علوم دامی ایران
دورۀ ۴۵، شمارۀ ۴، زمستان ۱۳۹۳ (ص ۳۷۴-۳۶۳)

تأثیر سه نوع برگ گیاه اکالیپتوس بر تخمیر شکمبه‌ای، جمعیت پروتوزوآیی و تولید گاز متان به روش برون‌تنی

محمدابراهیم نوریان سرور[1] و یوسف روزبهان[2]*
۱ و ۲. دانش‌آموختۀ دکتری و دانشیار، دانشکدۀ کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۲/۱۷- تاریخ تصویب: ۱۳۹۳/۹/۲۳)

چکیده

در این مطالعه تأثیر سه سطح برگ اکالیپتوس (۰، ۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم) که به سه روش هوا، آون و برودت-خشک، خشک شده بودند، بر خصوصیات تخمیر شکمبۀ گوسفند به روش برون‌تنی و آزمون گاز بررسی شد. مقادیر گاز کل تولیدی و متان تولیدی، نیتروژن آمونیاکی، تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادۀ آلی، شاخص بازده سنتز پروتئین میکروبی (PF) (میلی‌گرم مادۀ آلی تجزیه‌شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی) و غلظت اسیدهای چرب فرار فراسنجه‌هایی بود که مطالعه شد. همچنین سه زیرخانوادۀ *Entodiniinae*، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae* و یک خانوادۀ *Isotrichdae* و جمعیت پروتوزوآیی کل شناسایی و شمارش شدند. برگ اکالیپتوس تهیه شده به روش‌های هوا - خشک (خطی P<۰/۰۱) و برودت-خشک (غیرخطی P<۰/۰۱) مقدار اسیدهای چرب فرار کل را کاهش داند. اما، تنها روش آون-خشک، اسید پروپیونیک را افزایش (خطی P<۰/۰۵) داد. افزودن برگ اکالیپتوس، فراسنجه‌های گاز تولیدی از بخش نامحلول (P<۰/۰۱، خطی)، گاز تولیدی در زمان‌های ۲۴ و ۵۴ ساعت (P<۰/۰۱، خطی و غیرخطی)، گاز متانتولیدی (P<۰/۰۵، خطی)، نیتروژن آمونیاکی (P<۰/۰۱، خطی) و اسیدهای چرب فرار کل را کاهش (P<۰/۰۱، خطی) داد. اما شاخص PF تنها درسطح ۵۷/۳۱ برگ اکالیپتوس بهبود یافت (P<۰/۰۱، خطی). همچنین، این گیاه دارای فعالیت ضد پروتوزوآیی بوده و سبب کاهش جمعیت پروتوزوآیی کل، زیر خانوادۀ *Entodiniinae* (P<۰/۰۱، خطی) و خانوادۀ *Isotrichdae* (P<۰/۰۱، خطی) شد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که برگ اکالیپتوس توانایی بهبود تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی را دارد و روش آون- خشک مؤثرتر از دو روش دیگر بوده است.

واژه‌های کلیدی: آزمون گاز، اکالیپتوس، تخمیر شکمبه، گوسفند، متان، نیتروژن آمونیاکی.

مقدمه

تولید متان توسط نشخوارکنندگان دارای دو جنبه است که یکی از آن‌ها هدرروی انرژی جیره (Holter &Yong,1992; Johnson & Johnson, 1995) و دیگری آثار سوء زیست‌محیطی گاز متان از طریق گرم‌کردن زمین است (Moss *et al*., 2000). بنابراین کاهش تولید متان و کاهش دفع نیتروژن در دام‌های نشخوارکننده یکی از اهداف تحقیقات در سرتاسر دنیاست. کشور ایران نیز عضو پیمان کیوتو است؛ بنابراین تحقیقات در این راستا، گامی در جهت اجرایی‌کردن این معاهدۀ بین‌المللی است.

میش بالغ، گاو نر پرواری و گاو شیری با متوسط وزن

* تلفن: ۰۹۱۲۳۹۰۵۴۸۱
E-mail: rozbeh_y@modares.ac.ir

۴۸، ۴۷۰ و ۵۵۰ کیلوگرم، به ترتیب ۱۳-۱۰، ۹۰-۵۰ و ۱۴۶-۹۱ کیلوگرم متان (سال /هر رأس) دفع می‌کنند. این مقدار متان دفعی به ترتیب سبب هدرروی انرژی خام جیره برای هر رأس ۲/۰-۱/۵، ۱۳/۶-۷/۶ و ۲۲/۱-۱۳/۶ مگاژول در هر روز می‌گردد (Eckard *et al*., 2010). در حالی که هر رأس از دام‌های گفته‌شده به ترتیب حدود ۱۳، ۸۳ و ۲۰۳ مگاژول انرژی در هر روز نیاز دارند (Eckard *et al*., 2010).

تاکنون تلاش‌های گسترده‌ای در خصوص کاهش فرایند متانوژنزیز و دفع نیتروژن توسط دام با استفاده از افزودنی‌های تغذیه‌ای صورت پذیرفته است. برخی گیاهان حاوی متابولیت‌های ثانویه‌ای مانند ساپونین (Mao *et al*.,2010; Xu *et al*., 2010)، تانن (Hess *et al*., 2004) و اسانس‌های گیاهی (Agrawel *et al*., 2009; Goel *et al*., 2008) هستند که دارای توانایی کاهش دفع متان و نیتروژن دفعی است.

اسانس‌های گیاهی به دلیل خاصیت آب‌گریزی دارای توانایی ایجاد تغییرات در لیپیدهای غشای سلولی و میتوکندری هستند و بنابراین سبب تغییر نفوذپذیری آن‌ها و تغییرات محتویات میکروارگانیسم‌ها می‌گردند (Burt, 2004). این خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها سبب شده است آن‌ها توانایی تعدیل تخمیر شکمبه‌ای و در نهایت بهبود مصرف مواد مغذی را داشته باشند (Hristov *et al*., 2008). تأثیر اصلی ترکیبات ثانویهٔ گیاهی در شکمبه، کاهش تجزیهٔ پروتئین و نشاسته و مهار و کاهش تجزیهٔ اسیدهای آمینه در شکمبه است (Burt, 2004;Benchaar *et al*., 2008).

اکالیپتوس با نام علمی *Eucalyptus camaldulensis* از گیاهان دارویی و بومی مناطق گرمسیری ایران است (Omidbeygi,2010; Torabi *et al*., 2011). مطالعات فیتوشیمیایی روی این گیاه نشان داده است که دارای ترکیبات شیمیایی اسانس و عمدتاً ۸،۱- سینتول (۷۱/۲ درصد) و آلفا- پینن (۹/۲ درصد) (Torabi *et al*., 2011; Abravesh *et al*., 2007) و تانن (Asghari & Mazaheritehrani, 2010) می‌باشد، اما تا کنون گزارش علمی در خصوص کاربرد این گیاه در تغذیهٔ دام، به‌ویژه دام‌های ایرانی منتشر نشده است. با توجه به اهمیت تغذیه‌ای و زیست محیطی دفع گاز متان و نیتروژن در نشخوارکنندگان (Hu *et al*., 2005) و همچنین آثار مثبت گیاهان دارویی بر تخمیر شکمبه، هدف از این تحقیق بررسی امکان کاهش متان و نیتروژن دفعی از طریق مهار واکنش‌های متانوژنزیز و دآمیناسیون با افزودن برگ گیاه اکالیپتوس بود. همچنین مقایسهٔ اثر سه روش خشک‌کردن (هوا، آون و برودت) برگ این گیاه بر متغیرهای ذکرشده از دیگر اهداف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها

برگ گیاه اکالیپتوس

برگ‌های گیاه اکالیپتوس از شهرستان قصرشیرین استان کرمانشاه تأمین شد و به سه روش هوا- خشک (Air-dried) در سایه و دمای اتاق به مدت ۱ هفته، آون-خشک (Oven-dried) دردمای ۵۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت و برودت- خشک (Freeze-dried)، خشک شد (AOAC, 1990).

دام و مدیریت آن

مایع شکمبه مورد نیاز از سه رأس گوسفند نژاد افشار مجهز به فیستولهٔ شکمبه با میانگین وزن ۲/۹±۴۳/۸ کیلوگرم قبل از وعدهٔ غذایی صبح گرفته شد. گوسفندان با استفاده از جیرهٔ پرواری ۶۰ درصد کنسانتره (جو، سویا، سبوس، نمک، جوش‌شیرین و مکمل معدنی ویتامینه) و ۴۰ درصد علوفه (یونجهٔ خشک) سه مرتبه (۹ صبح، ۱۴ و ۱۹ عصر) در روز تغذیه شدند و آب تازه به صورت مداوم در اختیار آن‌ها قرار داشت. نیاز گوسفندان به مواد مغذی بر اساس توصیهٔ (NRC 2007) تنظیم شد.

آزمون تولید گاز به روش آزمایشگاهی *(IVGP)*

۲۰۰ میلی‌گرم نمونه از جیرهٔ غذایی یونجه و کنسانتره (جو) با نسبت ۴۰ به ۶۰ به عنوان جیرهٔ پایه در بطری‌های شاهد استفاده شد. گیاه افزودنی برگ اکالیپتوس در سه سطح صفر (شاهد)، ۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ (میلی‌گرم) (به ترتیب حاوی ۲۰۰، ۱۷۱/۳۵ و ۱۴۲/۶۹ میلی‌گرم جیرهٔ پایهٔ یونجه)، هر کدام در سه تکرار به محیط تخمیر اضافه شد؛ به نحوی که همهٔ بطری‌ها دارای ۲۰۰ میلی‌گرم جیرهٔ پایه و برگ اکالیپتوس بودند.

بطری‌های ویتن (Wheaton Bottle) ۱۲۰ میلی‌لیتری و محتویات آن (سوبسترا و ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبهٔ بافری‌شده) در دمای ۳۹ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. محلول بافر (ترکیبی از آب مقطر، ماکرومینرال، میکرومینرال، بافر بی‌کربنات، رزازورین و محلول احیاء) مطابق روش Menke & Steingass (1988) تهیه شد. بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری مقدار گاز تولیدی کل در هر بطری توسط سرنگ مدرج و گاز متان (گاز گروماتوگرافی) قرائت گردید. به منظور برآورد فعل و انفعالات تخمیر، آزمون تولیدگاز، آزمایش جداگانه‌ای با استفاده از سرنگ‌های مدرج شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری و به مدت ۵۴ ساعت انکوباسیون، در حمام آب گرم انجام گرفت. آزمایش در سه نوبت با سه تکرار در هر نوبت، اجرا شد.

شاخص‌های فعل و انفعالات تخمیر

به منظور برآورد شاخص‌های فعل و انفعالات تخمیر، آزمون گاز ۵۴ ساعته انجام گرفت و گاز تولیدی در ساعت‌های ۰، ۲، ۴،۶،۸، ۱۰، ۱۲، ۱۸، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۵۴ برای بلانک، شاهد وتیمار قرائت شد. داده‌ها با استفاده از مدل Orskove & McDonal (1979) و به شرح زیر پردازش شدند:

$$p = a + b\,(1-e^{(-ct)}) \qquad (۱)$$

که a گاز تولیدی از بخش سریع هضم (میلی‌لیتر)، b گاز تولیدی از بخش غیر قابل هضم در شکمبه (میلی‌لیتر)، c سرعت تولید گاز بخش غیر قابل هضم (b)، t زمان گرمخانه‌گذاری و P گاز تولیدی در زمان t است. مقادیر هر یک از شاخص‌های فعل و انفعالات تخمیر (a,b,c) با استفاده از برنامهٔ Excel و Fitcurve 6.0 برآورد شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تخمیر

بعد از پایان گرمخانه‌گذاری، با استفاده از سرنگ‌های مدرج، گاز تولیدی بطری‌های ویتن اندازه‌گیری شد و بر اساس گاز تولیدی بلانک تصحیح گردید. مقادیر گاز متان تولیدی در هر بطری با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (دستگاه شیماتزو ژاپن) با ستون فشرده (Supelco, St. Louis, MO, USA) و آشکارساز یونی شعله‌ای (Flame Ionization Detector) و با استفاده از استاندارد خارجی گاز متان (استاندارد با غلظت ۴۰،۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر متان خالص) محاسبه شد.

با استفاده از استاندارد داخلی (۲-اتیل بوتیریک اسید) و دستگاه گاز کروماتوگرافی (شیماتزو ژاپن) و با ستون موئینه (Capillary Column) مقادیر هر یک از اسیدهای چرب فرار استات، پروپیونات و بوتیرات تعیین شد. شاخص نسبت استات به پروپیونات نیز محاسبه شد (Cottyn & Boucque, 1968; Patra *et al*., 2006).

غلظت نیتروژن آمونیاکی (NH_3-N) (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) به وسیلهٔ روش معرف فنول-هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر تعیین شد (Broderick & Kang, 1980).

تعیین شاخص PF، تودهٔ میکروبی تولیدی و بازده سنتز تودهٔ میکروبی

برای تعیین شاخص PF (معرف مقدار سنتز پروتئین میکروبی) از روش Makkar (2010) استفاده شد. شاخص PF عبارت است از میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده بخش بر میلی‌لیتر گاز تولیدی که مطابق با رابطهٔ ۲ محاسبه گردید (Vercoe *et al*., 2010).

$$PF = c - (a-b)/\,IVGP \qquad (۲)$$

که در این معادله c، مادهٔ آلی وزن‌شده در هر بطری (میلی‌گرم)، a، مقدار مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (a mg)، b مقدار خاکستر مواد تجزیه‌نشده در هر بطری (b mg) و IVGP گاز تولیدی است. مادهٔ آلی تجزیه‌شده نیز بر اساس رابطهٔ ۳ محاسبه شد (Vercoe *et al*., 2010).

$$OMDe\ (mg) = c - (a - b) \qquad (۳)$$

بعد از اندازه‌گیری حجم گاز تولیدی در طی ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری، محتویات داخل بطری ویتن را به داخل یک بشر انتقال داده و توسط محلول شویندهٔ خنثی (Neutral Detergent Solution=NDS) و حرارت به مدت ۱ ساعت در دستگاه مجهز به مبرد شسته شد. سپس محتویات داخل محلول شوینده با کاغذ صافی بدون خاکستر تصفیه و باقیمانده توسط آون در دمای ۱۰۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت خشک شد. آنگاه با کسر وزن بوتهٔ خالی از بوتهٔ با محتویات بعد از آون، مقدار مواد

تجزیه‌نشده در هر بطری (*a* mg) محاسبه شد. سپس بوته و محتویات آن به کوره منتقل شد و در دمای ۵۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد مقدار خاکستر آن (*b* mg) محاسبه گردید. با تفریق مقدار *b* از *a*، مادهٔ آلی تجزیه‌نشده برحسب میلی‌گرم محاسبه می‌شود (Vercoe *et al*., 2010).

مقادیر تودهٔ میکروبی تولیدی و بازده سنتز تودهٔ میکروبی نیز با استفاده از رابطهٔ ۴ و به روش Makkar (2010) محاسبه شد (Vercoe *et al*., 2010).

$$MM\ (mg)= [c- (a-b)]-[NG_{ml}\times 2.2] \qquad (۴)$$

که در آن:

MM، میلی‌گرم تودهٔ میکروبی تولیدشده، NG، میلی‌لیتر گاز خالص تولیدی و 2.2، ضریب استوکیومتری است.

شمارش جمعیت پروتوزوآ

تکنیک اصلی شمارش پروتوزآ بر اساس روش شمارش Dehority (2003) انجام گرفت. در این آزمایش با استفاده از نرم‌افزار دینوکاپچر (Dino Capture) نصب‌شده روی کامپیوتر و میکروسکوپ نوری (Car ZEISS Standard 20,Germany) و چامبر هموسیتومتر (Hemocytometer Counting) سه زیر خانوادهٔ *Entodiniinae*، *Ophryscolecinae*، *Diplodiniinae* و یک خانوادهٔ *Isotrichdae* شناسایی و با استفاده از رابطهٔ ۵ شمارش شد. جمعیت پروتوزوآیی در ۶ مشاهده برای هر تکرار از هر تیمار (n= ۱۸) شمارش رایانه‌ای شد.

$$N_{\mu SRF} = \frac{n}{\left[A_{mm^2} \times D_{mm} \times \frac{1}{n}\right]} \qquad (۵)$$

که در آن:

$N_{\mu SRF}$ تعداد پروتوزوآ در هر میکرولیتر مایع شکمبه، n تعداد پروتوزوآی شمارش‌شده در هر بخش از لام هموسیتومتر در هر تکرار از شمارش، A_{mm} سطح مقطع هر بخش از لام هموسیتومتر، D_{mm} عمق هر بخش از لام هموسیتومتر و 1/n مقدار رقت استفاده‌شده برای تهیهٔ محلول فرمال‌سالین است.

در این روش، مایع شکمبهٔ حاصل از محیط تخمیر با رقت ۱ به ۵ با محلول فرمال سالین (۹۰۰ میلی‌لیترآب مقطر، ۸/۱ گرم نمک طعام و ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول فرمالین ۳۶ درصد) ترکیب و تا زمان شمارش در دمای یخچال معمولی نگهداری شد.

تجزیه وتحلیل داده‌ها

داده‌های حاصل از آزمون تولید گاز (گاز تولیدی، متان، اسیدهای چرب فرار، نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک، غلظت ازت آمونیاکی، PF و تجزیه‌پذیری مادهٔ آلی) و جمعیت زیرخانوادهٔ پروتوزوآ با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 1818 (2009) برای سه تیمار (شاهد، سطوح ۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم برگ اکالیپتوس) و در قالب طرح کاملاً تصادفی برای هر یک از سه روش خشک‌کردن به‌صورت مجزا تجزیه شد. داده‌ها بر اساس مدل آماری $Y_{ijk}=\mu+T_{i+}\ \varepsilon_{ijk}$ تجزیه شدند که در آن، Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین کل، T_i اثر تیمار و ε_{ijk} مقدار باقیمانده بود. برای مقایسهٔ میانگین هر تیمار با تیمار شاهد از روش آزمون دانت و مقایسهٔ دو به دو تیمارها با یکدیگر از آزمون دانکن در دو سطح ۰/۰۵ و ۰/۰۱ استفاده شد. نرمال‌بودن توزیع داده‌های شمارش پروتوزوآ به دلیل اینکه از نوع شمارشی است، ابتدا با استفاده از روش آمار ناپارامتریک کولموگروف- اسمیرنوف (Kolmogorov smirnov test) آزمون شدند.

نتایج و بحث

آزمون تولیدگاز، متان تولیدی و پارامترهای تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی

نتایج تأثیر کاربرد برگ اکالیپتوس برودت- خشک، آون- خشک و هوا- خشک بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و گاز متان تولیدی به ترتیب در جدول‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است.

در انکوباسیون ۵۴ ساعته افزودن هر سه نوع برگ اکالیپتوس سبب کاهش خطی معنادار گاز تولیدی از بخش دیر تخمیر (P<۰/۰۵) شد. روند کاهش، با افزایش مقدار گیاه در محیط بیشتر شده و به نحوی است که مقادیر *b* را می‌توان در سه گروه تقسیم‌بندی کرد. حضور گیاه افزودنی سرعت تولید گاز را در هر سه نوع برگ گیاه اکالیپتوس کاهش داده و تنها برای برگ‌های برودت- خشک معنادار نشده است. کاربرد دو سطح گلپر به روش برون‌تنی توسط Nooriyan soroor & Rouzbehan (2014) و پنج سطح اسانس اکالیپتوس (Mirzaei *et al*., 2014) نیز نتایج مشابهی را نشان داده

است. مشابه آن، سه نوع روش خشک‌کردن نیز در مطالعهٔ Parissi *et al.* (2005) تأثیری بر شاخص گاز تولیدی از بخش دیر تخمیر نداشته است.

افزودن برگ اکالیپتوس به محیط تخمیر تنها در نوع برودت خشک توانسته است گاز کل تولیدی طی تخمیر ۵۴ ساعته را در هر دو سطح ۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم، کاهش معناداری در مقایسه با تیمار شاهد دهد (P<۰/۰۵)، ولی دو نوع برگ دیگر تنها در مقدار ۵۷/۳۱ میلی‌گرم توانسته‌اند گاز ۵۴ ساعته را کاهش دهند. به نظر می‌رسد در این تحقیق خشک‌کردن به روش برودت کمتر سبب آسیب به ترکیبات ثانویهٔ گیاه اکالیپتوس شده و بنابراین، این ترکیبات توانسته‌اند حتی در سطح کم (۲۸/۶۵ میلی‌گرم) نیز سبب کاهش گاز تولیدی شوند. کاهش معنادار گاز کل تولیدی ۵۴ ساعته در مطالعهٔ Nooriyan Soroor & Rouzbehan (2014) به روش برون‌تنی در اثر مصرف دو سطح گیاه دارای اسانس گلپر و پنج سطح اسانس اکالیپتوس در مطالعهٔ Mirzaei *et al.* (2014) نیز مشاهده شده است. استفاده از اسانس نعناع به روش برون‌تنی در بررسی Agrawal *et al.* (2009) نشان داد که گاز تولیدی در سطوح ۰/۳۳ و ۱/۰ میکرولیتر/ میلی‌لیتر افزایش داشته و با افزایش غلظت اسانس به ۲/۰ میکرولیتر در هر میلی‌لیتر محیط کشت، کاهش معناداری داشت. تأثیر مهارکنندگی اسانس بر باکتری‌های فیبروباکتر ساکسینوجنس و قارچ‌های بی‌هوازی و همچنین مهار فعالیت آنزیم‌های کربوکسی متیل سلولاز و زایلاناز را علت این کاهش دانسته‌اند. استفاده از سه نوع روش خشک‌کردن و آزمون گاز در مطالعهٔ Parissi *et al.* (2005) نشان داده است که روش برودت-خشک به دلیل اینکه کمتر سبب دناتوره‌شدن ترکیبات می‌شود، گاز بیشتری تولید کرده است.

استفاده از هر سه نوع گیاه اکالیپتوس در هر دو سطح در مقایسه با تیمار شاهد توانسته است مقدار متان تولیدی (میکرومول به ازاء هر کیلوگرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده) را به طور معناداری کاهش دهد (P<۰/۰۵). روند کاهش نشان می‌دهد که با افزایش سطح گیاه در محیط، فرایند متانوژنسیس بیشتر مهار شده است. میانگین مقدار گاز متان تولیدی در هر سه نوع گیاه اکالیپتوس برودت، آون و هوا- خشک در مقایسه با شاهد به ترتیب ۱۹/۷، ۲۱/۶، و ۱۶/۲ درصد کاهش نشان داد (جدول‌های ۱ تا ۳). احتمالاً وجود اسانس با ترکیبات ثانویه عمدتاً ۸،۱- سینتول (۷۱/۲ درصد) و آلفا- پینن (۹/۲ درصد) و تانن (Torabi *et al.*, 2011; Abravesh *et al.*, 2007) در برگ اکالیپتوس، از طریق خاصیت ضد میکروارگانیسمی خود (Hess *et al.*, 2003) سبب حذف آرکایا باکتری‌های متانوژنز یا پروتوزوآ در محیط شده است. کاهش گاز متان در اثر کاربرد اسانس اکالیپتوس (Mirzaei *et al.*, 2014)، اسانس نعناع (Agarwal*et al.*, 2009)، گیاه حاوی اسانس *Fenugreek* و *Sesbania* (Goel *et al.*, 2008) و گیاه غنی از تانن *Calliandra calothyrsus* (Hess *et al.*, 2004) نیز مشابه نتایج این تحقیق مشاهده شده است. این محققان وجود ترکیبات ثانویهٔ اسانس، ساپونین و تانن را به دلیل خاصیت ضد میکروارگانیسمی و پروتوزوآیی آن‌ها، علت کاهش متان دانسته‌اند. اینچنین ارتباط مشابه خطی بین تولید گاز کل و متانوژنزیز، در مطالعات Agrawal *et al.* (2006) در کاربرد عصارهٔ گیاه *Sapindus mukorossi* و Agrawal *et al.* (2009) نیز مشاهده شده است.

بررسی Newbold *et al.* (1995) نشان داده است که در حدود ۹ تا ۲۵ درصد ارتباط همزیستی بین آرکایاهای متانوژن و پروتوزوآی مژکدار وجود دارد و پروتوزوآی مژکدار شکمبه‌ای، H_2 مورد نیاز را به عنوان سوبسترا جهت سنتز گاز متان برای متانوژن‌ها فراهم می‌کند (Morgavi *et al.*, 2010). بنابراین به نظر می‌رسد به سبب وجود ترکیبات فنلی سازندهٔ اسانس اکالیپتوس مانند ۸،۱- سینتول (۷۱/۲ درصد) و آلفا- پینن (۹/۲ درصد) و تانن (Torabi *et al.*, 2011; Asghari & Mazaheri, 2010) و اثر مهارکنندگی آن‌ها بر پروتوزوآی مژکدار و باکتری‌های متانوژنیک (Hess *et al.*, 2003) یا کاهش باکتری‌های سلولولایتیک (Wang *et al.*, 2000)، متان تولیدی کمتر شده است (جدول‌های ۱ تا ۳).

غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) در هر دو سطح از سه نوع برگ اکالیپتوس کاربردی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش نشان داده است (آون و هوا- خشک P<۰/۰۵ و برودت- خشک P<۰/۰۱). مشاهدهٔ

نتایج کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و افزایش پروتئین میکروبی تولیدشده نشان می‌دهد رابطه‌ای خطی بین این دو شاخص وجود دارد و احتمالاً نیتروژن در تولید پروتئین میکروبی استفاده شده است. تولید آمونیاک در شکمبه به دلیل فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا (hyper-HAP=ammoniaproducing) (McIntosh *et al*., 2003) است. باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک بالا به تعداد کمی در شکمبه حضور دارند (کمتر از ۰/۰۱ جمعیت باکتریایی) اما آن‌ها فعالیت دآمیناسیون شدیدی دارند (Russell *et al*., 1988). تحقیقات Wallace (2004) نشان داده است که استفاده از ۱۰۰ میلی‌گرم/ روز از اسانس گیاهی، تا ۷۷ درصد جمعیت باکتریایی HAP را کاهش داده است.

حضور ترکیبات ثانویهٔ اکالیپتوس (اسانس) در محیط تخمیر احتمالاً یا از طریق کاهش فعالیت آنزیم اوره‌آز (Hussain & Cheeke, 1995) یا از طریق کاهش باکتری‌های تولیدکنندهٔ آمونیاک (McIntosh *et al*., 2003) و تانن این گیاه از طریق باندشدن با پروتئین و تشکیل کمپلکس پروتئین- تانن (Beauchemin *et al*., 2005) سبب کاهش نیتروژن آمونیاکی شده است. البته پروتوزوآ نیز به سبب فعالیت پروتئولیتیکی خود، در تولید نیتروژن آمونیاکی نقش دارد (Benchaar *et al*., 2008). این دسته از میکروارگانیسم‌های شکمبه به وجود اسانس و ترکیبات سازندهٔ آن حساس بوده و از طریق تغییر ساختار غشای سلولی پروتوزوآ، سبب تخریب و مرگ پروتوزوآ می‌شوند (Hess *et al*., 2003; Benchaar & Greathead, 2011). نتایج مشابهی نیز مبنی بر کم‌شدن نیتروژن آمونیاکی در اثر وجود گیاه حاوی اسانس نعناع در دوز زیاد (Agarwal *et al*., 2009)، اسانس گیاهی در جیرهٔ گوساله (McIntosh *et al*., 2003) و اسانس گیاه اکالیپتوس (Mirzaei *et al*., 2014) در پنج سطح، بر نیتروژن آمونیاکی و افزایش پروتئین میکروبی گزارش شده است.

ترکیبات مؤثرهٔ اکالیپتوس در هر سه نوع گیاه نتوانسته است در مقدار مادهٔ آلی تجزیه‌شدهٔ برون‌تنی در بین تیمارها تغییر معناداری ایجاد کند. به نظر می‌رسد ترکیبات مؤثرهٔ اکالیپتوس توانایی تغییر جمعیت میکروبی و فعالیت آنزیم‌های مؤثر بر قابلیت هضم مادهٔ آلی را ندارد. نتایج مشابهی نیز در اثر استفاده از گیاه گلپر (Nooriyan soroor & Rouzbehan, 2014) در دو سطح مشابه این بررسی مشاهده شده است. بر خلاف نتایج این تحقیق، Patra *et al*. (2006) تأثیر مهارکنندگی عصاره‌های گیاهی *T.chebula*، *E.officinalis* و *A.indica* را بر قابلیت گوارش مادهٔ آلی، ناشی از اثر ترکیبات مؤثرهٔ این گیاهان بر فعالیت باکتریایی و آنزیمی دانسته‌اند.

شاخص PF یا مادهٔ آلی تجزیه‌شده به ازاء گاز تولیدی تنها در سطح ۵۷/۳۱ میلی‌گرم از هر سه نوع برگ اکالیپتوس افزایش دارد (آون- خشک P<۰/۰۵، برودت و هوا- خشک P<۰/۰۱). رابطهٔ خطی و منفی بین شاخص PF و گاز متان وجود دارد (Vercoe *et al*., 2010). مقایسهٔ نتایج و بررسی رابطهٔ گاز متان با شاخص PF در این بررسی نیز نشان می‌دهد که با کاهش گاز متان و کاهش نیتروژن آمونیاکی، شاخص PF بیشتر شده است؛ به نحوی که تیمارهایی که بیشترین کاهش گاز متان را داشته است (۵۷/۳۱ میلی‌گرم) بیشترین مقدار PF را دارند. شاخص PF در این مطالعه در دامنهٔ عددی قابل قبول ۴/۶۵-۲/۷۴ بود (Blümmel *et al*., 1997) که به طور تقریبی نشان‌دهندهٔ بازده آدنوزین تری‌فسفات (Y_{ATP}) از ۱۰ تا ۳۲ است (Vercoe *et al*., 2010). بازده ۳۲ میلی‌گرم Y_{ATP} مؤید حداکثر بازده میکروبی است (Blümmel *et al*., 1997). این موضوع بر این دلالت دارد که حضور ترکیبات مؤثرهٔ اکالیپتوس سبب تأمین ATP کافی از طریق کاهش متان و هدرروی انرژی (Morgavi *et al*., 2010)، کاهش هدرروی نیتروژن از طریق مهار تولید نیتروژن آمونیاکی و احتمالاً همزمان‌سازی انرژی و منبع نیتروژن (Bach *et al*., 2005) برای رشد میکروبی شده است. نتایج مشابهی نیز توسط Mirzaei *et al*. (2014) در استفاده از اسانس اکالیپتوس، Goel *et al*. (2008) و Nooriyan Soroor & Rouzbehan (2014) در استفاده از گیاه حاوی اسانس گلپر مشاهده شده است. بنابراین مطابق با نظر Blümmel *et al*. (1997) افزایش شاخص PF در این بررسی نشان‌دهندهٔ بهبود بازده تخمیر و تولید پروتئین میکروبی است.

جدول ۱. اثر برگ برودت-خشک گیاه اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیر برآوردشده در آزمون تولید گاز

فراسنجه‌های تخمیر	سطح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)				سطح معناداری	
	شاهد	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱	SEM	خطی	درجه دو
مقادیر فعل و انفعالات تخمیر						
b	۵۸/۰^{a}	۵۰/۵^{b}	۴۳/۷^{c}	۱/۲۱	**	ns
c	۰/۰۹۰۷	۰/۰۸۶۱	۰/۰۸۲۸	۰/۰۰۱۷	ns	ns
گاز تولیدی (۵۴ ساعت)	۶۶/۵^{a}	۶۱/۰^{b}	۵۶/۳^{c}	۰/۹۵	**	ns
گاز تولیدی (۲۴ ساعت)	۵۱/۵^{a}	۳۷/۷^{b}	۳۳/۲^{b}	۱/۴۸	**	ns
گاز متان (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/ میکرومول)	۵۰۸/۳^{a}	۴۳۲/۷^{b}	۳۸۹/۷^{b}	۱۶/۰۲	*	ns
گاز متان (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میکرومول)	۴۵۰/۷^{a}	۳۸۲/۵^{ab}	۳۴۱/۰^{b}	۱۲/۵۰	*	ns
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۷/۱^{a}	۲۱/۶۵^{b}	۱۸/۲^{b}	۰/۸۲	**	**
PF (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میلی‌لیتر گاز تولیدی)	۳/۴۴^{b}	۳/۲^{b}	۵/۴^{a}	۰/۱۷	**	**
تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی (میلی‌گرم)	۱۷۷/۳	۱۷۸/۱	۱۷۷/۶	۰/۳۷	ns	ns
تودهٔ میکروبی (میلی‌گرم)	۶۳/۷^{c}	۷۹/۶^{b}	۱۰۶/۵^{a}	۳/۵۶	**	**
بازده سنتز میکروبی (درصد)	۳۶/۰^{c}	۴۵/۲^{b}	۶۰/۵^{a}	۲/۰۹	**	**
اسیدهای چرب کل (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/ میلی مول)	۵۶/۳^{a}	۴۵/۸^{b}	۴۳/۷^{b}	۱/۶۱	**	ns
اسیدهای چرب فرار (۱۰۰ مول/ مول)						
اسید استیک	۵۸/۶	۵۷/۰	۵۷/۷	۰/۲۹	ns	ns
اسید پروپیونیک	۲۲/۳	۲۴/۴	۲۴/۰	۰/۳۳	ns	ns
اسید بوتیریک	۱۹/۰	۱۸/۷	۱۸/۴	۰/۲۷	ns	ns
نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک ($C_3:C_2$)	۲/۶	۲/۳	۲/۴	۰/۰۴۳	ns	ns

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار بین تیمارهاست ($p<0/05$، $p<0/01$). SEM، خطای معیار میانگین‌ها. *b*، پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک) و*c*، نرخ تخمیر بخش b/ h.

جدول ۲. اثر برگ آون-خشک گیاه اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیر در آزمون تولید گاز

فراسنجه‌های تخمیر	سطح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)				سطح معناداری	
	شاهد	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱	SEM	خطی	درجه دو
مقادیر فعل و انفعالات تخمیر						
b	۵۸/۰^{a}	۵۲/۹^{b}	۴۳/۲^{c}	۲/۲۴	**	ns
c	۰/۰۹۰۷^{a}	۰/۰۷۸۳^{b}	۰/۰۷۶۵^{b}	۰/۰۰۳۶	ns	ns
گاز تولیدی (۵۴ ساعت)	۶۶/۵^{a}	۶۲/۹^{a}	۵۵/۲^{b}	۱/۸۴	**	ns
گاز تولیدی (۲۴ ساعت)	۵۱/۵^{a}	۴۹/۰^{a}	۳۷/۳^{b}	۲/۲۱	**	ns
گاز متان (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/ میکرومول)	۵۰۸/۳^{a}	۴۲۲/۶^{b}	۳۷۱/۴^{b}	۲/۷۰	**	ns
گاز متان (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میکرومول)	۴۵۰/۷^{a}	۳۷۶/۳^{b}	۳۳۰/۴^{b}	۱۹/۹۳	**	ns
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	۲۷/۱^{a}	۲۳/۰^{b}	۲۰/۲^{b}	۱/۴۱	*	ns
PF (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میلی‌لیتر گاز تولیدی)	۳/۴۴^{a}	۳/۶۴^{a}	۴/۳۴^{b}	۰/۱۸۸	*	ns
تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی (میلی‌گرم)	۱۷۷/۳	۱۷۸/۱	۱۷۷/۹	۰/۱۸۱	ns	ns
تودهٔ میکروبی (میلی‌گرم)	۶۳/۷^{b}	۷۰/۹^{ab}	۸۶/۲^{a}	۴/۴۶	*	ns
بازده سنتز میکروبی (درصد)	۳۶/۰^{b}	۳۹/۵^{ab}	۴۸/۳^{a}	۲/۴۸	*	ns
اسیدهای چرب کل (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/میلی‌مول)	۵۶/۳	۵۶/۲	۴۷/۱	۲/۷۳	ns	ns
اسیدهای چرب فرار (۱۰۰ مول/ مول)						
اسید استیک	۵۸/۶	۵۷/۱	۵۶/۸	۰/۵۸	ns	ns
اسید پروپیونیک	۲۲/۳^{b}	۲۵/۲^{a}	۲۴/۷^{a}	۰/۵۰	*	ns
اسید بوتیریک	۱۹/۰	۱۷/۸	۱۹/۰	۰/۴۸	ns	ns
نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک ($C_3:C_2$)	۲/۶ ^{a}	۲/۲^{b}	۲/۳^{ab}	۰/۰۷	*	ns

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار بین تیمارهاست ($p<0/05$، $p<0/01$). SEM، خطای معیار میانگین‌ها. b، پتانسیل تولید گاز از بخش نامحلول (میلی‌لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)، c، نرخ تخمیر بخش b/ h.

جدول ۳. اثر برگ هوا- خشک گیاه اکالیپتوس بر فراسنجه‌های تخمیر برآوردشده در آزمون تولید گاز

فراسنجه‌های تخمیر	سطح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)				سطح معناداری	
	شاهد	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱	SEM	خطی	درجه دو
مقادیر فعل وانفعالات تخمیر						
b	۵۸/۶^{a}	۵۲/۰^{b}	۴۴/۳^{c}	۲/۰۵	**	ns
c	۰/۰۹۰۷^{a}	۰/۰۸۴۱^{a}	۰/۰۷۴۰^{b}	۰/۰۰۲۷	**	ns
گاز تولیدی (۵۴ ساعت)	۶۶/۵^{a}	۶۹/۹^{a}	۵۸/۵^{b}	۱/۲۹	**	ns
گاز تولیدی (۲۴ ساعت)	۵۱/۵^{a}	۳۷/۹^{c}	۴۰/۷^{b}	۲/۰۷	**	**
گاز متان (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/ میکرومول)	۵۰۸/۳^{a}	۵۱۸/۲^{a}	۳۷۹/۴^{b}	۲۹/۳۴	ns	*
گاز متان (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میکرومول)	۴۵۰/۷^{a}	۴۰۹/۲^{a}	۳۴۳/۴^{b}	۲۳/۵۳	*	ns
نیتروژن آمونیاکی (لیتر/ میلی‌گرم)	۲۷/۱^{a}	۲۰/۸^{b}	۱۸/۱^{b}	۱/۶۳	*	ns
PF (میلی‌گرم مادهٔ آلی تجزیه‌شده/ میلی‌لیتر گاز تولیدی)	۳/۴۴^{b}	۳/۲۵^{b}	۴/۳۳^{a}	۰/۱۶	**	**
تجزیه‌پذیری آزمایشگاهی مادهٔ آلی (میلی‌گرم)	۱۷۷/۳	۱۷۸/۱	۱۷۶/۴	۰/۴۴	ns	ns
تودهٔ میکروبی (میلی‌گرم)	۶۳/۷^{b}	۶۱/۸^{b}	۸۹/۱^{a}	۴/۵۵	**	**
بازده سنتز میکروبی (درصد)	۳۶/۰^{b}	۳۲/۸^{b}	۴۹/۸^{a}	۲/۶۵	**	**
اسیدهای چرب کل (۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک/ میلی‌مول)	۵۶/۳^{a}	۴۴/۵^{b}	۵۲/۱^{ab}	۲/۲۱	ns	*
اسیدهای چرب فرار (۱۰۰ مول/ مول)						
اسید استیک	۵۸/۶	۵۷/۹	۵۷/۵	۰/۴۰	ns	ns
اسید پروپیونیک	۲۲/۳	۲۳/۷	۲۲/۵	۰/۴۴	ns	ns
اسید بوتیریک	۱۹/۰	۱۸/۳	۱۸/۰	۰/۳۱	ns	ns
نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک ($C3:C_2$)	۲/۶	۲/۴	۲/۳	۰/۰۶	ns	ns

حروف غیرمشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار بین تیمارهاست ($p<0/05$، $p<0/01$). SEM، خطای معیار میانگین‌ها. *b*، پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر به ازاء ۲۰۰ میلی‌گرم مادهٔ خشک)، *c*، نرخ تخمیر بخش b/h.

حضور برگ اکالیپتوس در هر دو سطح در محیط تخمیر برای هر دو نوع برودت- خشک و هوا- خشک، اسیدهای چرب فرار کل را در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داده است ($P<0/01$). هر دو سطح از اکالیپتوس آون- خشک بر غلظت اسیدهای چرب کل تأثیری نداشته است. از آنجاکه کاهش واکنش‌های متانوژنزیز احتمالاً به تجمع گاز هیدروژن در محیط تخمیر منجر می‌شود، تجمع گاز هیدروژن سبب توقف اکسیداسیون مجدد NADH و به دنبال آن باعث کم‌شدن تولید اسیدهای چرب فرار شده است (Joblin, 1999). بنابراین در این تحقیق ترکیبات مؤثرهٔ اکالیپتوس سبب جهت‌گیری واکنش‌های محیط به سمت افزایش پروتئین میکروبی و کاهش اسیدهای چرب فرار کل شده است. کاهش اسیدهای چرب فرار در مطالعهٔ Agarwal *et al.* (2009) با استفاده از اسانس نعناع Garc´ıa- Gonz´alez*et al.* (2008) با استفاده از دو گیاه *Rheum officinale* و *Frangula alnus* و در مطالعهٔ Patra *et al.* (2006) در اثر کاربرد عصارهٔ دو گیاه *T.chebula* و *A.indica* نیزگزارش شده است.

نتایج جدول‌های ۱ تا ۳ نشان می‌دهد که در مقایسه با تیمار شاهد، تنها در گیاه اکالیپتوس آون- خشک مقدار اسید پروپیونیک افزایش یافته است ($P<0/05$). بنابراین نسبت اسید استیک به اسید پروپیونیک در این گیاه در هر دو سطح‌گیاه کاهش ($P<0/05$) نشان می‌دهد. در این گیاه، با توجه به رابطهٔ تولید متان با اسید پروپیونیک، مشخص می‌شود که هرچه واکنش‌های متانوژنزیز کمتر گردد، تولید اسید پروپیونیک بیشتر می‌شود (Janssen, 2010). غذا و افزودنی‌هایی که سبب تولید H_2 کمتر به ازاء هر مول غذای تخمیری می‌شود، باعث تولید متان کمتر و پروپیونات بیشتر می‌شود (Janssen, 2010). همراه‌بودن کاهش متان و جمعیت پروتوزوآ با کمترشدن غلظت اسید استیک در مطالعهٔ Hess *et al.* (2003) و Patra *et al.* (2006) مشاهده شده است. عصارهٔ گل گاو زبان، بر غلظت اسید بوتیریک در هر چهار تیمار آزمایشی تأثیری نداشته است.

شمارش پروتوزوآ

جمعیت پروتوزوآیی کل در اثر افزودن برگ اکالیپتوس در هر سه نوع روش خشک‌کردن و در هر دو سطح مصرفی (۲۸/۶۵ و ۵۷/۳۱ میلی‌گرم) کاهش داشته است (P<۰/۰۱) (جدول ۴). خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی علیه دامنهٔ وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروتوزوآ به اثبات رسیده است (Benchaar *et al.*, 2008). از آنجایی که ترکیب اصلی مؤثرهٔ برگ اکالیپتوس اسانس است، احتمالاً این ترکیبات از طریق ایجاد پیوند با استرول غشای سلولی پروتوزوآ سبب تغییر نفوذپذیری سلول شده و در نهایت به تجزیهٔ سلولی پروتوزوآ انجامیده است (Newbold *et al.*, 1995; Benchaar *et al.*, 2008).

جدول ۴. اثر سه نوع برگ گیاه اکالیپتوس بر جمعیت پروتوزوآی مژکدار ($\times 10^5$/ml) در انکوباسیون ۲۴ ساعت سیستم بَچ

پروتوزوآ	سطوح گیاه افزودنی (میلی‌گرم)			سطح معناداری
	۰ (شاهد)	۲۸/۶۵	۵۷/۳۱	
زیرخانواده	برگ برودت- خشک			
اِنتودینینه	۱/۵۸^{a}	۰/۹۶^{b}	۱/۰۰^{b}	**
اُفریواسکلوسینه	۰/۵۰^{a}	۰/۵۰^{a}	-	ns
دیپلو دینینه	۰/۵۰^{a}	۰/۵۰^{a}	۰/۵۵^{a}	ns
ایزوتریچیدا (خانواده)	۰/۷۵^{a}	۰/۵۵^{b}	۰/۵۰^{b}	*
پروتوزوآی کل	۲/۲۱^{a}	۱/۰۸^{b}	۱/۳۳^{b}	**
	برگ آون- خشک			
انتودینینه	۱/۵۸^{a}	۰/۸۹^{b}	۰/۸۸^{b}	**
اُفریواسکلوسینه	۰/۵۰^{a}	–	۰/۵۰^{a}	ns
دیپلو دینینه	۰/۵۰^{a}	۰/۵۰^{a}	۰/۵۵^{a}	ns
ایزوتریچیدا (خانواده)	۰/۷۵^{a}	۰/۵۸^{b}	۰/۵۰^{b}	*
پروتوزوآی کل	۲/۲۱^{a}	۱/۱۳^{b}	۱/۵۱^{b}	**
	برگ هوا- خشک			
انتودینینه	۱/۵۸^{a}	۰/۸۳^{b}	۰/۸۸^{b}	**
اُفریواسکلوسینه	۰/۵۰^{a}	۰/۵۰^{a}	۰/۵۰^{a}	ns
دیپلو دینینه	۰/۵۰^{a}	۰/۵۵^{a}	۰/۵۰^{a}	ns
ایزوتریچیدا (خانواده)	۰/۷۵^{a}	۰/۵۰^{b}	۰/۵۸^{b}	*
پروتوزوآی کل	۲/۲۱^{a}	۱/۰۸^{b}	۱/۳۸^{b}	**

حروف غیر مشابه در هر سطر نشان‌دهندهٔ تفاوت معنادار بین تیمارهاست (p<۰/۰۵، p<۰/۰۱). SEM: خطای معیار میانگین‌ها.

نتایج مشابهی نیز توسط Agarwal *et al.* (2009) و Goel *et al.* (2008) گزارش شده است. گرچه برخلاف نتایج تحقیق حاضر، استفاده از ترکیبی از چند اسانس گیاهی در مطالعهٔ Newbold *et al.* (2004) و McIntosh *et al.* (2003) تأثیر کاهشی بر جمعیت پروتوزوآ نداشته است.

در یک مقالهٔ مروری توسط Morgavi *et al.* (2010) گزارش شده است که چون همهٔ انواع پروتوزوآ در تولید متان نقش یکسانی ندارند، بنابراین بررسی رابطهٔ پروتوزوآ و تولید متان، بر اساس هر یک از انواع پروتوزوآ به تفکیک زیرخانواده یا جنس و گونه نتایج دقیق‌تر و مطمئن‌تری ارائه می‌کند. بنابراین، در این بررسی اثر برگ اکالیپتوس بر جمعیت چهار زیرخانواده و یک خانوادهٔ پروتوزوآ مطالعه شد. نتایج نشان می‌دهد که ترکیبات مؤثرهٔ برگ اکالیپتوس (عمدتاً ۸،۱- سینئول (۷۱/۲ درصد) و آلفا-پینن (۹/۲ درصد)) بر جمعیت زیرخانوادهٔ انتودینینه (P<۰/۰۱) و ایزوتریچیدا (P<۰/۰۵) تأثیر کاهشی معنادار داشته است و بر سایر زیرخانواده‌های مورد مطالعه (افریواسکلوسینه ودیپلودینینه) تأثیری نداشته است. به نظر می‌رسد ترکیبات حلقوی اسانس برگ اکالیپتوس توانسته است از طریق دخالت در انتقال الکترون، تغییر غلظت یون، فسفوریلاسیون و دیگر واکنش‌های وابسته به آنزیم سبب دفوناسیون جمعیت پروتوزوآیی گردد (Benchaar *et al.*, 2008). همچنین در مطالعهٔ گیاه اکالیپتوس Sallam *et al.* (2010) نشان

دادند که این گیاه دارای تأثیرات ضد پروتوزوآیی است. تأثیر اسانس اکالیپتوس (Mirzaei *et al*., 2014) در بز به روش برون‌تنی و گیاه گلپر (Nooriyan Soroor & Rouzbehan, 2014) نیز مشخص شده است که ترکیبات مؤثرهٔ آن‌ها تأثیر مهارکنندگی قوی بر پروتوزوآی مژکدار به‌ویژه زیرخانوادهٔ انتودینینه داشته است. در بررسی حاضر نیز کاهش جمعیت پروتوزوآ و کاهش متان، مؤید اثر ضد پروتوزوآیی ترکیبات مؤثرهٔ اکالیپتوس است. گزارش‌های بسیاری در خصوص تأثیر کاهشی ترکیبات مؤثرهٔ گیاهی متنوع بر جمعیت پروتوزوآیی و به دنبال آن کاهش متان وجود دارد (Hu *et al*., 2005;Patra *et al*., 2006; Pen, 2007; Goel *et al*., 2008).

با توجه به کاهش شدید جمعیت خانوادهٔ ایزوتریچیدا و زیرخانوادهٔ انتودینینه و همچنین کاهش گاز متان در حضور برگ اکالیپتوس، به نظر می‌رسد این دو گروه بیشترین رابطه را با کاهش متان دارند. در مطالعهٔ مروری Morgavi *et al*. (2010) نیز چنین رابطه‌ای بیان شده است.

نتیجه‌گیری کلی

برگ گیاه اکالیپتوس در شرایط برون‌تنی، باعث کاهش گاز متان و نیتروژن آمونیاکی تولیدی همراه با بهبود شاخص PF گردید. مقایسه سه نوع روش خشک‌کردن نشان داد که هر سه نوع روش، توانایی بهبود تخمیر شکمبه دارند؛ البته روش آون- خشک مؤثرتر بود، اما چون روش هوا- خشک آسان‌تر و کم‌هزینه‌تر است، توصیه می‌گردد. از آن‌جایی‌که شرایط این آزمایش برون‌تنی بوده است، برای تأیید نتایج، بهتر است تأثیر برگ و اسانس این گیاه روی دام زنده نیز بررسی شود.

REFERENCES

1. Abravesh, Z., Sefidkon, F. & Assareh. M.H. (2007). Extraction and identification of essential oil components of five *Eucalyptus* species in warm zones of Iran. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants.* 23, 323-330. (in Farsi)
2. Agarwal, N., Kamra, D.N., Chaudhary, L.C. & Patra, A.K. (2006). Effect of *Sapindus mukorossi* extracts on *in vitro*methanogenesis and fermentation characteristics in buffalo rumen liquor. *Journal Applied Animal Research*, 30, 1-4.
3. Agarwal, N., Shekhar, C., Kumar, R., Chaudhary, L.C. & Kamra, D.N. (2009). Effect of peppermint (*Mentha piperita*) oil on *in vitro* methanogenesis and fermentation of feed with buffalo rumen liquor. *Animal Feed Science and Technology*, 148, 321-327.
4. Asghari, J. & Mazaheritehrani, M. (2010). Extraction of tannin from *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and trimyristin from *Myristica fragrans* Houtt by using microwave irradiation. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 26, 185-195.
5. Association of Official Analytical Chemists (AOAC) (1990). Official Methods of Analysis, (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
6. Bach, A., Calsamiglia, S. & Stern, M. D. (2005). Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal Dairy Science*, 88: (e. suppl.): e9-e21.
7. Beauchemin, K. A., McGinn, S. M. Martinez, T. F. & McAllister, T. A. (2005). Use of condensed tannin extract from quebracho trees to reduce methane emissions from cattle. *Journal Animal Science*. 85, 1990-1996.
8. Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. & Beauchemin, K.A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228.
9. Benchaar, C. &Greathead, H. (2011). Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. *Animal Feed Science and Technology*, 166-167, 338-355.
10. Blümmel, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (1997). *In vitro* gas production: a technique revisited, *Journal Animal Physiology and Nutrition*, 77, 24-34.
11. Broderick, G.A.& Kang, J.H. (1980).Automated simultaneous determinations of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal Dairy Science*, 63, 64-75.
12. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.
13. Cottyn, B.G. & Boucque, C.V. (1968). Rapid method for the gas-chromatographic determination of volatile fatty acids in rumen fluid. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 16,105-107.
14. Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology. First published. British Library Cataloguing in Publication Data.
15. Eckard, R.J., Grainger, C. & de Klein. C.A.M. (2010). Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review. *Livestock Science*, 130, 47-56.

16. Garc´ıa-Gonz´alez, R., L´opez, S., Fern´, M. & Gonz´alez, J.S. (2008). Dose response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminalmethane production *in vitro*. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 319-334.
17. Goel, G., Makkar, H. P.S. & Becker, K. (2008). Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology*, 147, 72-89.
18. Hess, H.D., Kreuzer, M., Diaz, T.E., Lascano, C.E., Carulla, J.E., Soliva, C.R. & Machmuller, A. (2003). Saponin rich tropical fruits affect fermentation and methanogenesis in faunted and defaunated rumen fluid. *Animal Feed Science and Technology*, 109, 79-94.
19. Hess, H.D., Valencia, F.L., Monsalve, L.M., Lascano, C.E. & Kreuzer, M. (2004). Effects of tannins in *Calliandra calothyrsus* and supplemental molasses on ruminal fermentation *in vitro*. *Journal of Animal Feed Science and technology.* 13 (Suppl. 1), 95-98.
20. Holter, J.B. & Yong, A.J. (1992). Methane prediction in dry and lactating Holstein cows. *Journal Dairy Science*, 75, 2165-2175.
21. Hristov, A.N., Ropp, J.K. Zaman, S. & Melgar, A. (2008). Effects of essential oils on *in vitro* ruminal fermentation and ammonia release. *Animal Feed Science and Technology*, 144, 55-64.
22. Hu, W.L., Liu, J.X., Yr, J.A., Wu, Y.M. & Guo, Y.Q. (2005). Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology*, 120, 333-339.
23. Hussain, I. & Cheeke, P.R. (1995). Effect of *Yucca Scidigera* extract on rumen and blood profiles of steers fed concentrate- or roughage-based diets. *Animal Feed Science and Technology*, 51, 231-242.
24. Joblin, K.N. (1999). Ruminal acetogens and their potential to lower ruminant methane emissions. *Australian. Journal Agriculture Research*, 50, 1307-1313.
25. Janssen, P.H. (2010). Influence of hydrogen on rumen methane formation and fermentation balances through microbial growth kinetics and fermentation thermodynamics.*Animal Feed Science and Technology*, 160, 1-22.
26. Johnson, K.A. & Johnson, D.E. (1995). Methane emission from cattle. *Journal of Animal Science*, 73, 2483-2492.
27. Makkar, H.P.S. (2010). *In Vitro* Screening *of Feed Resourcesfor Efficiency of Microbial Protein Synthesis* (pp. 106-144). In: *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), New York: Springer.
28. Mao, H.L., Wang, J.K., Zhou, Y.Y. & Liu, J.X. (2010). Effects of addition of tea saponins and soybean oil on methane production, fermentation and microbial population in the rumen of growing lambs. *Livestock Science*, 129, 56-62.
29. McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A. & Newbold, C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 69, 5011-5014.
30. Menke, K.H. & Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *invitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research Development*, 28, 7-55.
31. Mirzaei, S., Moeini, M.M., Hozhabri, F. & Nooriyan Soroor, M.E. (2014). The *in vitro* effects of three medicinal plants on ruminal fermentation parameters and methane reduction. MSc Thesis. Agricultur Faculty. Razi University. Iran. (in Farsi)
32. Morgavi, D.P., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C.J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, 4 (7), 1024-1036.
33. Moss, A.R., Jouany, J. & Newbold, J. (2000). Methane production by ruminants: its contribution to global warming. *Annual Zootech*, 49, 231-253.
34. National Research Council. (2007). Nutrient Requirments of Small Ruminants. National academy Press, Washington, DC., USA.
35. Newbold, C.J., Lassalas, B. & Jouany, J.P. (1995). The importance of methanogens associated with ciliate protozoa in ruminal methane production *in vitro*. *Letter Applied Microbial*, 21, 230-234.
36. Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Riccardo Losa. & Wallace. R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oilcompounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 105-112.
37. Nooriyan Soroor, M.E. & Rouzbehan,Y. (2014). The influence of Golpar (*Heracleum persicum*)on *in vitro* rumen fermentation parameters and methane production. *Iranian journal of Animal Science*, 44, 385-395. (in Farsi)
38. Omidbeygi, M.R. (2010). *Medical Plant*. (First ed) I.R of Iran: Behnashr Press. (in Farsi)
39. Orskov, E.R. & McDonal, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal Agriculture Science*, 92, 499-503.

40. Parissi, Z.M., Papachristou, T.G. & Nastis. A.S. (2005). Effect of drying method on estimated nutritive value of browse species using an in vitro gas production technique. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124,119-128.
41. Patra, A.K., Kamra, D.N. & Agarwal, N. (2006). Effect of plant extracts on *in vitro* methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128, 276-291.
42. Pen, B. (2007). *Studies on Manipulation of Ruminal Fermentation and Methanogenesis by Natural Products*. Ph.D. dissertation, Major Chair of Animal Production the United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University.
43. Russell, J.B., Strobel, H.J. & Chen, G. (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Applied Environmental Microbiology*, 54, 872-877.
44. Sallam, S.M.A., da Silve Bueno, I.C., Godoy, P.B., Nozella, E.F., Vitti, D.M.S.S.& Abdalla, A.L. (2010).Ruminal fermentation and tannins bioactivity of some browsesusing a semi-automated gas production technique. Trop. Subtrop. Agroecosys. 12, 1.
45. SPSS. (2009). SPSS Version 18.0 for Windows. SPSS Inc., USA.
46. Torabi Sagvand, B., Naderi Hadji Bagher Kandi, M. & Sadeghzadeh, L. (2001). Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of ten *Eucalyptus* species against *Micrococcus loteus* and *Escherichia coli. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 27, 440-449. (in Farsi)
47. Vercoe,E.P., Makkar,H.P.S. & Schlink,A.C. (2010a).*In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-Nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies (Ed.), *In Vitro Screening of Feed Resources for Efficiency of Microbial Protein Synthesis* (pp. 106-144). New York: Springer.
48. Wallace, R.J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites.Proceedings of *the Nutrition Society*, 63, 621-629.
49. Wang, Y., McAllister, T.A., Yanke, L.J. & Cheeke, P.R. (2000). Effect of steroidal saponins from *Yucca schidigera* extract on ruminal microbes. *Journal Applied Microbial*, 88, 887-896.
50. Xu, J., Zhou, F., Ji, B. P., Pei, R. S. & Xu, N. (2008). The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letter Applied Microbiology*, 47, 174-179.