷	۳/۱۵	۳/۸۱	۴/۳۸
کربوهیدرات‌های غیرالیافی	۴۳/۲۶	۴۳/۰۸	۴۲/۷۷	۴۳/۷۲	۴۳/۷۶	۴۴/۸۹	۴۵/۳۸
انرژی قابل سوخت‌وساز	۲/۳۷	۲/۳۷	۲/۳۶	۲/۳۷	۲/۳۶	۲/۳۶	۲/۳۳

پس از پایان انکوباسیون، حجم کل گاز تولیدی هر سرنگ ثبت و قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز با استفاده از روابط ۱ و ۲ محاسبه شد [۱۷].

رابطه ۱) $OMD\ (\%) = 14.88+(0.889 \times GP_{24}) + (0.448 \times CP) + (0.651 \times XA)$

رابطه ۲) $ME = 2.20+(0.1357\times GP_{24})+(0.057\times CP)+(0.002859\times EE^2)$

در روابط بالا، OMD، قابلیت هضم ماده آلی (درصد)؛ GP، حجم گاز (میلی‌لیتر به‌ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ CP، پروتئین خام (درصد)؛ XA، خاکستر خام (درصد)؛ EE، عصاره اتری (درصد) و ME، انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) است.

پس از پایان انکوباسیون و به‌منظور محاسبه سوبسترای

تجزیه‌شده حقیقی (Truly degraded substrate; TDS)، محتویات هر سرنگ به‌مدت یک ساعت با استفاده از محلول شوینده خنثی جوشانده و سپس فیلتر و شست‌وشو داده شد. پس از آن، بقایای به‌جامانده روی کاغذ صافی توسط آون خشک و توزین شد. در پایان، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (در زمان ۲۴ ساعت) با کسر نمودن وزن بقایای موجود روی کاغذ صافی از وزن نمونه اولیه محاسبه شد [۷]. تولید توده میکروبی (Microbial biomass production; MBP) با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد [۷]. برای تعیین عامل تفکیک (Partitioning factor; PF) نیز مقدار سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی بر حجم گاز تولیدی (رابطه ۴) تقسیم شد [۷].

$$MBP = TDS - (GP \times 2.2) \quad \text{رابطه ۳}$$

$$PF = TDS / GP \quad \text{رابطه ۴}$$

در روابط بالا، MBP، تولید توده میکروبی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)؛ TDS، سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)؛ GP، گاز تولیدی (میلی‌لیتر به‌ازای یک گرم ماده خشک)؛ ۲/۲، ضریب ثابت استوکیومتری و PF، عامل تفکیک (میلی‌گرم به‌ازای هر میلی‌لیتر) است. میزان pH محتویات شیرابه داخل هر سرنگ، توسط pHمتر دیجیتال (Sartorius، آلمان) اندازه‌گیری شد. برای تعیین نیتروژن آمونیاکی، ۲/۵ میلی‌لیتر شیرابه با ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. سپس، غلظت آمونیاک با استفاده از روش فنل- هیپوکلرایت و دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova، انگلستان) اندازه‌گیری شد [۱۰]. برای تعیین غلظت اسیدهای چرب فرّار، پنج میلی‌لیتر شیرابه با ۰/۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد مخلوط و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. پس از یخ‌گشایی، غلظت اسیدهای چرب فرّار توسط دستگاه گاز کروماتوگراف (UNICAM 4600، انگلستان) اندازه‌گیری شد [۱۰].

به‌منظور تعیین کل پروتوزوا، خانواده *ایزوتریکیده* (*Isotrichidae*) و زیرخانواده‌های *انتودینیه* (*Entodiniinae*)، *دیپلودینیه* (*Diplodiniinae*) و *افریوسکولسینه* (*Ophrioscolecinae*)، یک حجم شیرابه با یک حجم فرمالین ۵۰ درصد مخلوط و در یخچال (چهار درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد. سپس، مخلوط شیرابه- فرمالین روی لام هموسیتومتر (Hawksley، انگلستان) منتقل شد و تعداد پروتوزواها با قراردادن لام در زیر میکروسکوپ نوری (Jenus، چین) شمارش شد [۸]. کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شیرابه با استفاده از روش FRAP (توان احیاکنندگی آهن فریک) در حضور معرف TPTZ (تری‌پیریدیل تیرازین) اندازه‌گیری شد. در این آزمایش، دامنه متفاوتی از رنگ آبی در نمونه‌های مختلف شکل می‌گیرد که شدت جذب نوری توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Genova، انگلستان) قرائت می‌شود [۶].

برای تعیین میزان متان تولیدی، ابتدا حجم کل گاز پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون ثبت گردید. سپس، چهار میلی‌لیتر محلول سود ۱۰ مولار به داخل هر یک از سرنگ‌های گاز تست تزریق شد، و سرنگ به‌خوبی تکان داده شد (با هدف رخ‌دادن واکنش بین سود و گازهای تخمیری). در این فرایند، دی‌اکسیدکربن توسط محلول سود جذب می‌شود و گاز باقی‌مانده تقریباً معادل حجم متان خواهد بود [۲]. در پایان، به‌منظور بررسی کینتیک تخمیر جیره‌ها در شرایط برون‌تنی، آزمون تولید گاز ۱۲۰ ساعته انجام شد و حجم گاز تولیدی در زمان‌های دو، چهار، شش، هشت، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون ثبت گردید. فراسنجه‌های کینتیکی تولید گاز از طریق رابطه ۵ برآورد شد.

$$y = B (1 - e^{-ct}) \quad \text{رابطه ۵}$$

که در این رابطه، y، حجم گاز در زمان t؛ B، پتانسیل تولید گاز و c، ثابت نرخ تولید گاز است. در نهایت، داده های حاصل با استفاده از رویه GLM نرم‌افزار SAS (نسخه

۹/۱) و مدل آماری ۶ تجزیه و میانگین تیمارها توسط آزمون دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد مقایسه شدند. هم‌چنین، از مقایسه مستقل چندگانه (Polynomial contrast) برای آزمون اثرات درجه اول و درجه دوم تیمار (سطوح مختلف گیاه مرتعی) استفاده شد.

رابطه ۶) $Y_{ijk} = \mu + T_i + e_{ij} + e_{ijk}$

که در این مدل، Y_{ijk}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین؛ T_i؛ اثر تیمار؛ e_{ij}، خطای آزمایشی و e_{ijk}، خطای نمونه‌برداری است.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی گیاهان آزمایشی در جدول ۲ نشان داده شده است. مقادیر پروتئین خام، NDF، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز در خوشاریزه بیش‌تر از پولیکاریا بود، اما لیگنین، خاکستر خام و عصاره اتری کم‌تری نسبت به پولیکاریا داشت ($P<۰/۰۵$). پروتئین هر دو گیاه کم‌تر از یونجه (۱۴۴ گرم در کیلوگرم ماده خشک) بود. پروتئین هر ماده خوراکی باید از ۷۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک بیش‌تر باشد، تا حداقل آمونیاک کافی برای رشد میکروبی در شکمبه فراهم شود. در پژوهش حاضر، پروتئین خام پولیکاریا اندکی بیش از حد مذکور، اما پروتئین خوشاریزه به میزان قابل‌توجهی بالاتر بود. قابلیت هضم ماده آلی خوشاریزه (۶۱/۸ درصد) اندکی بیش‌تر از یونجه (۶۰ درصد)، اما قابلیت هضم ماده آلی پولیکاریا (۵۲/۵ درصد) کم‌تر از یونجه بود. نتایج این بخش نشان داد که ارزش غذایی خوشاریزه برای مصرف دام‌های مختلف مناسب است. محتوای پروتئین و قابلیت هضم پولیکاریا در حد متوسطی قرار دارد که برای تأمین نیاز دام‌های کم‌تولید کافی است، اما در صورت مصرف در جیره دام در حال رشد یا پرتولید، لازم است مکمل‌های انرژی‌زا و پروتئینی را افزایش داد. مطالعه دیگری درباره ترکیب شیمیایی خوشاریزه و پولیکاریا برای مقایسه نتایج وجود ندارد.

بیش‌ترین ترکیبات مؤثره در عصاره خوشاریزه شامل ترپن‌ها و فنیل‌پروپانوئیدها (آلفا- فلاندرن، متیل‌اوگنول، p- سیمن، بتا-فلاندرن، آلفا- پینن، گاما- ترپینن، ترپینولن و سابینن به‌ترتیب ۳۶/۲، ۲۹/۳، ۱۲/۴، ۷/۸۳، ۴/۹۸، ۳/۹۲، ۱/۳۲ و ۰/۸۷ درصد) بوده، و اندکی آلفا- ترپینن، بورنئول و ایزوبورنئول نیز شناسایی شده است. عصاره پولیکاریا حاوی فنول‌ها و ترپن‌ها (کورکومن، E- کنیفرول، کادینول، کادینن، نرول، ایتالیسن، کاریوفیلن، جرماسرن، میرسن، هلیفولن و سینئول به‌ترتیب ۲۹/۸، ۱۴/۶۵، ۱۳/۳۲، ۱۰/۱۲، ۸/۴۳، ۷/۰۵، ۵/۵، ۳/۸۹، ۲/۷، ۱/۳۵، و ۰/۷۵ درصد) بوده و مقادیر ناچیزی لاواندول، مانول، سانتالول و موررولن نیز شناسایی شده است.

جدول ۲. ترکیب شیمیایی (گرم در کیلوگرم ماده خشک)، قابلیت هضم ماده آلی (گرم در کیلوگرم) و انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) خوشاریزه و پولیکاریا

گیاه مرتعی	پروتئین خام	NDF	ADF	لیگنین	خاکستر خام	عصاره اتری	OMD	ME
خوشاریزه	۱۰۴[a]	۳۶۲[a]	۲۶۶[a]	۶۰/۰[b]	۱۰۳[b]	۳۱/۷[b]	۶۱۸[a]	۲/۰۴[a]
پولیکاریا	۷۸/۵[b]	۳۴۹[b]	۲۷۱[a]	۷۵/۳[a]	۱۲۵[a]	۴۵/۶[a]	۵۲۵[b]	۱/۶۳[b]
SEM	۵/۱۵	۳/۳۲	۱/۸۷	۱/۳۵	۴/۰۵	۱/۱۵	۶/۴۵	۰/۰۱۴
P-value	۰/۰۴۰	۰/۰۴۶	۰/۲۸	۰/۰۱۷	۰/۰۳۶	۰/۰۱۶	۰/۰۱۳	۰/۰۰۷

NDF: الیاف نامحلول در شوینده خنثی؛ **ADF**: الیاف نامحلول در شوینده اسیدی؛ **OMD**: قابلیت هضم ماده آلی؛ **ME**: انرژی قابل سوخت‌وساز.

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). **SEM**: خطای استاندارد میانگین‌ها.

براساس نتایج ارائه‌شده در جدول ۳، گنجاندن خوشاریزه در جیره، تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز را به‌طور خطی افزایش داد (P<۰/۰۵). یکی از دلایل این افزایش به قابلیت هضم بهتر خوشاریزه (۶۱/۸ درصد) نسبت به مخلوط یونجه- کاه مربوط است که موجب شده گنجاندن آن در جیره، قابلیت هضم را افزایش دهد. دلیل دیگر بهبود قابلیت هضم، ممکن است به متابولیت‌های ثانویه خوشاریزه (مانند ترپن‌ها، سیمین، ترپینن، فلاندرن، متیلوگنول، ترپینولن یا آلکالوئید) مربوط باشد که با تأثیر بر تعداد و فعالیت برخی گونه‌های میکروبی، موجب کاهش هدررفت انرژی و پروتئین جیره به‌صورت متان و آمونیاک شده و در نتیجه بازده تخمیر و قابلیت هضم جیره افزایش یافته است [۲۰ و ۲۴].

برخلاف خوشاریزه، با افزایش سطح پولیکاریا در جیره، مقادیر تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی و انرژی قابل سوخت‌وساز به‌طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵) و کم‌ترین میزان این متغیرها در جیره حاوی ۴۵ درصد پولیکاریا مشاهده شد (با وجود افزایش حدود سه تا هفت درصدی نسبت کنسانتره در جیره). علت این کاهش احتمالاً به قابلیت هضم کم‌تر پولیکاریا (۵۲/۵ درصد) مربوط است، زیرا محتوای لیگنین بیش‌تری دارد که دارای رابطه منفی با هضم‌پذیری خوراک است [۱۶]. پتانسیل تولید گاز (B) در جیره‌های مختلف تغییراتی تقریباً هم‌سو با مقادیر قابلیت هضم و تولید گاز ۲۴ ساعته داشت. یافته‌های این بخش نیز نشان داد که خوشاریزه پتانسیل مناسبی برای تغذیه دام دارد. اما در زمان تغذیه پولیکاریا در حیوانات پرتولید لازم است نسبت کنسانتره افزایش داده شود. همان‌طوری‌که در جدول ۴ دیده می‌شود، افزودن سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا در جیره تأثیر معنی‌داری بر میزان سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی نداشت، اما مقدار آن در جیره‌های حاوی خوشاریزه نسبت به تیمار شاهد اندکی بیش‌تر بود، که با قابلیت هضم بالاتر این تیمارها مطابقت دارد. میزان تولید توده میکروبی، عامل تفکیک و بازده توده میکروبی بین تیمارهای مختلف تقریباً یکسان بود.

جدول ۳. قابلیت هضم و فراسنجه‌های تولید گاز برون‌تنی جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا

جیره آزمایشی	GP	OMD	ME	B	c
شاهد	۴۷/۰۰^{b}	۶۶۷^{bc}	۲/۲۵^{bc}	۵۳/۹۱^{b}	۰/۰۹۶^{a}
خوشاریزه-۱۵ درصد	۴۸/۶۳^{ab}	۶۸۵^{ab}	۲/۳۹^{a}	۵۶/۱۷^{ab}	۰/۰۹۳^{a}
خوشاریزه-۳۰ درصد	۴۸/۷۵^{ab}	۶۸۸^{a}	۲/۴۰^{a}	۵۵/۸۶^{ab}	۰/۰۹۷^{a}
خوشاریزه-۴۵ درصد	۴۹/۸۸^{a}	۷۰۱^{a}	۲/۴۳^{a}	۵۸/۲۸^{a}	۰/۰۸۹^{a}
SEM	۰/۶۱۱	۵/۰۲	۰/۰۱۸	۱/۱۲	۰/۰۰۵
P-value؛ خطی	۰/۰۳۸	۰/۰۲۶	۰/۰۱۹	۰/۰۴۶	۰/۵۶
P-value؛ درجه ۲	۰/۷۳	۰/۶۴	۰/۷۱	۰/۲۷	۰/۸۳
پولیکاریا-۱۵ درصد	۴۵/۸۸^{c}	۶۶۱^{cd}	۲/۳۰^{b}	۵۳/۵۰^{b}	۰/۰۸۵^{ab}
پولیکاریا-۳۰ درصد	۴۶/۰۰^{c}	۶۶۶^{cd}	۲/۳۱^{b}	۵۳/۷۶^{b}	۰/۰۷۹^{b}
پولیکاریا-۴۵ درصد	۴۳/۷۵^{d}	۶۵۱^{d}	۲/۲۴^{c}	۴۷/۵۶^{c}	۰/۰۸۷^{ab}
SEM	۰/۵۵۵	۳/۲۱	۰/۰۱۷	۱/۳۶	۰/۰۰۳
P-value؛ خطی	۰/۰۳۵	۰/۰۳۸	۰/۰۴۶	۰/۰۳۳	۰/۰۴۶
P-value؛ درجه ۲	۰/۴۳	۰/۴۹	۰/۴۵	۰/۲۸	۰/۰۳۵

GP: گاز تولیدی در ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ **OMD**: قابلیت هضم ماده آلی (گرم در کیلوگرم)؛ **ME**: انرژی قابل سوخت‌وساز (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک)؛ **B**: پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر در ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)؛ **c**: نرخ تولید گاز (در ساعت).
a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون نسبت به شاهد معنی‌دار است (P<۰/۰۵). SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

جدول ۴. سوبسترای تجزیه‌شده، توده میکروبی و عامل تفکیک برون‌تنی جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا

جیره آزمایشی	TDS	MBP	EMBP	PF
شاهد	۷۵۸	۲۴۳	۰/۳۲۱	۳/۲۳
خوشاریزه-۱۵ درصد	۷۸۹	۲۵۴	۰/۳۲۰	۳/۲۵
خوشاریزه-۳۰ درصد	۷۷۱	۲۳۵	۰/۳۰۳	۳/۱۷
خوشاریزه-۴۵ درصد	۷۸۸	۲۳۹	۰/۳۰۲	۳/۱۶
SEM	۹/۵۰	۹/۰۲	۰/۰۲۷	۰/۱۰۶
P-value؛ خطی	۰/۳۷	۰/۴۶	۰/۸۲	۰/۷۸
P-value؛ درجه ۲	۰/۷۵	۰/۷۹	۰/۹۹	۰/۹۸
پولیکاریا-۱۵ درصد	۷۶۲	۲۵۸	۰/۳۳۸	۳/۳۳
پولیکاریا-۳۰ درصد	۷۶۱	۲۵۵	۰/۳۳۵	۳/۳۱
پولیکاریا-۴۵ درصد	۷۶۸	۲۸۶	۰/۳۷۱	۳/۵۱
SEM	۸/۰۴	۶/۶۶	۰/۰۲۲	۰/۱۰۱
P-value؛ خطی	۰/۶۸	۰/۳۵	۰/۴۳	۰/۲۶
P-value؛ درجه ۲	۰/۹۳	۰/۹۷	۰/۹۹	۰/۹۲

TDS: سوبسترای تجزیه‌شده حقیقی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)؛ **MBP**: تولید توده میکروبی (میلی‌گرم در گرم ماده خشک)؛ **EMBP**: بازده تولید توده میکروبی (میلی‌گرم به‌ازای میلی‌گرم سوبسترای تجزیه‌شده)؛ **PF**: عامل تفکیک (میلی‌گرم سوبسترای تجزیه‌شده به‌ازای میلی‌لیتر گاز).
SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

تأثیر تیمارهای آزمایشی بر pH، آمونیاک، متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در جدول ۵ ارائه شده است. میزان pH تیمارهای مختلف در دامنه فیزیولوژیکی مناسب شکمبه (۶/۴ تا ۶/۸) قرار داشت [۸ و ۱۶] و تحت تأثیر سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا قرار نگرفت. گزارش شده که pH شکمبه تحت تأثیر عواملی مانند تجمع VFA (کاهش‌دهنده pH)، غلظت آمونیاک (برداشت یون H از شکمبه برای ایجاد آمونیوم) و ظرفیت بافری قرار دارد [۱۶]. به‌نظر می‌رسد مجموع تغییرات فراسنجه‌های مذکور در پژوهش حاضر به صورتی بوده که در نهایت pH بدون تغییر مانده است. عدم تأثیر متابولیت‌های ثانویه خوشاریزه و پولیکاریا بر میزان pH شکمبه‌ای با نتایج محققان در مورد مواد مؤثره گیاهان دیگر مطابقت دارد [۱۴].غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه در مقایسه با جیره شاهد کم‌تر بود ($P<0/05$).

جدول ۵. pH، آمونیاک، متان و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی حاصل از تخمیر جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا

جیره آزمایشی	pH	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	متان (درصد از کل گاز)	متان (میلی‌لیتر به‌ازای گرم TDS)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی (میکرومول در لیتر)
شاهد	۶/۶۹	۱۸/۹۶^{a}	۱۴/۱۹^{a}	۴۵/۶۲^{a}	۸۸۶^{d}
خوشاریزه-۱۵ درصد	۶/۶۶	۱۵/۷۰^{b}	۱۲/۷۸^{ab}	۳۸/۲۸^{ab}	۱۲۲۹^{cd}
خوشاریزه-۳۰ درصد	۶/۶۹	۱۷/۲۷^{ab}	۱۱/۴۱^{b}	۳۵/۹۹^{b}	۲۰۶۷^{a}
خوشاریزه-۴۵ درصد	۶/۶۸	۱۵/۸۱^{b}	۱۱/۲۸^{b}	۳۵/۲۱^{b}	۱۸۷۰^{b}
SEM	۰/۰۲۲	۰/۵۶۴	۰/۶۲۳	۲/۱۱	۹۹/۱۶
P-value؛ خطی	۰/۶۸	۰/۰۳۴	۰/۰۴۱	۰/۰۳۹	۰/۰۱۲
P-value؛ درجه ۲	۰/۹۳	۰/۱۲	۰/۵۳	۰/۴۴	۰/۲۸
پولیکاریا-۱۵ درصد	۶/۶۹	۱۹/۲۳^{a}	۹/۶۵^{b}	۲۷/۳۴^{b}	۱۹۰۱^{ab}
پولیکاریا-۳۰ درصد	۶/۶۵	۱۹/۰۵^{a}	۱۰/۲۱^{b}	۳۰/۲۸^{b}	۲۱۹۲^{ab}
پولیکاریا-۴۵ درصد	۶/۷۱	۱۸/۲۵^{a}	۱۰/۵۴^{b}	۲۹/۵۰^{b}	۲۳۲۹^{a}
SEM	۰/۰۱۷	۰/۵۸۵	۰/۸۲۰	۲/۲۹	۸۹/۳۴
P-value؛ خطی	۰/۵۲	۰/۵۷	۰/۰۳۵	۰/۰۲۱	۰/۰۱۳
P-value؛ درجه ۲	۰/۲۹	۰/۶۸	۰/۰۵۴	۰/۰۱۸	۰/۱۷

a-d: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون نسبت به شاهد معنی‌دار است ($P<0/05$). **SEM**: خطای استاندارد میانگین‌ها.

متابولیت‌های ثانویه گیاهی می‌توانند فعالیت پروتئازهای باکتریایی، فرآیند پروتئولیز و میزان آمین‌زدایی از اسیدهای آمینه توسط میکروب‌ها را کاهش دهند و به این ترتیب موجب افت غلظت آمونیاک و کاهش ترن‌آور نیتروژن در شکمبه می‌شوند [۸، ۱۶ و ۲۰]. در پژوهش‌های مختلف مشخص شده که میزان تجمع آمونیاک در شکمبه برآیندی از میزان و نرخ آمین‌زدایی از اسیدهای آمینه، افزایش فعالیت باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک و ورود آمونیاک در ساختار پروتئین میکروبی است [۸ و ۱۶].

در آزمایش حاضر، غلظت نیتروژن آمونیاکی در تمامی تیمارها در دامنه مطلوب برای میکروب‌های شکمبه (۸/۵ تا ۳۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر) [۱۶] قرار داشت. بنابراین، هرچند مصرف خوشاریزه غلظت آمونیاک شکمبه‌ای را کاهش داد، اما تأثیری بر بازده توده میکروبی نداشت و تغذیه گیاه مذکور می‌تواند از اتلاف نیتروژن به شکل آمونیاک جلوگیری کند، بدون آن‌که رشد میکروبی را کاهش دهد. مواد مؤثره گیاهی در سایر پژوهش‌ها دارای اثرات متناقضی بر آمونیاک شکمبه بوده است؛ به‌طوری‌که در برخی مطالعات کاهش آمونیاک شکمبه مشاهده شده [۱۵]، اما در برخی دیگر از پژوهش‌ها تأثیری بر غلظت آمونیاک نداشته‌اند [۱۴]. بنابراین، پژوهش‌گران پیشنهاد کرده‌اند که متابولیت‌های ثانویه گیاهان مختلف ممکن است تأثیر متفاوتی بر متابولیسم نیتروژن در شکمبه بگذارند و موجب تولید و تجمع فرآورده‌های تخمیری یکسانی نخواهند شد [۲۰].

افزودن سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا در جیره موجب کاهش تولید متان شد ($P<۰/۰۵$)، و کم‌ترین درصد متان مربوط به جیره‌های حاوی پولیکاریا بود. احتمالاً کاهش تولید متان، به تأثیر منفی متابولیت‌های ثانویه گیاهان مرتعی بر تعداد پروتوزواها مربوط باشد، زیرا بین جمعیت پروتوزوای شکمبه و تولید متان همبستگی مثبت وجود دارد و متابولیت‌های ثانویه گیاهی (مانند ترکیبات فنولی، ترپن‌ها و فلاونوئیدها) با تخریب پروتوزواها و یا مداخله در مسیرهای متابولیسمی آنها، قادر به کاهش تولید متان هستند [۵، ۱۹ و ۲۴]. هم‌چنین، مواد مؤثره خوشاریزه و پولیکاریا ممکن است موجب مهار باکتری‌های متانوژن مصرف‌کننده هیدروژن یا باکتری‌های گرم مثبت تولیدکننده هیدروژن شوند که کاهش آزادسازی متان را در پی دارد [۸].

عوامل دیگری مانند فورمات، دی‌اکسیدکربن، ترکیبات حاوی گروه متیل و استات در تولید متان مؤثر هستند و همبستگی زیادی بین اسیدهای چرب فرّار و متان تولیدی گزارش شده است [۱۶ و ۲۲]؛ به‌طوری‌که تولید استات باعث افزایش آزادسازی متان می‌شود، اما تشکیل پروپیونات می‌تواند به‌عنوان یک مسیر رقابتی برای مصرف هیدروژن عمل کند و منجر به کاهش تولید متان شود [۱۶ و ۲۲]. در مطالعه حاضر نیز با افزودن سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا در جیره، غلظت استات روند کاهشی و غلظت پروپیونات روند افزایشی داشت، که نشان می‌دهد کاهش تشکیل متان و انحراف هیدروژن به سمت تولید پروپیونات رخ داده است. موافق با نتایج پژوهش حاضر، سایر پژوهش‌گران نیز پیشنهاد کردند که کاربرد گیاهان دارویی- مرتعی حاوی متابولیت‌های ثانویه (مانند فلاونوئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات فنولی) یا اسانس آنها می‌تواند یک راه‌کار مناسب برای کاهش تولید متان باشد [۱۹ و ۲۰].

همان‌طوری‌که در جدول ۵ دیده می‌شود، مصرف سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا موجب بهبود قابل‌ملاحظه‌ای در کل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه در شرایط برون‌تنی شد ($P<۰/۰۵$). متابولیت‌های ثانویه این گونه گیاهان قادر به حذف رادیکال‌های آزاد، پیوندنمودن

فلزات انتقالی (مانند آهن آزاد) و حذف اکسیژن فعال از محیط می‌باشد که شرایط اکسیداسیونی مخرب را از بین می‌برد [۹ و ۲۱]. در تأیید نتایج این آزمایش، وجود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی قوی در گونه‌هایی مانند پولیکاریا [۱۲] توسط متخصصان گیاهان دارویی نیز مشاهده شده است. به‌علاوه، برخی دیگر از پژوهش‌گران گزارش کردند که متابولیت‌های ثانویه گیاهان مختلف (مانند ترکیبات فنولی، تیمول، سینئول، سیمین و ترپن‌ها) دارای اثرات مثبت بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هستند [۱ و ۲۱].

غلظت اسیدهای چرب فرّار در شرایط برون‌تنی در جدول ۶ آورده شده است. کل اسیدهای چرب فرّار بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی‌داری نداشت، که احتمالاً به‌دلیل مشابه‌بودن میزان سوبسترای تجزیه‌شده در جیره‌های آزمایشی است [۱۶]. از سوی دیگر، مصرف سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا در جیره باعث روند کاهشی نسبت استات به پروپیونات شد، که می‌توان آن را به کاهش جمعیت پروتوزوایی و انحراف در متابولیسم هیدروژن به سمت پروپیونات در اثر متابولیت‌های ثانویه گیاهی نسبت داد [۲۴]. روند تغییرات در نسبت اسیدهای چرب فرّار با کاهش تولید متان نیز مطابقت دارد و در واقع، تشکیل پروپیونات یک مسیر رقابتی برای جذب هیدروژن به جای تولید متان بوده است [۲۲].

جدول ۶. کل اسیدهای چرب فرّار (میلی‌مول در لیتر) و نسبت اسیدهای چرب فرّار (مول در صد مول) حاصل از تخمیر جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا

جیره آزمایشی	کل VFA	استات	پروپیونات	بوتیرات	ایزوبوتیرات	والرات	ایزووالرات	استات:پروپیونات
شاهد	۵۵/۰۰	۶۴/۲۰	۲۳/۶۴	۹/۲۱	۲/۷۳^{a}	۰/۰۶۲	۰/۱۶۰^{a}	۲/۷۲^{a}
خوشاریزه-۱۵ درصد	۵۲/۲۹	۵۹/۵۲	۲۸/۴۲	۹/۹۳	۱/۹۴^{ab}	۰/۰۶۰	۰/۱۳۰^{ab}	۲/۰۹^{b}
خوشاریزه-۳۰ درصد	۵۳/۴۹	۶۲/۳۸	۲۶/۰۶	۹/۳۰	۲/۰۸^{ab}	۰/۰۵۴	۰/۱۲۴^{ab}	۲/۳۹^{ab}
خوشاریزه-۴۵ درصد	۵۳/۲۸	۶۰/۶۲	۲۸/۲۸	۹/۷۹	۱/۱۹^{b}	۰/۰۵۰	۰/۰۶۷^{b}	۲/۱۴^{b}
SEM	۴/۸۰	۱/۴۳	۱/۵۶	۰/۸۰۸	۰/۲۰۵	۰/۰۰۸	۰/۰۱۳	۰/۰۹۲
P-value؛ خطی	۰/۴۱	۰/۴۹	۰/۴۳	۰/۷۷	۰/۰۲۶	۰/۶۲	۰/۰۲۷	۰/۰۲۵
P-value؛ درجه ۲	۰/۵۸	۰/۵۳	۰/۸۳	۰/۸۲	۰/۹۴	۰/۹۲	۰/۵۹	۰/۶۳
پولیکاریا-۱۵ درصد	۵۳/۲۲	۶۲/۳۹	۲۶/۹۴	۸/۲۹	۲/۲۳^{a}	۰/۰۴۵	۰/۰۹۷^{b}	۲/۵۸^{a}
پولیکاریا-۳۰ درصد	۵۵/۲۱	۶۱/۲۳	۲۷/۵۲	۸/۷۴	۲/۳۴^{a}	۰/۰۴۹	۰/۱۱۸^{a}	۲/۴۸^{a}
پولیکاریا-۴۵ درصد	۵۱/۵۳	۶۰/۹۳	۲۷/۱۴	۹/۴۰	۲/۳۴^{a}	۰/۰۵۴	۰/۱۴۱^{a}	۲/۵۰^{a}
SEM	۲/۳۰	۱/۹۵	۱/۶۷	۰/۶۶۷	۰/۴۳۲	۰/۰۰۸	۰/۰۲۸	۰/۰۷۳
P-value؛ خطی	۰/۶۱	۰/۵۵	۰/۴۱	۰/۵۸	۰/۷۰	۰/۴۳	۰/۴۴	۰/۱۶
P-value؛ درجه ۲	۰/۷۲	۰/۳۷	۰/۵۵	۰/۴۰	۰/۶۱	۰/۱۹	۰/۲۲	۰/۳۴

VFA: اسیدهای چرب فرّار.

a-b: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون نسبت به شاهد معنی‌دار است (P<۰/۰۵). **SEM**: خطای استاندارد میانگین‌ها.

همان‌طوری‌که در جدول ۷ مشاهده می‌شود، گنجاندن سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا در جیره سبب کاهش تعداد کل پروتوزوا و زیرخانواده‌های پروتوزوا به‌ویژه *انتودینیئه* شد (P<۰/۰۵). پروتوزواها معمولاً باعث اتلاف منابع انرژی و نیتروژن در شکمبه می‌شوند و کاهش تعداد آنها می‌تواند مفید باشد [۸]. در پژوهش حاضر نیز کاهش تعداد پروتوزوا با افت متان و کاهش نسبت استات به پروپیونات همراه بود، که بهره‌وری جیره را بهبود می‌دهد. کاهش تعداد پروتوزوای شکمبه به وجود ترکیبات ثانویه مانند فنول‌ها، ترپن‌ها، تیمول و فلاونوئیدها در خوشاریزه و پولیکاریا مربوط است که قادر به تخریب پروتوزوا و یا ایجاد تداخل در مسیرهای متابولیسمی آن‌ها هستند [۵ و ۲۱]. سایر پژوهش‌گران نیز با بررسی گیاهان مختلف گزارش نمودند که افزودن متابولیت‌های ثانویه گیاهی مانند ترکیبات فنولی، فلاونوئیدها، ساپونین‌ها، تیمول و یا مخلوطی از اسانس‌ها موجب کاهش جمعیت پروتوزوای شکمبه در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی می‌شود [۵، ۲۰، ۲۱ و ۲۴].

براساس نتایج حاصل، استفاده از خوشاریزه تا ۴۵ درصد، و پولیکاریا تا ۳۰ درصد ماده خشک جیره نشخوارکنندگان قابل‌توصیه است. به‌هرحال، در زمان مصرف پولیکاریا در جیره دام‌های پرتولید باید نسبت علوفه به کنسانتره را کاهش داد. از سوی دیگر، مصرف خوشاریزه و پولیکاریا موجب بهبود ظرفیت آنتی‌اکسیدانی شکمبه‌ای و کاهش آزادسازی متان به محیط زیست می‌شود.

جدول ۷. جمعیت پروتوزوای شکمبه‌ای ($10^5\times$ در میلی‌لیتر) حاصل تخمیر جیره‌های حاوی سطوح مختلف خوشاریزه و پولیکاریا

جیره آزمایشی	کل پروتوزوا	*ایزوتریکیده*	*انتودینیئه*	*دیپلودینیئه*	*افریوسکولسینه*
شاهد	۲۹/۱۲^{a}	۱/۳۶^{a}	۲۲/۴۰^{a}	۴/۱۹^{a}	۱/۱۷^{a}
خوشاریزه-۱۵ درصد	۲۳/۰۶^{b}	۰/۹۰۰^{ab}	۱۷/۳۰^{b}	۴/۲۰^{ab}	۰/۶۵۹^{b}
خوشاریزه-۳۰ درصد	۱۵/۱۱^{c}	۰/۵۹۸^{bc}	۱۰/۶۰^{c}	۳/۴۰^{ab}	۰/۴۵۲^{b}
خوشاریزه-۴۵ درصد	۱۵/۸۰^{c}	۰/۷۰۰^{b}	۱۱/۴۰^{c}	۳/۱۲^{b}	۰/۶۰۲^{b}
SEM	۱/۱۵	۰/۱۶۸	۱/۳۴	۰/۵۲۳	۰/۱۳۲
P-value؛ خطی	۰/۰۱۶	۰/۰۴۴	۰/۰۲۱	۰/۰۲۲	۰/۰۳۶
P-value؛ درجه ۲	۰/۳۲	۰/۲۵	۰/۰۹۸	۰/۶۳	۰/۰۱۸
پولیکاریا-۱۵ درصد	۲۰/۹۰^{b}	۰/۴۰۰^{c}	۱۵/۵۰^{b}	۴/۳۰^{a}	۰/۷۰۰^{ab}
پولیکاریا-۳۰ درصد	۲۳/۶۹^{b}	۰/۸۹۱^{ab}	۱۷/۰۵^{b}	۴/۸۳^{a}	۰/۹۴۶^{b}
پولیکاریا-۴۵ درصد	۲۴/۱۴^{b}	۱/۰۰^{ab}	۱۷/۶۰^{b}	۴/۸۰^{a}	۰/۷۴۰^{b}
SEM	۱/۹۱	۰/۲۰۵	۱/۳۳	۰/۵۶۲	۰/۱۰۳
P-value؛ خطی	۰/۰۳۶	۰/۲۳	۰/۰۱۸	۰/۷۶	۰/۰۴۳
P-value؛ درجه ۲	۰/۱۵	۰/۰۴۸	۰/۰۳۷	۰/۴۰	۰/۲۱

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف نامشابه در هر ستون نسبت به شاهد معنی‌دار است (P<۰/۰۵). SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل پایان‌نامه کارشناسی ارشد تغذیه دام به شماره ۷۳۵۵۸ و تاریخ ثبت ۱۳۹۷/۰۷/۲۴ می‌باشد و منابع مالی آن توسط دانشگاه تربیت مدرس تأمین شده است.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Algabr M, Al-Hajj N, Jaber A, Alshotobi A, Al-suryhi S, Whaban G and Alshehari N (2016) Antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Pulicaria jaubertii* leaves. Der Pharma Chemica. 8: 224-228.
2. Anele UY, Südekum K-H, Hummel J, Arigbede OM, Oni AO, Olanite JA, Böttger C, Ojo VO and Jolaosho AO (2011) Chemical characterization, *in vitro* dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. Animal Feed Science and Technology. 163: 161-169.
3. AOAC (2012) Official methods of analysis, 19th ed. Association of official analytical chemist, Washington DC, USA.
4. Batoli H, Haghir-Ebrahimabadi A, Karimi E and Mazoochi A (2017) The survey of the essential oil composition of pulicaria gnaphalodes (vent.) boiss. from brzok of kashan at the first report. Eco-phytochemical Journal of Medicinal Plants (EJMP). 5(1): 65-78.
5. Benchaar C and Greathead H (2011) Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology. 166: 338-355.
6. Benzie IFF and Strain JJ (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Analytical Biochemistry. 239: 70-76.
7. Blümmel M, Steingss H and Becker K (1997) The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal of Nutrition. 77: 911-921.
8. Dehority BA (2003) Rumen Microbiology, 1st ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
9. Dose J, Matsugo S, Yokokawa H, Koshida Y, Okazaki S, Seidel U, Eggersdorfer M, Rimbach G and Esatbeyoglu T (2016) Free radical scavenging and cellular antioxidant properties of astaxanthin. International Journal of Molecular Sciences. 17(1): 103.
10. Galyean ML (2010) Laboratory Procedures in Animal Nutrition Research. Department of Animal and Food Sciences, Texas Tech University, Lubbock, TX, USA.
11. Ghavam M and Mokhtari A (2014) A review of medicinal plant platyloba (*Echinophora platyloba*). Proceedings 1st International Conference on New Findings of Agriculture, Natural Resources and Environment. 315-323. (In Persian)
12. Gherib M, Chahrazed B, El-Haci IA and Chaouche TM (2016) Antioxidant and antibacterial activities of aerial part essential oil and some organic extracts from the Algerian medicinal plant *Pulicaria mauritanica* coss. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 7: 76-84. (In Persian)
13. Hosseini Z, Lorigooini Z, Rafieian-Kopaei M, Shirmardi HA and Solati K (2017) A review of botany and pharmacological effect and chemical composition of *Echinophora* species growing in Iran. Pharmacognosy Research. 9(4): 305-312.
14. Khateri N, Azizi O and Jahani-Azizabadi H (2017) Effects of a specific blend of essential oils on apparent nutrient digestion, rumen fermentation and rumen microbial populations in sheep fed a 50:50 alfalfa hay: concentrate diet. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 30(3): 370-378.
15. Khezrian A, Nooriyan Soroor ME and Moeini MM (2016) The effect of plant and essential oils of mentha longoforia on *in vitro* ruminal fermentation parameters, methane production and protozoa population of goat. Animal Production. 18(3): 477-490. (In Persian)
16. McDonald P, Edwards RA, Greenhalgh JFD, Morgan CA, Sinclair LA and Wilkinson RG (2011) Animal nutrition, 5th ed. Prentice Hall, Essex, UK.
17. Menke KH and Steingass H (1988) Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Animal Research Development. 28: 7-55.
18. NRC (2007) Nutrient requirements of small ruminants. National Academic Press, Washington, DC, USA.

19. Oskoueian E, Abdullah N and Oskoueian A (2013) Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. BioMed Research International. 349129: 8.
20. Patra AK (2011) Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances. 6: 416-428.
21. Rajabi M, Rouzbehan Y and Rezaei J (2017) A strategy to improve nitrogen utilization, reduce environmental impact, and increase performance and antioxidant capacity of fattening lambs using pomegranate peel extract. Journal of Animal Science. 95: 499-510.
22. Shibata M and Terada F (2010) Factors affecting methane production and mitigation in ruminants. Animal Science Journal. 81: 2-10.
23. Venskutonis PR and Kraujalis P (2013) Nutritional components of amaranth seeds and vegetables: a review on composition, properties, and uses. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 12(4): 381-412.
24. Vercoe PE, Makkar HPS and Schlink AC (2010) *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants: nuclear and related methodologies. IAEA, Dordrecht, Netherlands.
25. Zarrin P, Ghahremaninejad P and Masoumi A (2010) Systematic of genera *Pulicaria* Gaertn and *Platycheteae* Boiss. From tribe *Inuleae* s.str (Asteraceae) in Iran. Taxonomy and Biosystematics. 1(2): 27-44. (In Persian)