The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of Walnut and Green Tea Ethanolic Extract to Mitigate Methane Emission and VFA Concentration in Ewes

Maryam Sahebi Ala[1], Hamed Khalilvandi-Behroozyar[2], Rasoul Pirmohammadi [3], Ehsan Anassori[4]

1. Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: sahebi.maryam@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: h.khalilvandi@urmia.ac.ir
3. Department of Animal Science, Faculty of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: r.pirmohammadi@urmia.ac.ir
4. Department of Internal Medicine and Clinical Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran. E-mail: anassori@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 21 May 2025

Received in revised form:

11 August 2025

Accepted: 18 August 2025

Published online: Spring 2026

Keywords:

Green tea leaf extract, Methane mitigation, Rumen fermentation, Volatile fatty acids, Walnut leaf extract.

ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effects of ethanol extracts of walnut leaves and green tea leaves on ruminal fermentation characteristics, methane and total gas production under in vitro conditions, and microbial population in lactating ewes using microbial-based methods. The experiment was arranged in a completely randomized design with four treatments: a control group (no extract) and three experimental groups receiving 100 mg extract per kg of live weight from walnut leaves, green tea leaves, or an 1:1 ratio. Extracts were administered orally twice daily for two months. At the end of the period, rumen fluid was collected from each treatment and subjected to in vitro gas production tests, including total gas production, methane production, and protozoal counts, conducted in three independent runs with four replicates per treatment. The results indicated that the control group had the highest potential gas production (A) at 373.60 mL, while the mixture of extracts showed the lowest (265.60 mL). The molar proportion of acetate decreased, and that of propionate increased significantly, with the highest propionate values observed in the mixture (34.39%) and walnut leaf (32.21%) treatments, and the lowest in the control (29.80%) and green tea leaf (29.66%) treatments. The combination of extracts led to a reduction in protozoa and methanogen populations, while fungal populations increased significantly ($P < 0.02$). Overall, the findings suggest that dietary inclusion of these extracts in lactating ewes may beneficially modify rumen fermentation patterns in terms of volatile fatty acid profiles, gas production, and microbial populations.

Cite this article: Sahebi Ala, M., Khalilvandi-Behroozyar, H., Pirmohammadi, R. & Anassori, E. (2026 Effect of Walnut and Green Tea Ethanolic Extract to Mitigate Methane Emission and VFA Concentration in Ewes. *Iranian Journal of Animal Science*, 57 **(1),** 79-99. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394591.654074

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394591.654074

Extended Abstract

Introduction

Improving feed efficiency in ruminants is achievable by reducing energy loss. This can be done through enhanced digestibility and better rumen fermentation management, particularly by increasing propionate production and consequently reducing methane production. Over the course of evolution, plants have developed a wide range of secondary metabolites that exert significant biological effects when consumed by herbivores. Among these, polyphenols—especially flavonoids—are valued for their antioxidant, anti-inflammatory, and immune-boosting properties, making them promising candidates for improving animal health and productivity. The use of plant extracts rich in these compounds in ruminant nutrition has attracted interest due to their low production cost, environmental compatibility, and ability to mitigate metabolic disturbances caused by oxidative stress. Walnut leaves and green tea are rich sources of flavonoids and antioxidant compounds capable of scavenging free radicals and modulating redox-sensitive biological pathways. Additionally, plant secondary metabolites such as tannins and saponins can help reduce methane production in the rumen and improve fermentation patterns by influencing the microbial population. However, there is limited information about the effects of ethanolic extracts of walnut leaves and green tea on rumen fermentation processes. This study aims to investigate the in vitro effects of these extracts on fermentation patterns, total gas production, methane emissions, and volatile fatty acid profiles, exploring their potential as a natural and sustainable approach to reducing methane production and the risk of ruminal acidosis.

Methods

The protocol for this study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC). The experiment was conducted during autumn 2017 (Mehr to Azar 1396) on 20 Makui ewes allocated to four treatments: control (no extract), hydroalcoholic walnut leaf extract, green tea leaf extract, and a combination of both extracts. Walnut leaves were collected from Urmia University orchards, while green tea leaves were purchased from the National Tea Organization. Samples were collected in multiple rounds, dried, and ground. Extraction was performed in two stages using 96% and then 75% ethanol. The filtered extracts were concentrated at 50 °C using a rotary evaporator and sent to Turkey for GC-MS analysis. Ewes received the extracts at 100 mg per kg live weight twice daily for two months. Diets were formulated using SRNS software based on NRC (2007) requirements. For in vitro testing, rumen fluid was collected from all ewes in each treatment before morning feeding, filtered, pooled, and used as inoculum. The gas production test followed Menke & Steingass (1988), with 12 replicates and measurements at intervals up to 96 hours. Methane production was measured after injecting 10 M NaOH. Volatile fatty acids (VFAs) were analyzed via gas chromatography (GC), protozoa were counted using Dehority's (2017) method, and ammonia nitrogen was determined using the colorimetric method of Broderick and Kang (1980). Apparent and true dry matter digestibility was assessed using the Blümmel et al. (1997) method, with samples incubated, dried, and weighed. Total DNA extraction was performed following Tajima and Yang protocols, purified with a ZYMO kit, and evaluated for purity with a NanoDrop spectrophotometer. Quantitative analysis of microbial populations was conducted using qPCR with SYBR Green dye.

Results

Results showed that different treatments had a significant effect on gas and methane production; the highest gas and methane production were observed in the control group, and the lowest in the group supplemented with a mixture of walnut and green tea extracts. The fermentation rate did not change, but the lag phase was longest in the combined extract treatment. In the volatile fatty acid profile, acetate decreased and propionate increased significantly in the combined extract treatment. The acetate to propionate ratio and ammonia nitrogen concentration were lower in this treatment. Protozoa population decreased in all extract treatments, with the lowest count in the combined treatment. Dry matter and organic matter digestibility improved in the walnut leaf extract and combined extract treatments, while the green tea extract alone had less effect. Microbial population analysis showed that the combined extract treatment caused the greatest reduction in protozoa and methanogens and the highest increase in fungal population. Individual extracts had lesser effects, and their increase in fungal population was not significant.

Conclusions

The combination of walnut leaf and green tea extracts effectively improved rumen fermentation, nutrient digestibility, and reduced methane production, highlighting its potential as a natural additive for enhancing ruminant performance and sustainability.

Author Contributions

Conceptualization, Investigation, Formal analysis, Software and Writing-original draft, M.S.A.; Supervision, Project administration, Conceptualization, Validation, Writing- review and editing, H.K.B.; Supervision, Validation, R.P.; Writing, review and editing, E.A.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgements

The authors would like to appreciate Dr. Ramin Mazaheri-Khameneh, assistant professor of the department of radiology, Urmia University of Medical Sciences, Iran, for his technical assistance in this study.

Ethical considerations

The research protocol was approved by the university's Animal Care and Use Committee (IACUC Protocol #IR2018011), following the guidelines of the Iranian Council of Animal Care (1995).

Conflict of interest

The author declares no conflict of interest.

انتشارات دانشگاه تهران

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۷، شماره ۱

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

تأثیر عصاره الکلی برگ سبز گردو و برگ چای سبز بر کاهش تولید متان و فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای میش‌های شیرده در شرایط برون‌تنی

مریم صاحبی اعلا [۱] | حامد خلیلوندی بهروزیار [۲]✉ | رسول پیرمحمدی [۳] | احسان عناصری [۴]

۱. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: sahebi.maryam@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه: h.khalilvandi@urmia.ac.ir

۳. گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه:r.pirmohammadi@urmia.ac.ir

۴. گروه بیماریهای دورنی و کلینیکال پاتولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران. رایانامه:anassori@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۳۱

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۲۷

تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۵

کلیدواژه‌ها:

اسیدهای چرب فرار، انتشار متان، تخمیر شکمبه، عصاره برگ گردو، عصاره چای سبز.

چکیده

این پژوهش به‌منظور ارزیابی اثر عصاره اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز بر روی میش‌های شیرده بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه‌ای، تولید متان و تولید گاز در شرایط برون‌تنی و جمعیت میکروبی شکمبه بر پایه استفاده از روش‌های میکروبی انجام شد. آزمایش به‌صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار شامل گروه شاهد (بدون عصاره) و سه تیمار دریافت‌کننده ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره به ازای هر کیلوگرم وزن زنده از برگ گردو، برگ چای سبز و مخلوط مساوی آن‌ها طراحی شد. عصاره‌ها به مدت دو ماه روزانه در دو وعده به میش‌ها خورانده شد. در پایان دوره، مایع شکمبه از هر تیمار جمع آوری و آزمون‌های تولید گاز کل، تولید متان و شمارش جمعیت پروتوزوا با روش گاز تست در سه ران مستقل و چهار تکرار برای هر تیمار انجام شد. نتایج نشان داد تیمار شاهد بیشترین تولید گاز بالقوه (A) برابر با ۳۷۳/۶۰ میلی‌لیتر و تیمار ترکیب عصاره‌ها کمترین مقدار برابر با ۲۶۵/۶۰ میلی‌لیتر را داشت. نسبت مولی استات کاهش و نسبت مولی پروپیونات به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، به‌گونه‌ای که بیشترین مقادیر پروپیونات در تیمارهای ترکیبی (۳۴/۳۹) و برگ گردو (۳۲/۲۱) و کمترین مقادیر در شاهد (۲۹/۸۰) و برگ چای سبز (۲۹۴/۶۶) مشاهده شد. تیمار ترکیب عصاره‌ها منجر به کاهش در جمعیت پروتوزوآ و متانوژن‌ها شد، در حالی که جمعیت قارچ‌ها افزایش یافت ($P< 0.02$). نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از این عصاره‌ها در جیره میش ها می‌تواند تخمیر شکمبه‌ای را از نظر الگوی اسیدهای چرب فرار، تولید گاز و جمعیت میکروبی بهبود دهد.

استناد: صاحبی اعلا، مریم؛ خلیلوندی، بهروزیار، حامد؛ پیرمحمدی، رسول و عناصری، احسان (۱۴۰۵). تأثیر عصاره الکلی برگ سبز گردو و برگ چای سبز بر کاهش تولید متان و فراسنجه¬های تخمیر شکمبه¬ای میش¬های شیرده در شرایط برون¬تنی. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۷ (۱)، ۹۹-۷۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394591.654074

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2025.394591.654074

مقدمه

گیاهان طی فرآیند تکامل، طیف گسترده‌ای از ترکیبات ثانویه را تولید کرده‌اند که هنگام مصرف توسط گیاه‌خواران، اثرات زیستی قابل‌توجهی به‌جا می‌گذارند. در میان این ترکیبات، پلی‌فنول‌ها و به‌ویژه فلاونوئیدها به‌دلیل ویژگی‌های برجسته‌ای همچون خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و تقویت سیستم ایمنی، به‌عنوان گزینه‌هایی نویدبخش برای ارتقای سلامت و افزایش بهره‌وری دام‌ها مطرح شده‌اند .(Messinese et al., 2024; Jomova et al., 2024) در حوزه تغذیه نشخوارکنندگان، استفاده از عصاره‌های گیاهی سرشار از پلی‌فنول به‌دلیل هزینه پایین تولید، سازگاری زیست‌محیطی، و توانمندی آن‌ها در کاهش اختلالات متابولیکی ناشی از تنش اکسیداتیو، با استقبال قابل‌توجهی مواجه شده است (Chandni Ahmad et al., 2024; Rossi and Dell'Anno, 2024) فلاونوئیدها به‌طور ویژه به‌دلیل تأثیرشان بر تنظیم‌کننده‌های اصلی متابولیک در حیوانات تک‌معده‌ای و نشخوارکننده‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. یکی از چالش‌های تغذیه‌ای مهم در سیستم‌های پرورش نشخوارکنندگان، بروزاسیدوز شکمبه‌ای در نتیجه مصرف جیره‌های پرکنسانتره است. این وضعیت با کاهش pH شکمبه، تغییر ترکیب میکروبی، افزایش تولید اسیدهای چرب فرار و تجمع اسید لاکتیک همراه است که در نهایت به اختلال در فرآیند تخمیر، کاهش عملکرد و افزایش بروز بیماری‌ها منجر می‌شود (Antonius et al., 2024). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که برخی ترکیبات گیاهی دارای توانایی بالقوه برای تنظیم pH شکمبه، مهار تولید اسیدهای مخرب و بهبود الگوی تخمی هستند و در نتیجه می‌توانند در پیشگیری یا کاهش شدت اسیدوز نقش‌آفرینی کنند (Antonius et al., 2024). برگ‌های درخت گردو *(Juglans regia)* منبعی غنی از فلاونوئیدهای زیست‌فعال از جمله کوئرستین، کامفرول و اسید الاجیک هستند که به‌همراه اسیدهای فنولیک، توانایی زیادی در مهار رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند .(Cordova et al., 2025)این اثرات عمدتاً به دلیل محتوای زیاد پلی‌فنول و توانایی آن‌ها در تنظیم مسیرهای سیگنال‌دهی حساس به وضعیت ردوکس (اکسید–احیا) نسبت داده می‌شود(Daddam et al., 2025). عصاره چای سبز نیز منبعی غنی از فلاونوئیدها و پلی‌فنول‌هایی مانند اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) است که نقش مهمی در ترمیم DNA و حذف رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کند(Cai et al., 2018). این عصاره همچنین حاوی کافئین است، ترکیبی که به دلیل اثرات محرک و متابولیکی آن شناخته شده است .(Reis et al., 2022) در سال‌های اخیر، علاقه‌مندی به استفاده از ترکیبات ثانویه گیاهی همچون تانن‌ها، ساپونین‌ها و پلی‌فنول‌ها در راهبردهای تغذیه‌ای به‌منظور کاهش تولید گاز متان (CH_4) در شکمبه افزایش یافته است؛ زیرا این ترکیبات منشاء طبیعی داشته و اثرات زیست‌محیطی کمتری در مقایسه با افزودنی‌های شیمیایی دارند .(Manh et al., 2012) اثربخشی این ترکیبات در کاهش تولید متان، در مطالعات متعددی در مقایسه با افزودنی‌هایی نظیر یونوفرها و پروبیوتیک‌ها تأیید شده است (Bodas et al., 2012; Oskoueian et al., 2013). فرض بر این است که افزودن برخی عصاره‌های گیاهی به محیط شکمبه می‌تواند ترکیب میکروبی و فرآیند تخمیر را به‌گونه‌ای تغییر دهد که منجر به کاهش تولید متان، کاهش نسبت استات، و افزایش غلظت پروپیونات و بوتیرات شود .(Busquet et al., 2006) برخی گیاهان حاوی ترکیبات ثانویه مانند تانن‌ها، ساپونین‌ها، فلاونوئیدها و فنول‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی هستند و می‌توانند برای انتخاب و کنترل جمعیت خاصی از میکروارگانیسم‌ها در شکمبه به کار گرفته شون (Zyszka et al., 2017). با این حال، اطلاعات موجود درباره تأثیر عصاره برگ گردو و عصاره برگ چای سبز بر فرآیند تخمیر شکمبه و جمعیت میکروبی آن محدود است. در برخی مطالعات، اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی ترکیبات موجود در عصاره برگ گردو مانند فلاونوئیدها و فنولیک‌ها بر باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی گزارش شده است که می‌تواند نشان‌دهنده پتانسیل آن‌ها در تغییر الگوی تخمیر شکمبه‌ای باشد (Katalinić et al., 2010) .همچنین، عصاره چای سبز به دلیل داشتن اپی‌گالوکاتچین گالات (EGCG) در برخی مطالعات بر کاهش تولید متان و تغییر نسبت اسیدهای چرب فرار در شرایط برون‌تنی اثرگذار بوده است (Jayanegara et al., 2012). فرض بر این است که افزودن عصاره اتانولی برگ گردو و عصاره برگ چای سبز به محیط شکمبه در شرایط برون‌تنی می‌تواند با تغییر الگوی تخمیر میکروبی، منجر به کاهش تولید متان، کاهش استات، و افزایش تولید اسیدهای چرب فرار مفید مانند پروپیونات و بوتیرات شود؛ همچنین این عصاره‌ها می‌توانند با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی از بروز شرایط اسیدوزی جلوگیری کنند. هدف از این مطالعه، بررسی برون‌تنی اثر عصاره اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز بر الگوی تخمیر شکمبه‌ای، میزان تولید گاز کل، متان، و اسیدهای چرب فرار در میش‌ها است. این پژوهش همچنین درصدد ارزیابی توان بالقوه این عصاره‌های گیاهی در کاهش تولید متان و کاهش خطر اسیدوز شکمبه‌ای با استفاده از رویکرد تغذیه‌ای طبیعی و پایدار می‌باشد.

پیشینهٔ پژوهش

عصاره‌ها دارای خواص ضدمیکروبی قوی و نسبتاً غیراختصاصی هستند، هرچند ریزجانداران شکمبه سطوح متفاوتی از حساسیت به این ترکیبات نشان می‌دهند (Benchaar et al., 2007). بر همین اساس، عصاره‌های گیاهی می‌توانند به‌طور بالقوه متابولیسم ریزجانداران شکمبه‌ای (تخمیر و متانوژنز) را تغییر دهند؛ به‌ویژه از طریق کاهش مستقیم جمعیت آرکایاهای متانوژن و یا مهار باکتری‌های فیبرولیتیک که بستر هیدروژنی لازم برای متانوژن‌ها را فراهم می‌کنند. تأثیر عصاره‌های گیاهان حاوی فلاونوئیدها بر الگوی تخمیر شکمبه در مطالعات درون‌تنی (Balcells et al., 2012) و برون‌تنی (Seradj et al., 2014) گزارش شده است. Balcellsو همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که عصاره مرکبات غنی از ترکیبات فلاونوئیدی، زمانی که به گوساله‌های درحال رشد با جیره کنسانتره بالا داده شد، اثرات مطلوبی بر محیط شکمبه داشت. این محققان گزارش کردند که ترکیبات فلاونوئیدی در تخفیف افت pH شکمبه، افزایش نسبت پروپیونات و کاهش نسبت استات مؤثر بوده‌اند (Seradj et al., 2014). اگرچه مطالعات فوق نشان‌دهنده ظرفیت عصاره‌های گیاهی در تغییر تخمیر شکمبه و ترکیب اسیدهای چرب فرار هستند، اما بیشتر آن‌ها یا بر گونه‌های خاصی از گیاهان تمرکز داشته‌اند یا در شرایطی انجام شده‌اند که قابلیت تعمیم نتایج آن‌ها به شرایط واقعی دامداری محدود بوده است. به‌علاوه، پژوهش‌های معدودی به‌طور همزمان اثر عصاره‌های غنی از فلاونوئید را هم بر کاهش تولید متان و هم بر تغییر الگوی تخمیر و pH شکمبه بررسی کرده‌اند. تاکنون بررسی جامع و آزمایشگاهی در زمینه اثربخشی عصاره‌های برگ گردو و چای سبز به‌عنوان منابع طبیعی ترکیبات ثانویه در کاهش تولید متان و پیشگیری از اختلالات تخمیری نظیر اسیدوز شکمبه‌ای صورت نگرفته است. بنابراین، شناسایی عملکرد ترکیبات فعال این عصاره‌ها در شرایط کنترل‌شده آزمایشگاهی می‌تواند شکاف مطالعاتی موجود را پوشش دهد و راهکاری طبیعی برای بهبود بهره‌وری شکمبه فراهم سازد. همچنین مطالعات پیشین نشان داده‌اند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات ثانویه از جمله ساپونین، تانن، اسانس‌های فرار و فلاونوئیدها می‌تواند تولید متان را کاهش دهد(Patra and Saxena, 2010). البته تأثیر ترکیبات مؤثره گیاهی (اسانس‌ها، تانن‌ها، ساپونین‌ها و غیره) بر تولید متان، در برخی مطالعات متناقض گزارش شده است، اما شواهد جدید تأکید دارند که این ترکیبات می‌توانند متانوژنز شکمبه‌ای را مستقیماً از طریق مهار آرکایاهای متانوژن و یا غیرمستقیم از طریق کاهش جمعیت پروتوزوآ و سایر ریزجانداران هیدروژن‌زا کنترل کنند (Benchaar et al., 2007; Cieslak et al., 2016). از آنجایی که متانوژن‌ها فاقد سیستم آنزیمی لازم برای تخریب دیواره سلولی گیاهان هستند، برای دریافت سوبسترای مورد نیاز (مانند هیدروژن و فرمات) وابسته به فعالیت باکتری‌های فیبرولیتیک و سایر میکروارگانیسم‌های تولیدکننده هیدروژن هستند. در واقع باکتری‌های فیبرولیتیک از طریق تجزیه فیبر، شرایطی را فراهم می‌کنند که منجر به تولید هیدروژن شده و این هیدروژن به‌عنوان پیش‌ساز اصلی برای تولید متان توسط متانوژن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد (Morgavi et al., 2010). بنابراین، هرگونه تغییر در جمعیت فیبرولیتیک‌ها می‌تواند به‌طور غیرمستقیم بر فعالیت متانوژن‌ها و در نتیجه تولید متان اثرگذار باشد. مهمترین محدودیت استفاده از آزمون‌های برون تنی در ارزیابی تاثیر استفاده از عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی زمان کم در معرض قرارگیری مایع شکمبه در شرایط برون تنی و در نتیجه عدم توان تعمیم نتایج این مطالعات به مطالعات درون تنی و شرایط مزرعه‌ای است. در این مطالعه برای کاهش این چالش و بهبود تطابق بین مرحله تغذیه درون‌تنی و انکوباسیون برون‌تنی، از رویکرد پیش‌تیمار دام‌ها (*In vivo* adaptation) استفاده شد؛ به این صورت که میش‌ها عصاره‌های مورد نظر را به‌مدت ۶۰ روز پیش از برداشت مایع شکمبه همراه جیره روزانه مصرف کردند. این روش با هدف القای تطابق میکروبی شکمبه به ترکیبات ثانویه گیاهی پیش از برداشت مایع شکمبه به کار رفت و بر اساس توصیه مطالعاتی است که بر اهمیت انطباق پیش از آزمایش برون‌تنی برای شبیه‌سازی دقیق‌تر شرایط درون‌تنی تأکید دارند (Cardoso-Gutierrez et al., 2024; Almeida et al., 2021). این رویکرد به محققان امکان می‌دهد جمعیت میکروبی تطابق‌یافته با عصاره‌ها را به محیط برون‌تنی منتقل کنند و اثر واقعی‌تر تیمارها را بر فراسنجه‌های تخمیر و تولید متان ارزیابی کنند (Cardoso-Gutierrez et al., 2024).

روش شناسی پژوهش

پروتکل پژوهش توسط کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات دانشگاه (IACUC، شماره پروتکل) IR2018011#و بر اساس دستورالعمل‌های شورای ایرانی مراقبت از حیوانات تأیید شد. این آزمایش از اواخر مهر تا اواخر آذر سال ۱۳۹۶ با استفاده از ۲۰ رأس میش ماکویی (n=5 در هر تیمار) انجام شد.

تهیه عصاره‌ها

برگ‌های گردو از باغ دانشگاه ارومیه جمع‌آوری و برگ چای سبز نیز از انبار سازمان چای کشور خریداری شد. جمع آوری نمونه‌ها طی ۵ بار مراجعه به انبار سازمان چای و باغات گردو دانشگاه از بخش‌های مختلف صورت گرفت. در هر بار نمونه برداری مقدار ۳ کیلوگرم از مواد موردنیاز جمع آوری و نمونه‌ها با هم ترکیب شدند. برگ‌های سبز گردو نیز در زیر سایه خشک شدند. نمونه‌های ترکیب شده به ۵ بخش تقسیم و هر بخش به صورت مجزا مورد عصاره‌گیری قرار گرفت. برگ‌های گردو و چای سبز بعد از آسیاب کردن به مدت ۲۴ ساعت در اتانول ۹۶ درصد غوطه ور شده و در طی یک مرحله با کاغذ صافی عصاره گیری شده و باقیمانده مواد فیلتر شده در طی مرحله دوم در اتانول ۷۵ درصد غوطه ور شد و مجدد با کاغذ صافی عصاره آن جداسازی شد. عصاره استخراج شده از هر دو مرحله با هم ترکیب شده و سپس توسط دستگاه روتاری Heidolph Laborota 4000, Heidolph (Instruments GmbH & CO. KG, Schwabach, Germany) با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت چرخش ۷۰ دور در دقیقه تا یک سوم حجم اولیه تغلیظ گردید (Solar *et al*., 2006). عصاره‌های غلیظ شده درون ویال‌های کوچک تا زمان انجام جی سی مس (GC-MS) در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. عصاره‌های هر بچ جهت جداسازی ترکیبات آن‌ها توسط دستگاه GC-MASS به کشور ترکیه ارسال شد. میانگین اندازه گیری نتایج آنالیز عصاره‌ها در جدول ۲ و جدول ۳ گزارش شده است .

تیمارها و جیره غذایی

برای کاهش مغایرت بین نتایج آزمایشگاهی برون‌تنی و شرایط واقعی مزرعه، در این مطالعه از طراحی دو مرحله‌ای استفاده شد. مطالعات پیشین (Goel and Makkar, 2012) پیشنهاد کرده‌اند که افزودن مستقیم عصاره‌های گیاهی به محیط برون‌تنی، به دلیل عدم تطابق با عادت میکروبی حیوان، می‌تواند پاسخ‌هایی متفاوت یا حتی متناقض نسبت به شرایط درون‌تنی داشته باشد. بر این اساس، در این پژوهش برای شبیه‌سازی بهتر پاسخ واقعی میکروبی، عصاره‌ها به مدت مشخصی به دام‌ها خورانده شد تا تغییرات ترکیب میکروبی شکمبه‌ای مرتبط با مصرف عصاره‌ها ایجاد شود. سپس مایع شکمبه از هر تیمار برداشت گردید و آزمون‌های برون‌تنی انجام شد. این رویکرد مطابق روش (Almeida et al., 2021) «Adapted Inoculum» و توصیه‌های FAO (2010)در ارزیابی افزودنی‌ها به‌صورت برون‌تنی جهت نزدیک‌تر شدن شرایط برون تنی به شرایط درون‌تنی انتخاب شد. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) گروه شاهد (بدون دریافت عصاره)؛ ۲) گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ گردو در سطح ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده دام؛ ۳) گروه دریافت کننده عصاره هیدروالکلی برگ چای سبز در سطح ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده دام و ۴) گروه دریافت کننده مخلوط عصاره‌های برگ گردو و برگ چای سبز در سطح ۱۰۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن زنده دام بود. میش‌ها به مدت دو ماه و در دو وعده روزانه (قبل از خوراک دهی صبح و قبل از خوراک دهی عصر) عصاره‌ها را دریافت کردند. این دوره تغذیه با هدف تغییر پایدار ترکیب میکروبی شکمبه و عادت‌دهی میکروبی انجام شد. جیره غذایی با استفاده از نرم افزار SRNS ورژن 1.9.6069 و بر اساس احتیاجات مواد مغذی گوسفند (NRC, 2007) تنظیم شد (جدول ۱). جیره‌های مورد استفاده در شرایط برون تنی همانند جیره‌های استفاده شده جهت تغذیه میش‌ها بود.

جدول ۱. اجزا و ترکیب شیمیایی جیره تغذیه شده به میش‌های مورد استفاده برای تهیه مایع شکمبه (٪ ماده خشک)

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diet fed to ewes used for rumen fluid preparation (% dry matter basis)

Ingredient	% Dry matter
Alfalfa hay	25.55
Corn silage	35.22

Barley grain	15.73
Wheat bran	9.09
Soybean meal	10.11
Dicalcium phosphate	0.5
Mineral-vitamin supplement*	1
Fat powder (Persia Fat)	2.8
Nutrient and energy composition	
Metabolizable energy (Mcal/kg)	2.56
Crude protein (%)	15
Ether extract (%)	5.3
Neutral detergent fiber (%)	43.1
Crude fiber (%)	16.3
Ash (%)	6.5
Calcium (%)	0.85
Phosphorus (%)	0.48

*Each kilogram of mineral-vitamin supplement contained: 500,000 IU vitamin A, 100,000 IU vitamin D, 0.1 mg vitamin E, 180 g calcium, 90 g phosphorus, 20 g magnesium, 60 g sodium, 2 g manganese, 3 g iron, 0.3 g copper, 3 g zinc, 0.1 g cobalt, 0.1 g iodine, 0.001 g selenium, 3 g antioxidants.

جدول۲. آنالیز عصاره برگ چای سبز با روش GC-MS

Table 2. Analysis of green tea leaf extract by GC-MS method

Retention time (min)	Compound name	Molecular Formula	Molecular Weight	Area	Area (%)
4.80	1,4a-dimethyl-7-nitro -9-oxo-1,2,3,4,4a,9,1 0,10a-octahydro-phena nthrene-1-carboxylic acid, methyl ester	C18H21NO5	331	211723.81	0.15
10.32	dimethoxyglyc erol docosyl ether	C27H56O5	460	1316000.83	0.91
20.53	2-propenoic acid, 3-(1-acetyl-2,2-dimeth ylcyclopentyl)-, methyl ester, (e)-	C13H20O3	224	214962.69	0.15
21.37	trimethoxyamphetam ine, 2,3,5-	C12H19NO3	225	313342.81	0.22
23.32	1h-benzimidazole, 2-phenyl-(cas)	C13H10N2	194	140472105.29	97.16
29.66	curan-17-oic acid, 2,16-didehydro-20-hydroxy-19-oxo-,methyl ester (cas)	C20H22N2O4	354	978866.75	0.68
39.50	antirliine	C19H24N2O	296	491376.10	0.34

جدول۳. آنالیز عصاره برگ سبز گردو با روش GC-MS

Table 3. Analysis of Walnut leaf extract by GC-MS method

Retention time (min)	Compound name	Molecular formula	Molecular weight	Area	Area (%)
4.78	Allogibberinic acid	C18H20O3	284	185879.44	3.95
10.34	2-(4-ethoxy-3-met hoxy-phenyl)-3-nitro-2h-chrom ene	C18H17NO5	327	415253.78	8.81
11.04	2-(4-ethoxy-3-met hoxy-phenyl)-3-nitro-2h-chrom ene	C18H17NO5	327	322042.41	6.83
11.99	10ah-2,12a-methano-1h,4h-cyclopropa[5, 6][1,3]dioxolo[2',3]cyclopenta[1',2':9,10]cyclodeca[1,2-days][1,3]di oxin-15-ol,	C26H38O5	430	349471.70	7.42
12.43	2-(4-ethoxy-3-met hoxy-phenyl)-3-nitro-2h-chrom ene	C18H17NO5	327	263678.85	5.60
16.01	Quercetin 7,3,4'-trimethoxy	C18H16O7	344	296156.06	6.28
17.17	Curan, 16,17-didehydro-, (20.xi.)-(cas)	C19H24N2	280	355835.62	7.55
17.77	Butanoic acid, 1a,2,5,5a,6,9,10,10aoctahydro-5,5a-dihyd roxy-4-(hydroxymethyl)-1,1,7,9-tetramethyl11-oxo-1h-2,8a-meth anocyclopenta[a]cyclo propa[e]cyclodecen-6 -yl ester, [1ar-(1aà,2à,5á,5aá,6á,8aà,9à,10aà)]-	C24H34O6	418	342213.44	7.26
23.43	Caffeine (cas)	C8H10N4O2	194	2181551.89	46.29

اندازه گیری فراسنجه های شکمبه

نمونه مایع شکمبه از تمامی گوسفندان موجود در هر تیمار (۵ میش) بلافاصله قبل از مصرف خوراک وعده صبح اخذ و با هم مخلوط شده و به عنوان محیط کشت در آزمون برون تنی مورد استفاده قرار گرفت. فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه در شرایط برون تنی ارزیابی شد. آزمایش تولید گاز بر مبنای روش Menke & Steingass (1988) به صورت ۴ تکرار در ۳ ران در روزهای مختلف (n=12 برای هر تیمار) با ۲۰۰ میلی گرم جیره در ویال‌های شیشه‌ای استاندارد ۱۲۰ میلی‌لیتری با درپوش آلومینیومی و پلاگ لاستیکی (butyl rubber stoppers) انجام شد. میزان تولید گاز بر حسب فشار (هکتو پاسکال) در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری و سپس به میلی‌لیتر گاز تبدیل شد. نرخ تولید گاز متان نیز به صورت میلی لیتر گاز تولید شده طی ۱۲ ساعت انکباسیون بر اساس هر واحد ماده آلی محاسبه شد. همزمان با انجام گاز تست، یک ران نیز به منظور اندازه‌گیری گاز متان، و یک ران جداگانه نیز جهت اندازه گیری اسیدهای چرب فرار و شمارش پروتوزوا انجام شد. پس از قرائت گاز تولیدی طی ۲۴ ساعت، ۴ میلی لیتر سود ۱۰ مولار به داخل ویال‌ها تزریق شده و حجم متان تولیدی محاسبه شد. پس از اندازه گیری pH (Titroline easy 5000, Schott Titrator, SCHOTT AG, Mainz, Germany) از ویال‌ها نمونه برداری و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان اندازه گیری اسیدهای چرب فرار و جمعیت میکروبی نگهداری شد. آنالیز اسیدهای چرب فرار توسط دستگاه GC (6820 Gas Chromatograph, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) با استفاده از ستون‌های (J&W HP-FFAP GC Column, 30 m, 0.25 mm, 0.25 mm, 7-inch cage, Agilent Technology) HP-FFAP انجام شد. شمارش پروتوزوآ نیز مطابق با روش Dehority, 2017 انجام شد. مایع شکمبه از ۵ میش در هر تیمار، پیش از تغذیه صبحگاهی جمع آوری شد. نمونه‌ها بلافاصله از پارچه دولایه گاز صاف شدند و با هم مخلوط شدند. بخشی از این مخلوط بلافاصله با حجم مساوی فرمالین ۱۰ درصد بافر شده (۱:۱) تثبیت شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان شمارش پروتوزوا نگهداری شد. برای تعیین نیتروژن آمونیاکی، مایع شکمبه پس از صاف شدن بلافاصله با اسید سولفوریک ۰/۲ نرمال به نسبت ۳ به ۱ (محلول به نمونه) اسیدی شد تا فعالیت آنزیمی متوقف شود. نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه

سانتی‌گراد نگهداری شدند. اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی با روش رنگ‌سنجی Broderick and Kang (1980) با استفاده از معرف فنول و هیپوکلریت و قرائت در طول موج ۶۲۵ نانومتر انجام شد.

برای بررسی اثرات عصاره‌ها بر گوارش پذیری ظاهری و حقیقی نمونه مایع شکمبه از روش Blümmel *et al*. (1997) استفاده شد به این صورت که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، محتویات ویال‌ها در فالکون‌هایی که از قبل وزن‌کشی شده بودند، تخلیه شد و پس از سانتریفیوژ (۴۰۰۰ دور، ۴۰ دقیقه) محلول بالایی دور ریخته شد و فالکون‌ها به داخل آون با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. پس از ۴۸ ساعت از آون خارج و وزن‌کشی شدند، تفاوت وزن موجود و وزن اولیه مقدار خوراک (۵۰۰ میلی‌گرم)، مقدار گوارش پذیری ظاهری را مشخص می‌نماید. برای اندازه‌گیری گوارش پذیری حقیقی ماده خشک، سپس محتویات فالکون‌ها در محلول شوینده خنثی NDS[1] به مدت یک ساعت جوشانده و از طریق کروسیبل و شستشو با آب مقطر گرم صاف شد. نمونه‌ها به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۵ درجه قرار داده شدند. پس از وزن‌کشی کروسیبل‌ها، به منظور اندازه‌گیری سایر فراسنجه‌های تخمیر، کروسیبل‌ها در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد کوره الکتریکی قرار گرفتند.

استخراج DNA و افزایش با استفاده از RT-qPCR

برای استخراج DNA و آنالیز PCR ریل تایم، DNA مربوط به گروه‌های میکروبی هدف شامل کل قارچ‌ها (Total fungi)، کل پروتوزوآها (Total protozoa) و آرکئاهای متانوژنیک (Methanogens) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، مقدار یکسانی از محتویات سرنگ (۲ میلی‌لیتر) به یک لوله اپندورف منتقل شده و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استخراج DNA نگهداری شد. استخراج کل DNA بر اساس روش‌های توصیف شده توسط Tajima *et al*. (2001) و Yang *et al*. (2009) با استفاده از فنل و کلروفرم و سپس رسوب‌گذاری با نمک–الکل انجام شد. DNA استخراج‌شده در محلول استریل Tris-EDTA حل شد، با استفاده از RNase فاقد DNase پردازش شد و با استفاده از کیت DNA Clean and ConcentratorTM-25 شرکت ZYMO Research Corp.ایروین، کالیفرنیا) مطابق دستورالعمل تولیدکننده خالص‌سازی شد. خلوص و بازده DNA و RNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودرآپ (Thermo Fisher Scientific Wilmington, DE) ارزیابی شد. گروه‌های مختلف میکروبی در نمونه‌ها با استفاده از rtPCR با رنگ SYBR گرین تعیین شدند.

ویژگی‌های پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر PCR کل قارچ‌ها، کل پروتووزآها، آرکئاهای متانوژنیک در جدول ۴ نمایش داده شده است. کمّی‌سازی اهداف ژنی روی DNA میکروبی با استفاده از دستگاه Step-One دستگاه PCR در زمان واقعی BiosystemsVR 7500، Applied Biosystems، والتام، ماساچوست) انجام شد.

جدول ٤. مشخصات آغازگرهای مورداستفاده در افزایش ریزجانداران شکمبه

Table 4. Characteristics of primers used for rumen microbial amplification

	Forward primer	Reverse primer		Reference
Total fungi	GAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTC	CAAATTCACAAAGGGTAGGATGATT	60	Denman and McSweeney (2006)
Total protozoa	CAYGTCTAAGTATAAATAACTAC	CTCTAGGTGATWWGRTTTAC	61	Sylvester *et al*. (2004)
Methanogens	CCGGAGATGGAACCTGAGAC	CGGTCTTGCCCAGCTCTTATTC	60	Zhou *et al*. (2009)

آنالیز آماری

آزمون تخمیر در این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار (Ti) و ۴ تکرار در هر تیمار و مجموعا در ۳ ران (Rj) انجام شد. هر ران در یک روز و در هر ران نمونه‌گیری از مایع شکمبه به صورت مجزا انجام شد. میانگین داده‌های حاصل از تکرارهای آزمایشگاهی در هر ران برای هر تکرار آزمایشی محاسبه و در آنالیز آماری مورد استفاده قرار گرفت. اثر ران به‌عنوان عامل تصادفی (Random effect) در مدل آماری در نظر گرفته شد. هدف از گنجاندن ران به‌صورت تصادفی، لحاظ کردن

[1]. Neutral Detergent Solution

تغییرات طبیعی بین روزها (شیرابه‌های متفاوت) و تعمیم‌پذیری نتایج آزمایشگاهی بود. تصحیح داده‌ها با استفاده از آزمون توکی و مقایسه میانگین‌ها باگزینه PDIFF درسطح احتمال آماری ۰/۰۵ انجام شد و داده‌ها به صورت میانگین حداقل مربعات و خطای استاندارد مربوطه گزارش شد.

یافته‌های پژوهش

تولید گاز و متان

اثر تیمارها بر تولید گاز در جدول ۵ و شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد پتانسیل تولید گاز بین تیمارها تفاوت معنی‌داری داشت (P=0.002). بیشترین مقدار تولید گاز در تیمار شاهد (۳۷۳/۶۰ میلی‌لیتر) و تیمار حاوی ترکیب عصاره‌ها دارای کمتربن مقدار تولید گاز (۲۶۵/۶۰ میلی‌لیتر) بود. اختلاف بین تیمار شاهد و عصاره چای سبز، و همچنین بین تیمار ترکیب دو عصاره و تیمار برگ گردو، از نظر آماری معنی‌دار نبود (P>0.05). نرخ تخمیر (C) تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت، اما فاز تأخیر (L) در تیمار ترکیب دو عصاره بیشترین مقدار را داشت. تولید گاز متان نیز به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و کمترین مقدار آن در تیمار ترکیب دو عصاره و بیشترین در تیمار شاهد ثبت شد (P<0.001) .

جدول ۵. تأثیر عصار اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز بر پارمترهای تولید گاز و تولید متان در میش ها

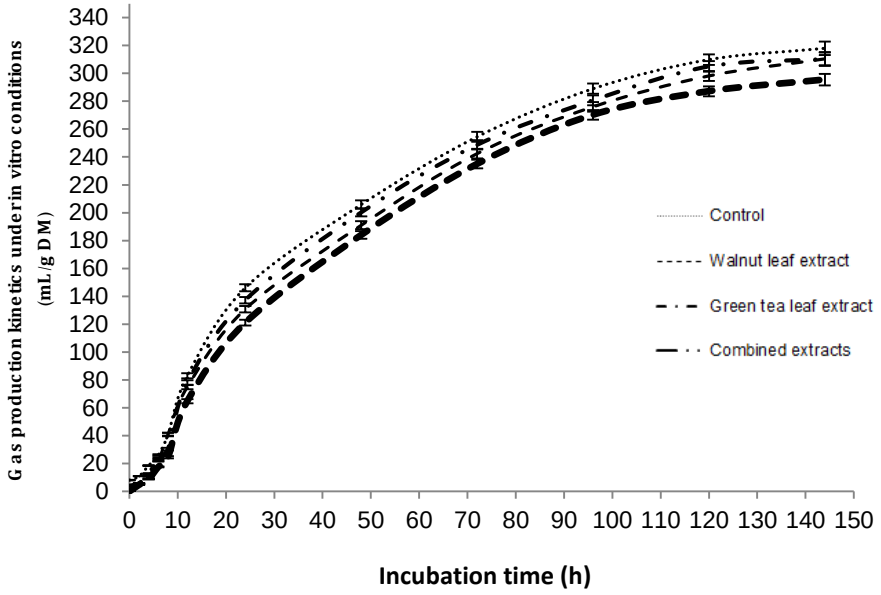
Table 5. Effect of walnut leaf and green tea leaf ethanolic extracts on gas production parameters and methane production in ewes

Variables	Experimental treatments[1]				SEM	P value
	Control	Walnut leaf extract	Green tea leaf extract	Combined extracts		
Gas production						
A	373.60[a]	300.0[bc]	338.60ab	265.60[c]	13.39	0.0002
C	0.95	0.96	0.97	0.93	0.01	0.36
L	1.19[b]	1.40[ab]	1.22[b]	1.51[a]	0.08	0.044
Methane gas (mL/g DM)	64.6[a]	58.4[b]	58.5[b]	53.4[c]	0.8	<0.001
Methane production rate (mL/mL gas produced at 12 h incubation)	0.139a	0.108[b]	0.123[b]	0.111[cd]	0.0015	0.01

[1] 100 mg extract per kg body weight of ewes.

A: Gas production potential (mL/mg DM); C: Fermentation rate (mL/h); L: Lag phase (h).

[a–d] Means with different superscripts within a row differ significantly at P < 0.05.



شکل ۱. تأثیر عصاره الکلی برگ درخت گردو و برگ چای سبز بر کنیتیک تولید گاز شکمبه ای

Figure 1. Effect of walnut leaf and green tea leaf ethanolic extracts on rumen gas production kinetics

اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوا

اطلاعات مربوط به تأثیر عصاره‌های اتانولی برگ چای سبز و برگ سبز گردو بر الگوی اسیدهای چرب فرار شکمبه در شرایط برون تنی در جدول ۶ ارائه شده است. میزان کل اسیدهای چرب فرار و مقادیر والرات، ایزوبوتیرات، ایزووالرات و pH مایع شکمبه بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت ($P>0.05$). میزان استات در تیمار ترکیب دو عصاره به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P<0.05$)، در حالی که پروپیونات در این تیمار بیشترین مقدار را داشت ($P=0.002$). بوتیرات شکمبه نیز تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0.05$)و در تیمار شاهد و عصاره چای سبز بیشترین، و در تیمار برگ گردو و ترکیب دو عصاره کمترین مقدار را نشان داد. نسبت استات به پروپیونات به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و در تیمار ترکیب دو عصاره پایین‌ترین مقدار را داشت ($P=0.002$). نتایج (جدول۶) نشان داد تیمارها اثر معنی‌داری بر مقدار نیتروژن آمونیاکی داشتند ($P<0.05$) و این شاخص در تیمار ترکیب دو عصاره کمتر از سایر تیمارها بود، هرچند اختلاف آن با تیمار برگ گردو معنی‌دار نبود. کل پروتوزوآ نیز تحت تأثیر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<0.001$) ، به‌طوری‌که کمترین تعداد در تیمار ترکیبی و بیشترین در تیمار شاهد ثبت شد. تعداد پروتوزوا در تیمارهای برگ گردو و چای سبز از تیمار شاهد کمتر و از تیمار ترکیب دو عصاره بیشتر بودند، اما تفاوت آماری مشخصی با یکدیگر نداشتند

جدول٦. تأثیر عصارهای اتانولی برگ چای سبز و برگ سبز گردو بر پروفیل اسیدهای چرب فرار،غلظت نیتروژن امونیاکی و جمعیت پروتوزوای مایع شکمبه میش‌ها

Table 6. Effect of walnut leaf and green tea leaf ethanolic extracts on volatile fatty acid profile, ammonia nitrogen concentration, and protozoa population in rumen fluid of ewes

Variables	Experimental treatments[1]				SEM	P value
	Control	Walnut leaf extract	Green tea leaf extract	Combined extracts		
Volatile fatty acids (mol/100 mol)						
Total VFA (mmol/dL)	84.60	82.40	85.00	88.200	3.82	0.760
Acetate	57.66^{a}	57.82^{a}	57.79^{a}	53.64^{a}	1.29	0.0001
Propionate	29.8^{c}	32.21^{b}	29.66^{c}	34.39^{a}	0.85	0.0001
Butyrate	9.71^{a}	7.02^{c}	9.32^{ab}	8.69^{b}	0.37	0.0001
Valerate	0.48	0.051	0.055	0.55	0.022	0.087
Isobutyrate	0.75^{b}	0.86^{ab}	0.99^{a}	0.99^{a}	0.018	0.040
Isovalerate	1.59^{ab}	1.56^{b}	1.67^{ab}	1.73^{a}	0.012	0.122
Acetate/Propionate	1.93^{a}	1.79^{b}	1.95^{a}	1.56^{c}	0.006	0.0001
pH	6.57	6.63	6.66	6.44	0.100	0.470
Ammonia nitrogen (mg/dL)	5.33^{a}	4.98^{ab}	5.49^{a}	4.60^{b}	0.21	0.040
Total protozoa[2] ($\times 10^5$/mL rumen fluid)	221.00^{a}	213.60^{b}	210.20^{b}	199.20^{c}	1.93	<0.001

100 mg extract per kg body weight of ewes.
[2] Protozoa counts in this table are based on microscopic examination results.
$^{a-c}$ Means with different superscripts within a row differ significantly at $P < 0.05$.

گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی

بررسی تأثیر عصاره اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز بر گوارش‌پذیری بروتنی مواد مغذی نشان داد که تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های گوارش‌پذیری ایجاد کردند($P<0.05$) .بر اساس جدول ۷، عصاره برگ گردو به‌تنهایی و همچنین ترکیب هر دو عصاره (برگ گردو و چای سبز) موجب افزایش معنی‌دار گوارش‌پذیری ظاهری و حقیقی ماده خشک در ۲۴ و ۴۸ ساعت شد. این تیمارها به طور معنی‌داری مقادیر بالاتری نسبت به گروه شاهد نشان دادند. گوارش‌پذیری ظاهری و حقیقی ماده آلی نیز تحت تأثیر تیمارها بهبود یافت و تیمارهای حاوی عصاره برگ گردو و ترکیب دو عصاره مقادیر بالاتری نسبت به شاهد داشتند. عصاره برگ چای سبز به‌تنهایی در برخی شاخص‌ها تفاوت معنی‌داری با شاهد نداشت یا مقادیر آن به شاهد نزدیک بود.

جدول۷. تأثیر عصار اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز بر گوارش پذیری آزمایشگاهی مواد مغذی

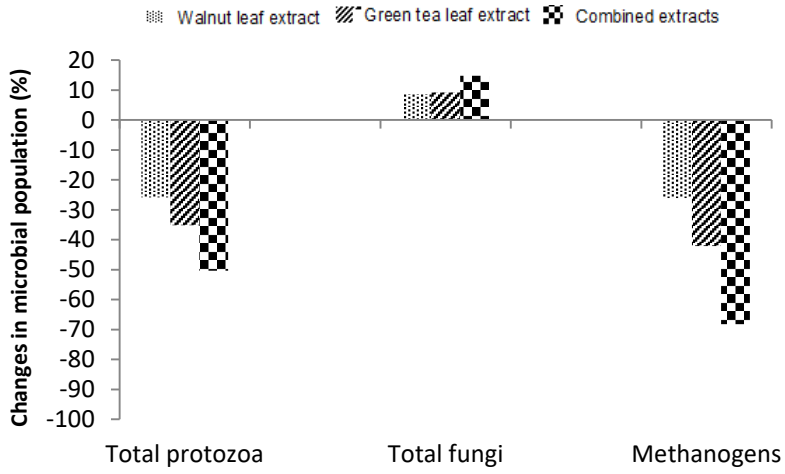
Table 7. Effect of walnut leaf and green tea leaf ethanolic extracts on in vitro digestibility of nutrients

Variables	Experimental treatments[1]				SEM	P value
	Control	Walnut leaf extract	Green tea leaf extract	Combined extracts		
Digestibility (%)						
Apparent dry matter digestibility (24 h)	32.54^{b}	36.20^{a}	32.08^{b}	36.88^{a}	6.47	<0.001
True dry matter digestibility (24 h)	34.70^{b}	36.78^{a}	35.42^{b}	36.90^{a}	4.43	0.006
Apparent dry matter digestibility (48 h)	34.46^{b}	40.44^{a}	35.72^{b}	39.96^{a}	5.37	<0.001
True dry matter digestibility (48 h)	35.50^{b}	41.52^{a}	36.30^{b}	41.38^{a}	6.36	<0.001
Apparent organic matter digestibility (24 h)	34.06^{b}	42.52^{a}	34.94^{b}	43.18^{a}	4.52	<0.001
True organic matter digestibility (48 h)	44.34^{b}	48.18^{a}	45.22^{b}	48.56^{a}	4.59	<0.001

[1] 100 mg extract per kg body weight of ewes.
$^{a-b}$ Means with different superscripts within a row differ significantly at $P < 0.05$.

جمعیت ریز جانداران

تغییرات نسبی جمعیت میکروبی شامل پروتوزوآ، متانوژن‌ها و قارچ‌ها در شکل ۲ نمایش داده شده است. تیمار ترکیب دو عصاره منجر به کاهش ۶۸/۲۲ و ۵۰/۳۵ درصدی به ترتیب در جمعیت پروتوزوآ و جمعیت متانوژن‌ها شد که در مقایسه با گروه شاهد این کاهش معنی دار بود ($P<0.05$) . عصاره‌های برگ گردو و برگ چای سبز نیز کاهش نسبتا کمتری نسبت به ترکیب دو عصاره داشتند. همچنین جمعیت قارچ‌ها نیز در تیمار ترکیب دو عصاره ۱۴/۸ درصد افزایش یافت. عصاره‌های منفرد برگ گردو و چای سبز تفاوت معنی‌داری در افزایش جمعیت قارچ‌ها نداشتند .



شکل۲. تأثیر عصاره‌های اتانولی برگ چای سبز و برگ سبز گردو بر تغییر (درصد) جمعیت میکروبی نسبت به گروه کنترل
میزان SEM به ترتیب برای پروتوزوآ، قارچ ها و باکتری های متانوژن برابر با ۵/۰۷، ۳/۷۱، ۶/۲۳ بود

Figure 2. Effect of walnut leaf and green tea leaf ethanolic extracts on changes (%) in microbial population relative to the control group
SEM values for protozoa, fungi, and methanogenic bacteria were 5.07, 3.71, and 6.23, respectively

بحث

دستکاری عملکرد دستگاه گوارش و میکروارگانیسم‌های شکمبه با استفاده از افزودنی‌های خوراک به عنوان یک استراتژی مهم در بهبود عملکرد رشد و بهره‌وری خوراک در گوسفند شناخته شده است (Swanson et al., 2016). متان از جمله گازهای گلخانه‌ای با پتانسیل بالای گرمایش جهانی است که اثر آن بر گرم شدن کره زمین ۲۵ برابر دی‌اکسید کربن برآورد می‌شود. افزودنی‌های خوراکی با تغییر در فرآیند تخمیر میکروبی شکمبه و کاهش باکتری‌های تولیدکننده متان، می‌توانند به کاهش تولید این گاز و در نتیجه کاهش اثرات گرمایش جهانی کمک کنند (Lee et al.2017). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، استفاده از عصاره برگ گردو و عصاره چای سبز هر دو به‌صورت جداگانه منجر به کاهش قابل‌توجه در تولید گاز نسبت به تیمار شاهد شدند. با این حال، زمانی که این دو عصاره به‌صورت ترکیبی مورد استفاده قرار گرفتند، میزان تولید گاز نسبت به هر یک از تیمارهای انفرادی کاهش بیشتری را نشان می‌دهد. این کاهش تجمعی، احتمالاً ناشی از اثر هم‌افزایی ترکیبات فعال زیستی موجود در هر دو عصاره است. به بیان دیگر، ترکیب فنول‌ها، تانن‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های موجود در برگ گردو و چای سبز ممکن است به‌طور هم‌افزا بر تخمیر میکروبی تأثیر گذاشته و فعالیت میکروارگانیسم‌های تولیدکننده گاز و متان را بیشتر مهار کرده باشند(Ramdani et al., 2022). بنابراین، برخلاف انتظار مبنی بر تأثیر جداگانه عصاره‌ها، ترکیب آن‌ها نه‌تنها باعث کاهش مضاعف در تولید گاز شد بلکه می‌تواند روشی مؤثرتر در مدیریت تخمیر شکمبه‌ای و کاهش تولید گازهای گلخانه‌ای در نشخوارکنندگان باشد. پیش‌تر، اثرات منفی فلاونوئیدها از طریق افزودن عصاره تجاری مرکبات (Bioflavex) بر پتانسیل تولید گاز گزارش شده است (Seradj et al. 2014). برخلاف نتایج ما، برخی پژوهشگران گزارش کرده‌اند که افزودن عصاره‌های گیاهی غنی از ترکیبات فنولیک تأثیر معنی‌داری بر تولید کل گاز ندارد (Kim et al. 2012, 2015; Santoso et al. 2013). همان‌طور که در نتایج بیان شده، با وجود آن‌که نرخ تخمیر (C) بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نشان نداد، پتانسیل تولید گاز و در نتیجه حجم کل گاز تولیدی در تیمار ترکیب هر دو عصاره کاهش یافت. این پدیده می‌تواند به دلیل اثر ترکیبات ثانویه موجود در عصاره‌های گیاهی بر ترکیب جمعیت میکروبی شکمبه، به‌ویژه کاهش فعالیت آرکئاهای متانوژن یا حذف پروتوزوآهای هیدروژن‌زا، رخ داده باشد، بدون آن‌که نرخ کلی تخمیر سوبسترا (C) تغییر چشمگیری پیدا کند. به بیان دیگر، نرخ اولیه تخمیر ممکن است مشابه باقی مانده باشد، اما بخشی از مسیرهای تخمیری به سمت تولید متان منحرف نشده‌اند یا به مسیرهای جانبی غیر گازی مانند تولید اسیدهای چرب فرار سوق پیدا کرده‌اند، که منجر به کاهش تولید گاز بدون کاهش نرخ تخمیر شده است (Cieslak et al., 2016). همچنین قابل ذکر است که C تنها بیانگر سرعت واکنش است، و راندمان آن یا سهم مسیرهای متان‌زا از کل فرآیند را نشان نمی‌دهد. بنابراین امکان کاهش متان یا گاز کلی در شرایط ثابت بودن نرخ تخمیر، با تغییر کیفیت تخمیر وجود دارد. افزایش زمان تأخیر (L) که در مطالعه حاضر مشاهده شد، با نتایج Mirzaei و همکاران (2016) هم‌راستا و برخلاف گزارش Oskoueian و همکاران (2013) بود. این نتایج متفاوت ممکن است ناشی از تفاوت در جمعیت میکروبی مایع شکمبه، زمان نمونه‌گیری، فعالیت‌های متفاوت فلاونوئیدها، دوزهای مختلف، نسبت علوفه به کنسانتره یا شرایط متفاوت آزمایشگاهی باشد (Jahani-Azizabadi et al., 2014). ترکیب دو عصاره باعث بیشترین کاهش معنی‌دار انتشار متان در مقایسه با گروه شاهد شد. به نظر می‌رسد که عصاره‌ها با تغییر اختصاصی در ترکیب جمعیت میکروبی شکمبه، موجب بهبود بازده رشد میکروبی می‌شود. استفاده از عصاره‌ها باعث کاهش جمعیت متانوژن‌ها در مقایسه با شاهد شد. نتایج ما با یافته‌های Wang و همکاران (2013) هم‌راستا است که کاهش معنی‌دار جمعیت متانوژن‌ها را در اثر عصاره‌های گیاهی غنی از فلاونوئید گزارش کردند. Kim و همکاران (2015) نیز نشان دادند که عصاره‌های غنی از فلاونوئید باعث کاهش انتشار متان پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون می‌شوند. کاهش تولید متان می‌تواند بخشی از آن به دلیل کاهش جمعیت پروتوزوآ باشد؛ به‌طوری‌که جمعیت پروتوزوآ نیز تحت تأثیر تیمارها کاهش معنی‌داری نشان داد. همچنین، پیشنهاد شده است که فلاونوئیدها با عمل به عنوان مخازن جذب هیدروژن (H_2 sink). به‌طور غیرمستقیم فرآیند متانوژنز را مهار کنند (Becker et al., 2014). با این حال، مطالعاتی نیز اثر مهاری مستقیم فلاونوئیدها بر متانوژن‌ها را گزارش کرده‌اند (Seradj et al., 2014). در این مطالعه، عصاره های مصرفی الگوی اسیدهای چرب فرار را تغییر داد، به‌گونه‌ای که نسبت استات کاهش و نسبت پروپیونات افزایش یافت. مدیریت محیط شکمبه برای بهبود تولید اسیدهای چرب فرار از جمله تغییرات مطلوب در اکوسیستم شکمبه محسوب می‌شود (Oskoueian et al., 2013) .همان‌طور که در مطالعات پیشین نیز گزارش شده است، کاهش این نسبت نشان‌دهنده‌ی جهت‌گیری تخمیر

شکمبه‌ای به سمت تولید بیشتر پروپیونات است که مسیری رقابتی با تولید متان محسوب می‌شود. افزایش سهم پروپیونات به‌عنوان یک مسیر هیدروژن‌گیر، موجب کاهش در دسترس بودن هیدروژن برای متانوژن‌ها شده و می‌تواند به کاهش متانوژنز منجر شود (Ungerfeld, 2015). از طرفی، پروپیونات پیش‌ساز اصلی گلوکونئوژنز در نشخوارکنندگان است و افزایش آن می‌تواند بهبود راندمان تبدیل انرژی جیره و کارایی تولید (مانند رشد یا تولید شیر) را به همراه داشته باشد (NRC, 2007). بنابراین، کاهش نسبت استات به پروپیونات در این پژوهش نه‌تنها از منظر کاهش متان، بلکه از نظر بهبود راندمان تغذیه‌ای نیز حائز اهمیت است.افزایش معنی‌دار نسبت مولی پروپیونات و کاهش استات در اثر افزودن فلاونوئیدها در سایر مطالعات نیز گزارش شده است (Seradj et el., 2014) .در مقابل، در مطالعه‌ای دیگر، ترکیبات فنولیک استخراج‌شده از بره‌موم زنبورعسل باعث افزایش تولید استات و اسیدهای چرب فرار کل شدند (Paula et al., 2017). میزان pH بین تیمارها تفاوت معنی‌داری نداشت که با یافته‌های Oskoueian و همکاران (2013) هم‌خوانی دارد. استفاده از عصاره‌ها همچنین بر مصرف نیتروژن در شکمبه تأثیرگذار بود، به‌طوری که ترکیب دو عصاره بیشترین کاهش غلظت آمونیاک را داشت. این کاهش ممکن است ناشی از کاهش جمعیت پروتوزوآ باشد که با تجزیه پروتئین‌های باکتریایی باعث افزایش سطح آمونیاک در شکمبه می‌شوند (Jadhav et al.,2018). استفاده از عصاره‌ها باعث کاهش جمعیت متانوژن‌ها شد که این تغییر با کاهش جمعیت پروتوزوآ همراه بود (شکل ۲). کاهش جمعیت پروتوزوآ در ارتباط با متانوژنز شکمبه از طریق اثر مستقیم فلاونوئیدها نیز پیش‌تر گزارش شده است (Li et al., 2024). اگرچه مکانیسم دقیق اثر هنوز به‌طور کامل روشن نشده است، اما به‌دلیل ماهیت لیپوفیلیک ترکیبات ثانویه گیاهی، این ترکیبات ممکن است نفوذپذیری آنها از غشای پروتوزوآ را تسهیل کنند (Wang et al., 2023). به گزارش Patra (2012) ، رشد ویروس‌ها، قارچ‌ها و برخی از پروتوزوآهای شکمبه‌ای که میزبان متانوژن‌ها هستند، ممکن است در اثر ترکیبات گیاهی غنی از فلاونوئید مختل شود. به دنبال کاهش در تولید گاز با افزودن عصاره‌های گیاهی ، گوارش پذیری ظاهری و واقعی ماده خشک و ماده آلی نیز افزایش یافت. تأثیر عصاره‌ها بر افزایش گوارش پذیری می‌تواند به دلیل اثرات مثبت مواد موثره عصاره‌ها بر روی باکتری های سلولولیتیک و قارچ‌های شکمبه و اثر سوء آن‌ها بر پروتوزوا و متانوژن‌های شکمبه و در نتیجه کاهش تولید کاز باشد. بنابراین تغییر در جمعیت میکروبی شکمبه به سمت میکروب‌های کارامدتر می‌تواند تولید گاز را کاهش داده، اما منجر به هضم بهتر مواد شوند. ترکیبات فلاونوئیدی موجود در عصاره‌ها نیز ممکن است از طریق شرکت در سنتز برخی آنزیم‌ها در روده باریک گوسفند سبب بهبود گوارش پذیری شوند. به علاوه شواهدی از خواص ضد میکروبی فلاونوئید نیز در مطالعات گزارش شده است .(Wang et al., 2023) که می‌تواند دلیلی بر افزایش گوارش پذیری ماده خشک و ماده آلی باشد. براساس برخی تحقیقات و مغایر با نتایج ما گوارش پذیری خوراک تحت تأثیر عصاره‌های گیاهی قرار نگرفت (Santos *et al*., 2010; Smeti *et al*., 2015;)، اگرچه در این مطالعات دوز دقیق عصاره‌ها یا میزان فلاونوئید مصرفی مشخص نشده است. برخلاف نتایج ما Abeer و همکاران (2019) در تحقیقی بر روی میش گزارش کردند که ۵۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن عصاره بادیان رومی، آویشن و خصوصاً میخک گوارش پذیری خوراک را افزایش داد و دلیل آن را با طبیعت فنولی eugenol و توانایی آن در تحریک باکتری‌های دخیل در هضم خوراک مرتبط دانستند. علاوه براین، Newbold و همکاران (2004) نشان دادند که برخی عصاره های گیاهی از پروتئین جیره در برابر تجزیه میکروبی محافظت می‌کنند. همچنین Rofiq (2018) نشان داد که استفاده از ۳ درصد عصاره آویشن سبب افزایش گوارش پذیری مادهٔ آلی می‌شود که با نتایج ما مغایرت دارند. یافته‌های این مطالعه نشان داد که کاهش تولید گاز شکمبه‌ای از جمله متان احتمالاً ناشی از ویژگی‌های ضد میکروبی ترکیبات فعال زیستی نظیر فلاونوئیدها، تانن‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها است که بر ساختار و عملکرد جمعیت میکروبی شکمبه، به‌ویژه متانوژن‌ها و پروتوزوآها، اثر بازدارنده دارند. از سوی دیگر، افزایش گوارش‌پذیری ماده خشک و ماده آلی که در این پژوهش مشاهده شد، می‌تواند حاصل تأثیر مثبت این عصاره‌ها بر فعالیت باکتری‌های سلولولیتیک، قارچ‌های شکمبه‌ای و احتمالاً افزایش سنتز آنزیم‌های گوارشی در روده باشد. با وجود هم‌زمانی کاهش تولید گاز و افزایش گوارش‌پذیری، شواهد موجود نشان می‌دهد که این دو پدیده ممکن است از طریق مسیرهای مجزای فیزیولوژیک و میکروبی رخ دهند و الزاماً رابطه علت‌ومعلولی مستقیم میان آن‌ها وجود نداشته باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از عصاره‌های اتانولی برگ گردو و برگ چای سبز می‌تواند به‌عنوان یک افزودنی طبیعی در جیره دام نقش مؤثری در کاهش گاز شکمبه‌ای از جمله تولید متان و بهبود الگوی تخمیر شکمبه ایفا کند. استفاده از عصاره‌های برگ گردو و برگ چای سبز موجب کاهش معنی‌دار جمعیت متانوژن‌ها و پروتوزوآهای شکمبه‌ای شد که از عوامل اصلی تولید متان به‌شمار می‌روند. همچنین، تغییر در نسبت اسیدهای چرب فرار به‌ویژه کاهش نسبت استات به پروپیونات، نشان‌دهنده تغییر مطلوب در مسیرهای هیدروژنی و کاهش پتانسیل تولید متان بود. استفاده از این ترکیب گیاهی می‌تواند به‌عنوان جایگزینی مناسب برای افزودنی‌های شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها در کاهش آلودگی‌های زیست‌محیطی ناشی از گازهای گلخانه‌ای، به‌ویژه متان، مطرح شود. بر این اساس، به‌کارگیری این عصاره‌ها در جیره‌های دامی با نسبت‌های مختلف علوفه به کنسانتره، راهکاری امیدبخش برای بهبود بهره‌وری دام و کاهش اثرات زیست‌محیطی تولیدات دامی محسوب می‌شود.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

REFERENCES

Abeer, M. E., Ahlam, R. A., and Marwa, H. E. (2019). Impact of Anise, Clove, and Thyme essential oils as feed supplements on the productive performance and digestion of Barki ewes. A*ustralian Journal of Basic and Applied Sciences*, 13(6), 1-13. https://doi.org/10.22587/ajbas.2019.13.6.1.

Almeida, A. K., Hegarty, R. S., and Cowie, A. (2021). Meta-analysis quantifying the potential of dietary additives and rumen modifiers for methane mitigation in ruminant production systems. *Animal Nutrition*, 7(4), pp.1219-1230. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.09.005

Antonius, A., Pazla, R., Putri, E.M., Alma'i, M.I., Laconi, E.B., Diapari, D., Jayanegara, A., Ardani, L.R., Marlina, L., Purba, R.D. and Gopar, R.A. (2024). Effects of herbal plant supplementation on rumen fermentation profiles and protozoan population in vitro. *Veterinary World*, *17*(5), p.1139. https://doi.org/10.14202/vetworld.2024.1139-1148

Balcells, J., Aris, A., Serrano, A., Seradj, A. R., Crespo, J. and Devant, M. (2012). Effects of an extract of plant flavonoids (Bioflavex) on rumen fermentation and performance in heifers fed high-concentrate diets. *Journal of animal science*, *90*(13), 4975-4984. https://doi.org/10.2527/jas.2011-4955

Becker, P. M., van Wikselaar, P.G., Franssen, M. C., de Vos, R. C, Hall, R. D., and Beekwilder, J. (2014). Evidence for a hydrogen-sink mechanism of (+) catechin-mediated emission reduction of the ruminant greenhouse gas methane. *Metabolomics*. 10, 179–189. https://doi.org/10.1007/s11306-013-0554-5.

Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Ouellet, D. R., Chiquette, J. and Chouinard, P. Y. (2007). Effects of essential oils on digestion, ruminal fermentation, rumen microbial populations, milk production, and milk composition in dairy cows fed alfalfa silage or corn silage. *Journal of Dairy science*, *90*(2), 886-897. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71572-2.

Blümmel, M., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, *77*(1-5), 24-34. https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00734.x

Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F.J., and López, S. (2012) Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176, 78–93. https://doi.org/doi:10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010.

Broderick, G. A., and 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(1):64–75. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., and Kamel, C. (2006). Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 89, 761–771. https://doi.org/doi:10.3168/jds.S0022-0302 (06)72137-3.

Cai, Z.Y., Li, X.M., Liang, J.P., Xiang, L.P., Wang, K.R., Shi, Y.L., Yang, R., Shi, M., Ye, J.H., Lu, J.L. and Zheng, X.Q., (2018). Bioavailability of tea catechins and its improvement. *Molecules*, *23*(9), p.2346. https://doi.org/10.3390/molecules23092346.

Cardoso-Gutierrez, E., Aranda-Aguirre, E., Robles-Jimenez, L.E., Castelán-Ortega, O.A., Chay-Canul, A.J., Foggi, G., Angeles-Hernandez, J.C., Vargas-Bello-Pérez, E., and González-Ronquillo, M. (2024). Effect of tannins from tropical plants on methane production from ruminants: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, *14*, p.100214. https://doi.org/10.1016/j.vas.2021.100214.

Chandni Ahmad, S. S., Saloni, A., Bhagat, G., Ahmad, S., Kaur, S., Khan, Z. S., Kaur, G., and Abdi, G. (2024). Phytochemical characterization and biomedical potential of Iris kashmiriana flower extracts: a promising source of natural antioxidants and cytotoxic agents. *Scientific reports*, 21;14(1):24785. https://doi.org/10.1038/s41598-024-58362-7.

Cieslak, A., Zmora, P., Stochmal, A., Pecio, L., Oleszek, W., Pers-Kamczyc, E., Szczechowiak, J., Nowak, A., and Szumacher-Strabel, M. (2014). Rumen antimethanogenic effect of Saponaria officinalis L. phytochemicals in vitro. *The Journal of Agricultural Science*, 152(6), 981-993. https://doi.org/10.1017/S1751731113000852

Cordova, I. W., Oludemi. T., Vieira. V., Pires. T. C. S. P., Pinho, S. P., Barros, L., and Ferreira, O. (2025). Extraction of phenolic compounds from Juglans regia L. leaves using aqueous solutions of eutectic solvents, *Separation and Purification Technology*, 354(7):129214. https://doi.org/10.1016/j.seppur.2024.129214.

Daddam, J. R., Daniel, D., Kra, G., Pelech, I., Portnick, Y., Moallem, U., Lavon, Y., and Zachut, M. (2025). Plant polyphenol extract supplementation affects performance, welfare, and the Nrf2-oxidative stress response in adipose tissue of heat-stressed dairy cows. *Journal of Dairy Science*,106(12):9807-9821. https://doi.org/10.3168/jds.2023-23549.

Dehority, B. A. (2017). Laboratory manual for classification and morphology of rumen ciliate protozoa.' (CRC Press: Boca Raton, FL, USA). https://doi.org/10.1201/9781351073912.

FAO. (2010).Assessment, A.L.C., Greenhouse Gas Emissions from the Dairy Sector.

Goel, G., and Makkar, H. (2012). Methane mitigation from ruminants using tannins and saponins. *Tropical animal health and production*, 44, pp.729-739. https://doi.org/10.1007/s11250-011-9966-2

Iranian Council of Animal Care, Guide to the Care and Use of Experimental Animals, vol. 1, Isfahan University of Technology, Isfahan, 1995, https://doi.org/ 10.4236/abb.2011.26062.

Jadhav, R. V., Kannan, A., Bhar, R., Sharma, O.P., Gulati, A., Rajkumar, K., Mal, G., Singh, B., and Verma, M. R. (2018). Effect of tea (Camellia sinensis) seed saponins on in vitro rumen fermentation, methane production and true digestibility at different forage to concentrate ratios. *Journal of Applied Animal Research*, *46*(1), 118-124. https://doi.org/10.1080/09712119.2016.1270823.

Jahani-Azizabadi, H., Danesh Mesgaran, M., Vakili, A. R., and Rezayazdi, K. (2014). Effect of some plant essential oils on in vitro ruminal methane production and on fermentation characteristics of a mid-forage diet. *Journal of Agricultural Science and Technology*. 16, 1543–1554.

Jayanegara, A., Goel, G., Makkar, H. P. S., and Becker, K. (2012). Reduction in methane emissions from ruminants by plant secondary metabolites: Effects of polyphenols and saponins. Livestock Science, 146(1), 69–77

Jomova, K., Alomar S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., and Valko, M. (2024). Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. *Archives of toxicology*, 98(5):1323-1367. https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4.

Katalinić, V., Možina, S.S., Skroza, D., Generalić, I., Abramovič, H., Miloš, M., Ljubenkov, I., Piskernik, S., Pezo, I., Terpinc, P. and Boban, M., (2010). Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 Vitis vinifera varieties grown in Dalmatia (Croatia). *Food chemistry*, *119*(2), pp.715-723. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.019.

Kim, E. T., Kim, C.H., Min, K.S., and Lee S. S. (2012). Effects of plant extracts on microbial population, methane emission and ruminal fermentation characteristics in in vitro. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*. 25, 806–811. https://doi.org/10.5713/ajas.2011.11447.

Kim, E. T., Le Luo Guan, S. J., Lee, S. M., Lee, S. S., Lee, I. D., Lee, S. K., and Lee, S. S. (2015). Effects of flavonoid-rich plant extracts on in vitro ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 28, 530–537. https://doi.org/10.5713/ajas.14.0692

Lee, S.H.Y., Humphries, D. J., Cockman, D. A., Givens, D. I., and Spencer, J. P. E. (2017). Accumulation of citrus flavanones in bovine milk following citrus pulp incorporation into the diet of dairy cows. *EC Nutrition*. 7(4):143–154.

Li, X., Wang, J., and Chen, G. (2024). Citrus flavonoids from peel extract mitigate methane and ammonia by suppressing rumen protozoa in dairy cows. Journal of Animal Science and Biotechnology, 15, 1258.

Manh, N. S., Wanapat, M., Uriyapongson, S., Khejornsart, P., and Chanthakhoun, V. (2012). Effect of eucalyptus (Camaldulensis) leaf meal powder on rumen fermentation characteristics in cattle fed on rice straw. *African Journal of Agricultural Research*, 30, 1997–2003. https://doi.org/10.5897/AJAR11.1347.

Menke, K., 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.

Messinese, E., Pitirollo, O., Grimaldi, M., Milanese, D., Sciancalepore, C., and Cavazza, A. (2024). By-products as sustainable source of bioactive compounds for potential application in the field of food and new materials for packaging development.*Food and Bioprocess Technology*, 17(3):606-627. https://doi.org/10.1007/s11947-023-03158-2.

Mirzaei, Z., Hozhabri, F., and Alipour, D. (2016). Thymus kotschyanus essential oil components and their effects on in vitro rumen fermentation, protozoal population and acidosis parameters. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 6, 77–85.

Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. and Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. animal, 4(7), pp.1024-1036. https://doi.org/10.1017/S1751731110000546.

National Research Council. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: sheep, goats, cervids, and new world camelids. Washington (DC): The National Academies Press.

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. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.12.006.

Oskoueian, E., Abdullah, N., and Oskoueian, A. (2013). Effects of flavonoids on rumen fermentation activity, methane production, and microbial population. *BioMed research international*, https://doi.org/10.1155/ 2013/349129.

Patra, A. K. and Saxena, J.(2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, *71*(11-12), 1198-1222. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.010.

Paula, V. B., Estevinho, L.M., and Dias, L. G. (2017). Quantification of three phenolic classes and total phenolic content of propolis extracts using a single UV-vis spectrum. J Apic Res. 56(5):569–80. https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1370904

Ramdani, D., Jayanegara, A. and Chaudhry, A.S. (2022). Biochemical properties of black and green teas and their insoluble residues as natural dietary additives to optimize in vitro rumen degradability and fermentation but reduce methane in sheep. *Animals*, *12*(3), p.305. https://doi.org/10.3390/ani12030305.

Reis, M. E., Cantor, M., Bittar, C. M. M. and Costa, J. H. (2022). Association of a green tea extract with serum immunoglobulin G status and neonatal vitality in newborn dairy calves. *Journal of dairy science*, 105(12), pp.9961-9970. https://doi.org/10.3168/jds.2022-22099.

Rofiq, M. N. (2018). The Use of Plant Essential Oils as Feed Additives for Ruminants. https://doi.org/10.14334/wartazoa.v26i1.1269.

Rossi, L., and Dell'Anno, M. (2024). Novel Antioxidants for Animal Nutrition. *Antioxidants*; 13(4):438. https://doi.org/10.3390/antiox13040438.

Santos, M. B., Robinson, P. H., Williams, P., and Losa, R. (2010). Effects of addition of an essential oil complex to the diet of lactating dairy cows on whole tract digestion of nutrients and productive performance. *Animal feed science and technology*, *157*(1-2), 64-71. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.02.001

Santoso, B., Saragih, E.W., and Hariadi, B. T. (2013). Effect of water extracts of plants containing tannin on in vitro methagonesis and fermentation characteristics of the grass Pennisetum purpureophoides. *Journal of The Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 38, 47–54. https://doi.org/10.14710/ jitaa.38.1.47-54.

Seradj, A. R., Abecia, L., Crespo, J., Villalba, D., Fondevila, M. and Balcells, J. (2014). The effect of Bioflavex® and its pure flavonoid components on in vitro fermentation parameters and methane production in rumen fluid from steers given high concentrate diets. *Animal Feed Science and Technology*, 197, pp.85-91. https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.08.013

Smeti, S., Joy, M., Hajji, H., Alabart, J.L., Muñoz, F., Mahouachi, M., and Atti, N. (2015). Effects of Rosmarinus officinalis L. essential oils supplementation on digestion, colostrum production of dairy ewes and lamb mortality and growth. *Animal Science Journal*, *86*(7),679-688. https://doi.org/10.1111/asj.12352.

Solar, A., Colarič, M., Usenik, V., and Stampar, F. (2006). Seasonal variations of selected flavonoids, phenolic acids and quinones in annual shoots of common walnut (Juglans regia L.). *Plant Science*, *170*(3),453-461. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.09.012.

Swanson, K. S. (2016). From the Editor: Gut microbiota, diet, and health: *Application to livestock and companion animals*. https://doi.org/10.2527/af.2016-0027.

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., and Benno, Y. (2001). Diet-dependent shifts in the bacterial 1124 M. SAHEBI ALA ET AL. population of the rumen revealed with real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6):2766–2774.

https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2766-2774.2001.

Ungerfeld, E.M., (2015). Shifts in metabolic hydrogen sinks in the methanogenesis-inhibited ruminal fermentation: a meta-analysis. *Frontiers in microbiology*, *6*, p.37. https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00037

Wang, D., Huang, J., Zhang, Z., Tian, X., Huang, H., Yu, Y., Zhang, G., Ding, J., and 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.

Wang, J., Deng, L., Chen, M., Che, Y., Li, L., and Zhu, L. (2023). Phytogenic feed additives as natural antibiotic alternatives in animal health and production: A review of the literature of the last decade. Animal Nutrition, 17, 244-26. https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.01.012.

Yang, S. L., Bu, D. P., Wang, J. Q., Hu, Z. Y., Li, D., Wei, H. Y., Zhou, L. Y., and Loor, J. J. (2009). Soybean oil and linseed oil supplementation affect profiles of ruminal microorganisms in dairy cows. *Animal*, 3(11):1562–1569. https://doi.org/10.1017/S1751731109990462.

Zyszka, B., Anioł, M., and Lipok, J. (2017). Modulation of the growth and metabolic response of cyanobacteria by the multifaceted activity of naringenin. *PLoS One*. 12(5):e 0177631. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177631.