نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۲۰، پاییز ۱۳۹۷
ص‌ص: ۱۰۳~۱۱۶

اثر سطوح مختلف اسانس لیموترش (*Citrus lemon*) بر تخمیر شکمبه‌ای گوساله‌های نر هلشتاین و قابلیت هضم آزمایشگاهی

- **بهریه شاهی**
دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشگاه ارومیه
- **رسول پیرمحمدی** (نویسنده مسئول)
دانشیار دانشگاه ارومیه.
- **عبدالرحمان امینی**
دانشجوی دکتری دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت : آذر ۱۳۹۵ تاریخ پذیرش : دی ۱۳۹۶

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۴۴۴۳۱۳۹۰
Email: r.pirmohammadi@urmia.ac.ir

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/asj.2018.108638.1345

چکیده

هدف از انجام این پژوهش، بررسی اثرات سطوح مختلف اسانس لیموترش بر قابلیت هضم خوراک به روش آنکوم و فراسنجه‌های شکمبه‌ای گوساله‌های نر هلشتاین بود. به این منظور چهار رأس گوساله نر هلشتاین فیستوله‌گذاری شده (میانگین وزن بدن،۲۰±۶۵۰ کیلوگرم) برای پنج دوره‌ی ۱۷ روزه و در قالب یک طرح بلوک کامل تصادفی به صورت چرخشی به ۵ جیره آزمایشی شامل جیره پایه بدون مواد افزودنی (شاهد)، جیره پایه + ۳۰۰ میلی‌گرم مونسین، جیره پایه + ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش در روز اختصاص داده شده بود. سطح ۸۰۰ میلی‌گرم در روز اسانس لیموترش، میزان قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را کاهش داد، ولی سایر سطوح اسانس لیموترش بی‌تأثیر بودند و سطوح ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش درجیره، غلظت نیتروژن آمونیاکی و سطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم نسبت استات به پروپیونات در شکمبه را کاهش دادند . اما تیمارهای آزمایشی بر تعداد پروتوزوآ و میزان pH مایع شکمبه بی تاثیر بود. به واسطه بهبود تغییرات برخی فراسنجه‌های شکمبه‌ای در این آزمایش می‌توان نتیجه گرفت که جیره‌های حاوی اسانس لیموترش در مقایسه با جیره‌های حاوی مونسین عملکرد مناسب‌تری داشتند. اما با این وجود، انجام مطالعات بیشتر در زمینه تأثیر اسانس لیموترش روی عملکرد دام ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: اسانس لیموترش، تخمیر شکمبه‌ای، گوساله نر هلشتاین، قابلیت هضم آزمایشگاهی

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 120 pp: 103-116

Effects of Citrus Lemon essential oil levels on ruminal fermentation of Holstein calves and In vitro digestibility

By: Shahi, B. pirmohammadi, R*. Amini, Ab.
University of urmia, I.R.

Received: November 2016 **Accepted: December 2017**

The objective of this study was to investigate the effects of different levels of *Citrus Lemon* essential oil on in vitro nutrient digestibility and rumen microbial fermentation in male Holstein calves. four fistulated male Holstein calves (average body weight 650± 20 kg) were allocated to five experimental diets including basic diet without additive (control), control + 300 mg Monensin, control + 600, 800 and 1000 mg lemon essential/d for five periods of 17 days and in a change-over complete randomized block design. Inclusion of 800 mg lemon essential/d decreased digestibility of dry and organic matter, but the other treatments did not have a significant effect. Inclusion of 600 and 800 mg/d of *Citrus Lemon* essential oil significantly decreased rumen N-NH3 concentration and the diet containing of 1000 mg/d decreased acetate to propionate ratio in rumen. The treatments had no significant effects on protozoa count and rumen pH. Generally, the results of this study showed that diets containing *citrus lemon* essential oil showed better performance in comparison to Monensin based diets. More investigations should be done to evaluate the effects of lemon essential oil on performance of ruminants.

Key words: Citrus Lemon essential oil, ruminal fermentation, Holstein calves, digestibility

مقدمه

عملکرد حیوان نشخوارکننده بستگی مستقیم به اکوسیستم شکمبه و فعالیت جمعیت میکروبی آن دارد. اکوسیستم پیچیده شکمبه متشکل از میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله باکتری، قارچ و پروتوزوآ می‌باشد (Lee و همکاران، ۲۰۰۰) که نقش مهمی در فرایند تخمیر در شکمبه ایفا می‌کنند. حجم بالایی از میکروارگانیسم‌های شکمبه را پروتوزوآ تشکیل داده و نقش مهمی در هضم، تثبیت pH، شکستن پروتئین‌های غذا و سلول‌های باکتری ایفا می‌کنند (Dehority، ۲۰۰۵). از جمله عوامل تعیین-کننده بر نوع و فلور میکروبی دستگاه گوارش عوامل محیطی و تغذیه می‌باشند (بهجتیان اصفهانی و همکاران، ۱۳۸۶). در میان افزودنی‌های غذایی جیره‌های دام‌های پرواری، می‌توان از یونوفرها نام برد. یونوفرها انتشار یون‌ها را از غشاء لیپیدی باکتری‌ها و پروتوزوآ تسهیل می‌کنند (Nagaraja، ۱۹۹۵ ؛ Mcguffey و همکاران، ۲۰۰۱). استفاده نامنظم و زیاد آنتی‌بیوتیک‌ها در غذای حیوانات و با هدف پیشگیری از بروز بیماری می‌تواند منجر به مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها شود (بهجتیان اصفهانی و همکاران، ۱۳۸۶). یکی از راههای جلوگیری از این مشکل، استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک-ها به منظور تعدیل و تنظیم تخمیر شکمبه‌ای می‌باشد (Calsamiglia و همکاران، ۲۰۰۷). با توجه به این‌که مواد مؤثر موجود در داروهای گیاهی و همراه بودن آنها با مواد دیگر، پیوسته از یک حالت تعادل بیولوژیک برخوردار می‌باشند، بنابراین در

بدن انباشته نشده و اثرات جانبی نیز نخواهد داشت، از این رو برتری قابل ملاحظه‌ای نسبت به داروهای شیمیایی دارند (پوربایرامیان و همکاران، ۱۳۹۱). فراورده‌های فرعی مرکبات شامل تفاله، عصاره و اسانس‌ها هستند (Bampidis و Robinson، ۲۰۰۶). در حقیقت اسانس‌ها باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را مهار می‌کنند ولی مونسین تنها تعدای از باکتری-های گرم مثبت را مهار می‌کند (Helander و همکاران، ۱۹۹۸). مطالعات (Newbold و همکاران، ۲۰۰۴: Molero و همکاران، ۲۰۰۴ و McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳) نشان داده است که اسانس مخلوط حاوی تیمول، لیمونین و گواجاکول (guaiacol) می‌تواند متابولیسم نیتروژن شکمبه را تغییر دهد. Castillejos و همکاران در سال (۲۰۰۵) مشاهده کردند که افزودن اسانس حاوی تیمول، لیمونین و گوایاکول به دو جیره مختلف (علوفه بالا و کنسانتره بالا) در سامانه مداوم در طول ۸ روز غلظت اسیدهای چرب فرار کل را افزایش دادهولی اثری روی متابولیسم نیتروژن نداشت. ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس مخلوط حاوی لیمونین در گاو گوشتی، باعث افزایش غلظت پروپیونات و کاهش غلظت‌های استات، بوتیرات و نسبت استات به پروپیونات شد(Castillejos و همکاران، ۲۰۰۷). اسانس لیموترش به دلیل حضور مواد بیولوژیک فعال مثل فلاوونوئیدها[1]، ترپن‌ها[2] و کومارین[3]ها و لیمونین[4] از گروه لیمونوئید[5] دارای فعالیت ضد میکروبی است. به طور کلی، ترکیبات فنلی به واسطه حضور گروه‌های هیدروکسیل در ساختمان فنلی خود فعالیت‌های ضد میکروبی بالایی نشان می‌دهند (Tepe و همکاران، ۲۰۰۵). با توجه به عدم شناخت کافی در رابطه با ارزش تغذیه‌ای، محدودیت‌ها و مقدار مناسب استفاده از ضایعات مرکبات به ویژه اسانس لیموترش در جیره توسط دامداران و همچنین عدم وجود تحقیقات مناسب و کاربردی در این زمینه در کشور، انجام پژوهش حاضر ضروری به نظر می‌رسد.

مواد و روش‌ها

حیوانات مورد استفاده و تیمارها: این تحقیق روی ۴ رأس گوساله نر هلشتاین فیستولاگذاری شده شکمبه‌ای با میانگین وزن بدن ۲۰±۶۵۰ کیلوگرم انجام شد. جیره‌های آزمایشی بر اساس جداول استاندارد احتیاجات غذایی گاوهای پرواری NRC (۲۰۰۰) در حد نگهداری گوساله‌ها و با استفاده از نرم افزار UFFDA تنظیم شد (جدول ۱). تیمارهای مورد استفاده در این تحقیق شامل: ۱- جیره پایه بدون مواد افزودنی (شاهد)، ۲- جیره پایه + ۳۰۰ میلی‌گرم مونسین، ۳- جیره پایه +۶۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش، ۴- جیره پایه + ۸۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش و ۵- جیره پایه +۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش بودند. گوساله‌ها در دو نوبت (۸ صبح و۴ بعدازظهر) و در پنج دوره آزمایشی ۱۷ روزه شامل، ۱۰ روز عادت‌دهی و ۷ روز نمونه‌برداری تغذیه شدند. نصف مقدار اسانس لیموترش روزانه در هر وعده در هنگام ارائه خوراک روی کنسانتره اسپری شد (Simitzis و همکاران، ۲۰۰۵ و Nam و همکاران، ۲۰۰۶). گوساله‌ها درمدت انجام آزمایش در قفس‌های انفرادی نگهداری و به طور آزاد به خوراک، بلوک‌های نمک و مواد معدنی و آب آشامیدنی تمیز دسترسی داشتند.

تهیه اسانس لیموترش و مونسین: اسانس لیموترش مورد آزمایش از شرکت باریج اسانس کاشان (ماده مؤثره اسانس، لیمونین به میزان ۶۵ درصد) و مونسین از شرکت بهرود اترک تهیه و مقدار مورد نیاز با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، وزن و به جیره افزوده شد.

تعیین قابلیت هضم مواد مغذی به روش آنکوم (Ancom): برای تعیین قابلیت هضم به روش آنکوم تقریبا ۵ گرم خوراک (آسیاب شده با غربال ۲ میلی‌متری) را در داخل کیسه-های نایلونی با ابعاد ۵۰×۱۰ سانتی‌متر و قطر سوراخ‌های ۵۰ میکرومتر ریخته و حدود نیم ساعت قبل از هضم بی‌هوازی، یک میلی‌لیتر محلول ۴ درصد کلرید کلسیم به هر لیتر بزاق مصنوعی (بافر) اضافه شد (McDougall و همکاران، ۱۹۴۸) که با وارد کردن گاز دی اکسید کربن به مدت ۱۰ تا ۱۵ دقیقه pH محلول به ۶/۹ تا ۷ کاهش داده شد.

[1] Flavonoids
[2] terpenes
[3] Coumarin
[4] limonin
[5] limonoid

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه

مواد خوراکی	(درصد ماده خشک)
یونجه خشک شده	۶۲/۵۰
سیلاژ ذرت با دانه زیاد	۳۴/۳۸
دانه جو	۳/۱۲
ترکیب شیمیایی (محاسبه شده)	
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری بر کیلوگرم)	۱/۱۵
ماده خشک (درصد)	۷۲/۶۱
ماده آلی (درصد)	۹۱/۲۸
خاکستر (درصد)	۸/۷۱
فیبر نامحلول در شوینده خنثی (درصد)	۴۵/۴۰
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)	۳۵/۵۹
چربی خام (درصد)	۲/۳۳
پروتئین خام (درصد)	۱۰/۲۲

سپس بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به نسبت ۴ به ۱ (۴ حجم بزاق با ۱ حجم شیرابه) با هم مخلوط و به این محلول هم به مدت ۴ تا ۵ دقیقه گاز دی اکسید کربن وارد کردیم. سپس ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط تهیه شده از بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به هر یک از بطری‌های شاهد و نمونه اضافه کرده و پس از بستن درب آنها، مجدداً به مدت ۱۵ ثانیه گاز دی اکسید کربن وارد و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه آنکوم با دور ثابت چرخش در ۳۹ درجه انکوباسیون شدند. برای محاسبه مقدار خطا از نمونه شاهد که تنها شامل مایع شکمبه و آنزیم پپسین و اسید کلریدریک بود، استفاده شد (Molina Alcaide و همکاران، ۲۰۰۳). ماده خشک، ماده آلی نمونه‌های دستگاه آنکوم توسط روش AOAC (۱۹۹۰) انجام شده بود.

تخمیر شکمبه‌ای: نمونه مایع شکمبه در روزهای هفدهم هر دوره، قبل از خوراک صبح (ساعت صفر) و در ساعات ۲، ۴ و ۶ پس از خوراک دادن، با استفاده از پمپ خلا از طریق فیستولا گرفته شد (Krizsan و همکاران، ۲۰۱۰)، و pH مایع شکمبه بلافاصله با استفاده از دستگاه pH متر(metrohm 827, USA) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه مایع شکمبه با استفاده از پارچه ۴ لایه‌ی متقال صاف و بر اساس روش Reynal و همکاران (۲۰۰۷)، دو نمونه از آن جهت اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی با اسید سولفوریک ۵۰ درصد (با نسبت ۱ به ۵۰ اسید سولفوریک به مایع شکمبه) مخلوط گردید و بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ipharraguerre و همکاران، ۲۰۰۷). اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه به روش Ottenstein و Bartley (۱۹۷۱)، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips PU4410, Cam bridge, UK) با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵×۴/۶ میلی‌متر) انجام شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه نیز بر اساس روش Smith و Murphy (۱۹۹۳) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (Rc 501, USA) اندازه گیری شد.

سپس بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به نسبت ۴ به ۱ (۴ حجم بزاق با ۱ حجم شیرابه) با هم مخلوط و به این محلول هم به مدت ۴ تا ۵ دقیقه گاز دی اکسید کربن وارد کردیم. سپس ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط تهیه شده از بزاق مصنوعی و شیرابه شکمبه به هر یک از بطری‌های شاهد و نمونه اضافه کرده و پس از بستن درب آنها، مجدداً به مدت ۱۵ ثانیه گاز دی اکسید کربن وارد و به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه آنکوم با دور ثابت چرخش در ۳۹ درجه انکوباسیون شدند. برای محاسبه مقدار خطا از نمونه شاهد که تنها شامل مایع شکمبه و آنزیم پپسین و اسید کلریدریک بود، استفاده شد (Molina Alcaide و همکاران، ۲۰۰۳). ماده خشک، ماده

آلی نمونه‌های دستگاه آنکوم توسط روش AOAC (۱۹۹۰) انجام شده بود.

تخمیر شکمبه‌ای: نمونه مایع شکمبه در روزهای هفدهم هر دوره، قبل از خوراک صبح (ساعت صفر) و در ساعات ۲، ۴ و ۶ پس از خوراک دادن، با استفاده از پمپ خلا از طریق فیستولا گرفته شد (Krizsan و همکاران، ۲۰۱۰)، و pH مایع شکمبه بلافاصله با استفاده از دستگاه pH متر(metrohm 827, USA) اندازه‌گیری شد. سپس نمونه مایع شکمبه با استفاده از پارچه ۴ لایه‌ی متقال صاف و بر اساس روش Reynal و همکاران (۲۰۰۷)، دو نمونه از آن جهت اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی با اسید سولفوریک ۵۰ درصد (با نسبت ۱ به ۵۰ اسید سولفوریک به مایع شکمبه) مخلوط گردید و بلافاصله در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Ipharraguerre و همکاران، ۲۰۰۷). اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه به روش Ottenstein و Bartley (۱۹۷۱)، توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips PU4410, Cam bridge, UK) با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵×۴/۶ میلی‌متر) انجام شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه نیز بر اساس روش Smith و Murphy (۱۹۹۳) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (Rc 501, USA) اندازه گیری شد.

شمارش پروتوزوآ: جهت بررسی جمعیت پروتوزوآ، محتویات شکمبه (۲۰ میلی‌لیتر) در ساعات صفر، ۲، ۴ و ۶ بعد خوراک‌دهی از فیستوله‌ی گوساله‌ها گرفته شد. شمارش تعداد پروتوزوآ در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه از روش تغییر یافته Veira و همکاران (۱۹۸۳)، بدون رنگ-آمیزی و با استفاده از لام هیموسیتومتر استفاده شد. برای ثابت کردن تک‌یاخته‌ها از محلول ثابت کننده فرمالدئید ۵۰ درصد در محلول کلرور سدیم ۰/۹ درصد استفاده شد. برای تسهیل در امر شمارش، مایع شکمبه به میزان ۱:۱ برابر رقیق شده و یک قطره از آن روی لام ریخته و با بزرگنمایی ۱۰۰ و عدسی ۱۰ شمارش شد.

روش آماری آنالیز داده‌ها: طرح آماری مورد استفاده در تعیین قابلیت هضم مواد مغذی (به روش آنکوم) و ارزیابی فراسنجه‌های مایع شکمبه به ترتیب طرح کاملا تصادفی(مدل شماره۱، در این مدل Yij مقدار هر مشاهده، μ میانگین جامعه، δ_i اثر تیمار و ϵ_{ij} اثر اشتباه آزمایشی است) و طرح بلوک کامل تصادفی (مدل شماره ۲؛ در این مدل δ_i اثر بلوک (حیوان) و δ_j اثر تیمار است)، بود. آنالیزهای آماری با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۳) و رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها به ترتیب با آزمون توکی و چند دامنه‌ای دانکن و در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

مدل شماره ۱: $Y_{ij} = \mu + \delta_i + \epsilon_{ij}$

مدل شماره ۲: $Y_{ij} = \mu + \delta_i + \delta_j + \epsilon_{ij}$

نتایج و بحث

قابلیت هضم مواد مغذی: قابلیت هضم ماده خشک (جدول ۲) سطح ۶۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش در روز از نظری آماری نسبت به سطوح ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش بالاتر بود ($P<۰/۰۵$) ولی با تیمار شاهد و مونسین تفاوت معنی‌داری نداشت، هر چند که از نظر عددی بالاتر از این دو تیمار بود. اسانس‌های گیاهی متابولیت‌های ثانویه حاوی اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که ممکن است سبب کاهش مصرف ماده خشک گردیده و تخمیر و هضم شکمبه‌ای ماده آلی را تحت تأثیر قرار دهند، زیرا با لیپیدهای گیاهی یا مواد آلی جفت شده و باعث تغییر مکان هضم مواد مغذی از شکمبه به روده می‌شوند (افشار حمیدی و همکاران، ۱۳۹۲). نتایج حاصل از قابلیت هضم تفاله-های عمل آوری نشده و عمل آوری شده با مخمر ساکارومایسزسرویسیا مشخص کرد که با عمل آوری تفاله لیمو بوسیله مخمر، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک به طور معنی داری کاهش یافت. در حالی که عمل آوری تأثیر معنی داری بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی تفاله‌ها نداشت (دادور و همکاران، ۱۳۸۹).

Castillejosو همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند سطوح صفر و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس مخلوط حاوی لیمونین به روش آزمایشگاهی (مایع شکمبه گرفته شده از گاو) تاثیری بر قابلیت هضم ماده آلی و ماده خشک نداشت. Castillejos و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که در سیستم کشت مداوم[۶] با استفاده از مایع شکمبه گاو شیری سطوح ۰، ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر مخلوط اسانس‌های روغنی که حاوی تیمول و لیمونین بود، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را تحت تأثیر قرار نگرفت، که موافق نتایج قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در آزمایش حاضر می‌باشد.

[۶] continuous culture

جدول۲- اثر مقادیر مختلف اسانس لیموترش و مونسین بر مواد مغذی به روش آنکوم

مواد مغذی	تیمارها (میلی‌گرم در روز)					SEM	P-value
	شاهد	مونسین	اسانس لیموترش				
		۳۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰		
ماده خشک (درصد)	۴۶/۵۰ ab	۴۸/۹۰ ab	۵۲/۵۰ a	۳۷/۰۰ c	۴۶/۳۰ b	۲/۳۳	<۰/۰۰۰۱
ماده آلی (درصد)	۴۵/۴۰ c	۴۷/۰۱ ab	۵۰/۶۵ a	۴۷/۹۵ ab	۴۷/۹۱ ab	۱/۲۸	<۰/۰۰۰۱

در هر ردیف اعداد با حروف غیرمشابه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

قابلیت هضم ظاهری یک شاخص ناهمگون است و معمولا برای ارزیابی اثرات اسانس بر هضم مواد مغذی در دستگاه گوارشی نشخوارکنندگان مناسب نیست (Lin و همکاران، ۲۰۱۳). McIntoshو همکاران (۲۰۰۳) و Newbold و همکاران (۲۰۰۶) پیشنهاد نمودند که اساساً غلظت‌های بالاتر از ۳۵ گرم در لیتر از ترکیب اسانس‌ها برای تغییر قابلیت هضم جیره در شکمبه نیاز است، سطحی که ممکن است در مطالعات درون‌تنی قابل دسترس نباشد. Benchaar و همکاران (۲۰۰۶b) در بین تیمارهای دریافت کننده اسانس (۲، ۳ و ۴ گرم در روز) و مونسین (۳۳ میلی‌گرم در ماده خشک مصرفی) در گاو تفاوت معنی‌داری در قابلیت هضم ظاهری ماده خشک و ماده آلی مشاهده نکردند.

pH شکمبه: تغییرات pH مایع شکمبه در ساعات متفاوت (جدول ۳) نشان می‌دهد که تیمارها بر pH مایع شکمبه در ساعات مختلف نمونه‌برداری تاثیر معنی‌داری نداشته‌اند (P>۰/۰۵). pH شکمبه شاخصی از میزان تخمیر شکمبه‌ای است و تعادلی از غلظت اسیدهای چرب فرار، آمونیاک، بافر شکمبه و بزاق است، بدیهی است هر چه میزان تخمیر افزایش یابد محصولات فرعی حاصل از تخمیر یعنی اسیدهای چرب فرار نیز افزایش می‌یابد و باعث کاهش pH شکمبه می‌شود (پورعارفی و همکاران، ۱۳۹۵). ۲تا ۶ ساعت بعد از اینکه نشخوارکنندگان مقدار زیادی مواد غذایی قابل تخمیر مصرف کردند، تغییرات مشخصی در جمعیت میکروبی شکمبه آنها ایجاد می‌گردد (Radostits و همکاران، ۲۰۰۰)، در ابتدا تعداد باکتری‌هایی که وظیفه آن تخمیر کربوهیدراتها می‌باشد زیاد شده و مقدار زیادی اسید لاکتیک ایجاد می‌گردد درشرایطی که مقدار زیادی کربوهیدرات در شکمبه وجود دارد، این ارگانیسم به تولید اسید لاکتیک ادامه می‌دهد که پیامد این عمل کاهش pH شکمبه به ۵ یا کمتر می باشد، در چنین محیط اسیدی، باکتری‌های سلولیتیک و پروتوزوآها تخریب می‌گردند (Radostits و همکاران، ۲۰۰۰: Anderson، ۱۹۹۲: Wendy، ۱۹۹۲ و Dukes، ۱۹۹۶).

جدول ۳- اثر مقادیر مختلف اسانس لیموترش و مونسین بر pH مایع شکمبه

pH مایع شکمبه	تیمارها (میلی‌گرم در روز)					SEM	P-value
	شاهد	مونسین	اسانس لیموترش				
		۳۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰		
قبل ازخوراک‌دهی صبح	۷/۲۶	۷/۷۷	۷/۶۴	۷/۵۶	۷/۴۴	۰/۲۵	۰/۷۶
۲ ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح	۶/۷۲	۷/۳۲	۷/۰۰	۷/۲۸	۷/۰۶	۰/۱۹	۰/۳۹
۴ ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح	۶/۷۲	۷/۲۶	۷/۱۸	۷/۱۶	۷/۰۴	۰/۱۷	۰/۳۰
۶ ساعت بعد از خوراک‌دهی صبح	۷/۱۱	۷/۲۰	۷/۱۳	۷/۱۶	۷/۴۰	۰/۲۴	۰/۹۰

Castillejos و همکاران (۲۰۰۶) گزارش کردند که دزهای بالای ۵۰۰۰ (میلی‌گرم در لیتر) اوژنول، گوایاکول، لیمونن، تیمول و وانیلین غلظت اسیدهای چرب در محتویات شکمبه را ابتدا کاهش و متعاقبا pH را افزایش داد. Newbold و همکاران (۲۰۰۴) بیان کردند که ۱۱۰ میلی‌گرم در روز اسانس حاوی لیمونین بر pH اثری نداشت، اما در ۶ ساعت بعد خوراک-دهی میزان آن نسبت به ۲ ساعت بعد خوراک‌دهی بالاتر بود. در آزمایشی بیان شد که مصرف تفاله خشک مرکبات و اوره در گوساله‌های نر پرواری براون سوئیس تاثیر معنی‌داری بر pH مایع شکمبه و نیتروژن آمونیاکی نداشت (فروغی و همکاران، ۱۳۸۹). برخی محققین در تعیین ارزش غذایی و سطوح مختلف تفاله خشک لیموترش در تغذیه بز، مخالف گزارش ما نشان دادند که میزان pH مایع شکمبه کاهش یافت (قاسمی و همکاران، ۱۳۸۴). گرچه مشخص شده است سوبسترا مسئول ۷۵٪ تغییرات مشاهده شده روی تخمیر میکروبی و ۲۵٪ تغییرات مربوط به pH می‌باشد (Russell، ۱۹۹۸).

اسیدهای چرب فرار: افزودن اسانس لیموترش بر اسیدهای چرب فرار ($P<0/05$) تاثیر گذاشته است (جدول ۴). از نظر آماری مقدار پروپیونات تولیدی در تیمار ۱۰۰۰ میلی‌گرم نسبت به تیمار شاهد و مونسین تفاوت معنی‌داری داشت ولی با تیمارهای ۶۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم اسانس لیمو تفاوت معنی‌دار نداشت . همچنین نتایج این آزمایش نشان داد که تیمار ۸۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش باعث ایجاد تفاوت در مجموع اسیدهای چرب فرار نسبت به سایر تیمارها شده است ($P<0/05$)، اما نسبت استات به پروپیونات با افزایش سطح اسانس لیموترش کاهش یافت. Benchaar و همکاران (۲۰۰۸) در رابطه با اسانس‌های گیاهی بیان نمودند که اسیدهای چرب فرار تولیدی ناشی از اثر آنتی باکتریال اسانس‌های گیاهی ممکن است به سطح مصرف اسانس بستگی داشته باشد و استفاده از سطوح بالا ممکن است باعث مهار فرآیند تخمیر و کاهش تولید اسیدهای چرب در شکمبه گردد و در این آزمایش هم میزان اسیدهای چرب فرار که می‌توان گفت شاخصی از تخمیر شکمبه می‌باشند در تیمارهایی که دارای سطوح متفاوت اسانس لیمو ترش هستند، تفاوت‌های معنی‌داری را نشان دادند. فعالیت اسانس‌ها روی محیط شکمبه عمدتاً مربوط به فعالیت ضدمیکروبی قوی آنها علیه پروتوزوا و باکتری‌های گرم مثبت از قبیل باکتری‌های تولید کننده استات و باکتری‌های تولید کننده مقدار خیلی بالای آمونیاک (HAP) مربوط می‌شود (Linو همکاران، ۲۰۱۳). Castillejos و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که در شرایط آزمایشگاهی و استفاده از مایع شکمبه گاو شیری سطح ۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس حاوی لیمونین غلظت اسیدهای چرب فرارکل، استات و نسبت استات به پروپیونات را افزایش و پروپیونات را در مقایسه با گروه کنترل کاهش داد و مقادیر ۵۰ و۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسانس حاوی لیمونین روی غلظت اسیدهای چرب فرار کل، استات، پروپیونات اثری نداشت.

نیتروژن آمونیاکی شکمبه: سطوح ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش نسبت تیمارهای شاهد و مونسین باعث کاهش میزان نیتروژن آمونیاکی ($P<0/05$) شدند، اما بین سطوح ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم اسانس لیموترش تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (جدول ۴). به نظر می‌رسد این کاهش ناشی از مهار دآمیناسیون باشد (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۷). غلظت نیتروژن آمونیاکی در گاو در اکثر منابع بین ۱۰ تا ۱۵ میلی‌گرم در دسی لیتر گزارش شده است و البته در بعضی منابع و مقالات بین ۵ تا ۸ میلی‌گرم در دسی لیتر هم مشاهده شده است (Broderick و همکاران، ۲۰۰۷). در این مطالعه سطح نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در همه تیمارها مقداری پایین‌تر از حد نرمال در گاوها می-باشد که احتمالا به این دلیل باشد که گاوهای مورد استفاده در این آزمایش در حد نگهداری تغذیه شده‌اند و همچنین سطح پروتئین خام جیره مورد استفاده هم پایین است و بنابراین احتمالا سرعت تجزیه پروتئین کمتر از نرخ وارد شدن اسید آمینه و آمونیاک به داخل پروتئین میکروبی باشد و بنابراین میزان تولید نیتروژن آمونیاکی کمتر از حد معمول بوده است. در هنگام استفاده از اسانس لیموترش سطح نیتروژن آمونیاکی بطور معنی‌داری کاهش یافته است.

جدول٤- اثر مقادیر مختلف اسانس لیموترش و مونسین بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه ٤ ساعت بعد خوراک‌دهی

	تیمارها (میلی‌گرم در روز)						
اسیدهای چرب فرار	شاهد	مونسین	اسانس لیموترش			SEM	P-value
		۳۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰		
استات (درصد)	۷۶/۴۰	۷۵/۳۵	۷۴/۷۳	۷۳/۱۷	۷۳/۱۵	۱/۰۲	۰/۱۵۰
پروپیونات (درصد)	۱۴/۲۳^{c}	۱۵/۵۰^{bc}	۱۶/۰۷^{abc}	۱۶/۶۰^{ab}	۱۷/۵۰^{a}	۰/۵۴	۰/۰۳۰
مجموع اسیدهای چرب فرار (میلی‌مولار)	۶۷/۴۲^{a}	۶۸/۰۰^{a}	۷۹/۴۹^{a}	۴۸/۴۷^{b}	۶۹/۹۳^{a}	۴/۸۵	۰/۰۰۶
نسبت استات به پروپیونات	۵/۳۷^{a}	۴/۸۶^{b}	۴/۶۵^{b}	۴/۴۱^{b}	۴/۱۸^{c}	۰/۱۳	۰/۰۰۰۱
نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی لیتر)	۶/۷۶^{a}	۶/۶۹^{a}	۳/۸۹^{b}	۴/۹۰$^{a\,b}$	۳/۱۵^{b}	۰/۹۱	۰/۰۴۰

در هر ردیف اعداد با حروف غیر مشابه با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند (P<۰/۰۵).

Castillejos و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که در شرایط آزمایشگاهی و استفاده از مایع شکمبه گاو شیری سطح ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از اسانس حاوی لیمونین روی غلظت نیتروژن آمونیاکی اثری نداشت. افزودن ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر اسانس حاوی لیمونین در شرایط آزمایشگاهی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی اثری نداشت که دلیل آن را استفاده از سطح پایین اسانس بیان کردند (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۵). اسانس با توجه به نوع جیره با اثر روی باکتری‌های تولید کننده آمونیاک، تخمیر میکروبی شکمبه را تغییر می‌دهد (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۵). از دلایل تفاوت نتایج این تحقیق با آزمایش حاضر می‌توان به تفاوت در نحوه اجرای آزمایش (درون‌تنی و برون‌تنی)، دوره عادت‌دهی (۱۰ روز در مقابل ۵ روز)، سطوح اسانس و نسبت علوفه به کنسانتره اشاره کرد. مخلوط اسانس‌های گیاهی شامل ائوژنول، تیمول، وانیلین و لیمونین، با غلظت ۲ گرم به جیره گاوهای شیری، در مقایسه با مونسین اثر سودمندی بر سوخت و ساز شکمبه نداشت و تأثیر اسانس‌ها بر هضم و خصوصیات تخمیر شکمبه‌ای ناچیز بود (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۶a).

McIntosh و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند که خاصیت مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی بر فعالیت پروتئولیتیکی میکروارگانیسم‌های شکمبه عمدتا به علت مهار دی‌آمیناسیون می‌باشد. McIntosh و همکاران (۲۰۰۳) و Tasouka و همکاران (۲۰۰۸) کاهش جمعیت باکتری‌ها و تک یاخته‌های تولیدکننده‌ی آمونیاک در شکمبه توسط اسانس‌ها را علت کاهش غلظت آمونیاک شکمبه بیان کردند. همچنین موافق با نتایج مطالعه حاضر، با مصرف مخلوطی از اسانس‌های گیاهی به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در روز گوسفندانی که با جیره کم پروتئین تغذیه می‌شدند، اسانس با کاهش جمعیت باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک به میزان فراوان غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را کاهش داد (Wallace، ۲۰۰۴). این باکتری‌ها به میزان کم در شکمبه حضور دارند اما فعالیت دی آمیناسیون بالایی دارند (Russell و همکاران، ۱۹۸۸). با توجه به اینکه میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در تیمارهای دارای اسانس لیموترش پایین‌تر از سطح ۵ میلی‌گرم در دسی‌لیتر است و همچنین Slyterو Satter سال ۱۹۷۴ بیان کردند که ۵ میلی‌گرم نیتروژن آمونیاکی در دسی لیتر برای حفظ رشد باکتری‌های شکمبه لازم

است بنابراین احتمالاً در تحقیق حاضر هم این کاهش سطح نیتروژن سبب کاهش رشد باکتری‌های شکمبه و در نتیجه کاهش تخمیر شکمبه‌ای خوراک شده است.

پروتوزوای شکمبه: نتایج شمارش پروتوزوآ (جدول ۶) نشان می‌دهد که تیمارها بر پروتوزوآی شکمبه در ساعات مختلف نمونه‌برداری تأثیر معنی‌داری نداشته‌اند (P>۰/۰۵). در داخل تیمارها هم مقایسات میانگین برای ساعات مختلف انجام گردید و تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، بنابراین فقط مقایسات تیمارهای مختلف گزارش شد. جمعیت پروتوزوآها در مایع شکمبه تنها تحت تاثیر pH نیست، بلکه ترکیبی از چندین عامل مختلف بر جمعیت پروتوزوآها مؤثر هستند (Yang و همکاران، ۲۰۱۰) علاوه برpH ، ترکیب جیره، نرخ باز چرخ، دفعات خوراک‌دهی و مقدار خوراک نیز بر جمعیت پروتوزوآها مؤثر هستند (Franzolin و Dihority، ۱۹۹۶). Benchaar و همکاران (۲۰۰۶b و ۲۰۰۷) وNewbold و همکاران (۲۰۰۴) گزارش کردند که۱۱۰ یا ۷۵۰ میلی‌گرم در روز به ترتیب در گوسفند و گاوهای شیری اثر معنی‌دار بر جمعیت پروتوزوآهای شکمبه ندارند. اسانس‌های گیاهی از نظر ساختار شیمیایی، منبع و فعالیت متفاوتند در نتیجه اثرات متفاوتی بر روی تخمیرات شکمبه و عملکرد حیوان دارند (پورعارفی و همکاران، ۱۳۹۵).

Veira و همکاران (۱۹۸۳) دریافتند که حذف پروتوزوآ با کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و افزایش جریان اسیدآمینه از شکمبه به روده همراه است. Newbold و همکاران (۲۰۰۴) با مطالعه اثر۱۱۰ میلی‌گرم در روز اسانس حاوی لیمونین روی گوسفند نشان دادند که اسانس اثری روی تعداد پروتوزوآ نداشت. خصوصیات آنتی بیوتیکی اسانس‌ها از طریق کاهش تجزیه پروتئین جیره و با افزایش عبور نیتروژن از شکمبه به روده می‌تواند جمعیت میکروبی شکمبه را تنظیم نمایند (McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳).

جدول٦- اثر سطوح مختلف اسانس لیموترش و مونسین بر تعداد پروتوزوآ (×۱۰^٤) درمیلی‌لیتر مایع شکمبه

تیمارها (میلی گرم در روز)								
ساعات خوراک دهی	پروتوزوا	شاهد	مونسین	اسانس لیموترش			SEM	P-value
			۳۰۰	۶۰۰	۸۰۰	۱۰۰۰		
صفر	انتودینیوم	۳/۴۳	۳/۱۳	۳/۷۵	۴/۳۸	۴/۳۸	۱/۴۶	۰/۵۴
۲		۳/۴۴	۲/۸۱	۴/۰۶	۴/۰۶	۴/۳۸	۰/۸۲	۰/۱۰
٤		۳/۲۴	۳/۱۸	۳/۱۳	۳/۲۸	۴/۳۷	۱/۳۵	۰/۲۶
٦		۳/۷۵	۳/۱۳	۴/۳۸	۴/۳۸	۴/۳۹	۱/۰۷	۰/۰۸
صفر	دیپلودینیوم	۱/۵۵	۱/۸۷	۱/۸۸	۱/۸۸	۱/۵۶	۰/۷۳	۰/۹۴
۲		۱/۸۸	۱/۵۶	۱/۸۸	۲/۱۹	۲/۵۰	۰/۸۵	۰/۴۶
٤		۲/۱۳	۱/۷۶	۱/۵۶	۱/۵۵	۲/۱۸	۰/۹۲	۰/۷۱
٦		۱/۸۸	۲/۱۸	۲/۵۰	۲/۱۵	۱/۸۵	۰/۹۱	۰/۸۵
صفر	کل	۴/۹۸	۵/۰۰	۵/۶۳	۶/۲۶	۵/۹۴	۰/۵۸	۰/۱۰
۲	پروتوزوهای	۵/۳۲	۴/۳۷	۵/۹۴	۶/۲۵	۶/۸۸	۱/۱۸	۰/۰۸
٤	شمارش شده	۵/۳۷	۴/۹۴	۴/۶۹	۴/۸۳	۶/۵۵	۱/۷۱	۰/۴۲
٦		۵/۶۳	۵/۳۱	۶/۸۸	۶/۵۳	۶/۲۴	۱/۱۰	۰/۹

نتیجه‌گیری

با بررسی سطوح ۶۰۰، ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در روز اسانس لیموترش مشخص گردید که میزان قابلیت هضم ماده خشک در تیمار ۶۰۰ میلی‌گرم از نظر آماری بیشتر از تیمارهای شاهد و مونسین بود، اما تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت. سطوح ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم غلظت نیتروژن آمونیاکی وسطح ۱۰۰۰ میلی‌گرم نسبت استات به پروپیونات را نسبت به تیمارهای شاهد و مونسین کاهش دادند. اما تیمارهای آزمایشی بر تعداد پروتوزوآ و میزان pH مایع شکمبه اثر معنی‌داری نداشتند. با توجه به این نتایج می‌توان اذعان داشت که سطح ۸۰۰ میلی‌گرم نسبت به سطوح ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم عملکرد پایین‌تری دارد. اما با این وجود، انجام مطالعات بیشتر در زمینه تأثیر اسانس لیموترش بر روی عملکرد نشخوارکنندگان پرواری خصوصا در بازه‌های زمانی مرسوم برای پرورش این حیوانات ضروری به نظر می‌رسد.

منابع

افشار حمیدی، ب. پیرمحمدی، ر. منصوری، ه. و فجری، م. (۱۳۹۲). اثر افزودن گیاه آویشن به جیره غذایی بر گوارش پذیری خوراک و عملکرد تولید شیر بزهای شیرده مهابادی. *نشریه علوم دامی (پژوهش و سازندگی)*. شماره ۱۰۱، ص ۳۶-۲۹.

بهجتیان اصفهانی، م. قیصری، ع.ع. جلالی زند، ع.ر. و عباسیان، ع.ر.(۱۳۸۶). اثر تغذیه‌ای سطوح مختلف اسید استیک، پروبیوتیک و آنتی بیوتیک بر عملکرد زنبور عسل. *پژوهش در علوم کشاورزی*. سال سوم، شماره ۲، ص ۲۵۱-۲۴۰.

پوربایرامیان، ر. پیرمحمدی، ر. شاهی، ب. فرهومند، پ. و برنوسی، ا. (۱۳۹۱). بررسی اثرات پودر لیموترش بر قابلیت هضم مواد مغذی، pH شکمبه و نیتروژن آمونیاکی در قوچ ماکویی. *پنجمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان*. ص ۴۳۲ - ۴۲۹.

پورعارفی، ا. راه چمنی، ر. قنبری، ف. و قره باش، آ.م. (۱۳۹۵). تأثیر روغن اسانس دارچین بر عملکرد، تخمیر و جمعیت میکروبی و برخی متابولیت‌های خونی گوسفند. *نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان*. جلد ۴، شماره ۱، ص ۱۱۲- ۹۵.

دادور، پ. دیانی، ا. مروت، م. و غلامی، ج. (۱۳۸۹). تعیین قابلیت هضم آزمایشگاهی (In-vitro) تفاله لیمو ترش عمل آوری شده با مخمرساکارومایسز سرویسیا. *مجله علمی -پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی*. دوره دوم، شماره ۶، ص ۱۸ - ۱۳.

فروغی، ع. شهدادی، ع. آهویی، غ. طهماسبی، ع.م. و وکیلی، ر. (۱۳۸۹). اثر تفاله خشک مرکبات و اوره بر فراسنجه‌های خونی، شکمبه‌ای و خصوصیات لاشه‌ای گوساله‌های نر پرواری براون سوئیس. *چهارمین کنگره علوم دامی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد*. ص ۱۳۵۰ - ۱۳۴۶.

قاسمی، ا. طباطبایی، س.م.م. ساکی، ع.ا. و فضائلی، ح. (۱۳۸۴). تعیین ارزش غذایی و سطوح مختلف تفاله خشک لیموترش در تغذیه بز. *دومین سمینار پژوهشی گوسفند و بز کشور، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، تهران*. ص ۸۵۶ – ۸۴۸.

Anderson, N.V. (1992). Veterinary gastroenterology, 2nd ed. *Philadelphia, Lea and Febiger*, London. 21-719.

AOAC (1990). Official methods of analysis, 15th Edition. *Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA*. 554,575,654.

Bampidis, V.A. and Robinson, P.H. (2006). Citrus by-products as ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology*, 128: 175–217.

Benchaar, C., Duynisveld, J. and Charmley, E. (2006a). Effects of monensin and increasing dose levels of a mixture of essential oil compounds on intake, digestion and growth performance of beef cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 86(1): 91-96.

Benchaar, C., Petit, H.V., Berthiaume, R., Whyte, T.D. and Chouinard, P.Y. (2006b). Effects of dietary addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89: 4352–4364.

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: 886–897

Benchaar, C., Calasmiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A. (2008). A review of plant derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145: 209-228.

Broderick, G. A., Brito, A. F. and Colmenero, J. O. (2007). Effects of feeding formate-treated alfalfa silage or red clover silage on the production of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 90(3): 1378-1391.

Chemistry, 46: 3590–3595.

Ipharraguerre, I. R., Reynal, S. M., Linerio, M., Broderick, G. A. and Clark, J. H. (2007). A comparison of sampling sites, digesta and microbial markers and microbial referees for assessing the postruminal supply of nutrients in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90: 1904-1919.

Krizsan, S.J., Ahvenjärvi, S., Volden, H. and Broderick, G. A. (2010). Estimation of rumen outflow in dairy cows fed grass silage-based diets by use of reticular sampling as an alternative to sampling from the omasal canal. *Journal of Dairy Science*, 9: 1138–1147.

Lee, S.S., Ha, J.K. and Cheng, K.J. (2000). Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. *Apply Environ Microbiology*, 66: 3807–381.

Lin, B., Lua, Y., Salem, A.Z.M., Wanga, J.H. and Liang, Q. (2013). Effects of essential oil combinations on sheep ruminal fermentation and digestibility of a diet with fumarate included. *Animal Feed Science Technology*, 184(1-4): 24-32.

McDougall, E.I. (1948). Studies on ruminant saliva 1. The composition and output of sheep's saliva. *Biochemistry Journal*, 43: 99–109.

Mcguffey, R.K., Richardson, L.F. and Wilkinson, J.I.D. (2001). Ionopheres for dairy cattle:current status and future outlook. *Journal Dairy Science*, 84(E, supply): E194-E203.

McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A. and Newbold, C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal metabolism and their protein metabolism. *Apply Environ Microbial*, 69: 5011–5014.

Molero, R., Ibars, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on dry matter and crude protein degradability in heifers fed diets with different forage to concentrate ratios. *Animal Feed Science and*

Busquet, M., Calsamiglia, S.; Ferret. A.; Cardozo, P.W. and Kamel, C. (2005). Effects of cinnamaldehyde and garlic oil on rumen microbial fermentation in a dual flow continuous culture. *Journal of Dairy Science*, 88: 2508-2516.

Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. and Ferret, A. (2007). Invited review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580–2595.

Castillejos, L., Calsamiglia, S. and Ferret, A. (2006). Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow Systems. *Journal of Dairy Science*, 89: 2649-2658.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R. (2005). Effects of a specific blend of essential oil compounds and the type of diet on rumen microbial fermentation and nutrient flow from a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 119: 29–41.

Castillejos, L., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Losa, R. (2007). Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 132: 186–201.

Dehority, B.A. (2005). Effect of pH on viability of Entodinium caudatum, Entodinium exiguum, Epidinium caudatum, and Ophryoscolex purkynjei in vitro. *Journal Eukaryote Microbiology*, 52: 339-342.

Dukes, H.H. (1996). Physiology of domestic animals. 11th ed.; *Ithaca and London*, 425-640.

Franzolin, R., and Dehority, B.A. (1996). Effect of prolonged high concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. *Journal of Animal Science*, 74: 2803–2809.

Helander, I. M., Alakomi, H. L., Latva-Kala, K., Mattila-Sandholm, T., Pol, I., Smid, E. J., Gorris, L. G. M. and Von Wright, A. (1998). Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. *Journal Agriculture Food*

(2007). Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degradability. *Journal of Dairy Science*, 90: 1887-1903.

Russell, J.B. (1998). The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production in vitro. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222–3230.

Russell, J.B., Strobel, H.J. and Chen, G. (1988). Enrichment and isolation of a ruminal bacterium with a very high specific activity of ammonia production. *Environmental Microbiology*, 54: 872-877.

SAS. (2003). Statistical Analysis Systems Institute. SAS User's Guide. *SAS Institute, Cary, NC*.

Satter, L.D. and Slyter, L.L. (1974). Effect of ammonia concentration on rumen microbial protein production in vitro. *British Journal Nutrition*, 32: 199-208.

Simitzis, P.E., Feggeros, K., Bizelis, J.A. and Deligeorgis, S.G. (2005). Behavioral reaction to essential oils dietary supplementation in sheep. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 21(5-6): 97-103.

Smith, F.E. and Murphy, T.A. (1993). Analysis of rumen ammonia and blood urea nitrogen. www.liferaydemo.unl.edu.

Tasouka, N., Hara, K., Katsushiko, M., Kasimoto, H. and Itabash, H. (2008). Effects of the essential oil cyclodetrin complexes on ruminal methane production in vitro. *Journal of Animal Science*, 79: 68-75.

Tepe, B., Daferera, D., Sokmen, A., Sokmen, M. and Polissiou, M. (2005). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils and various extracts of Salvia tomentosa Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry*, 90: 333-340.

Veira, D.M., Ivan, M. and Jui, P.Y. (1983). Rumen ciliate protozoa: effects on digestion in the stomach of sheep. *Journal of Dairy Science*, 66: 1012-1022.

Wallace, R.J. (2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Journal Technology*, 114: 91–104.

Molina Alcaide, E., Yáñez Ruiz, D.R., Moumen, A. and Mart´ın Garc´ıa, A.I. (2003). Ruminal degradability and in vitro intestinal digestibility of sunflower meal and in vitro digestibility of olive by-products supplemented with urea or sunflower meal Comparison between goats and sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 110: 3–15.

Nagaraja, T.G. (1995). Ionophores and antibiotics in ruminants. *In: Biotechnology in animal feeding, edited by Wallace, R.J. and Chesson, A. VCH Publishers*, New York, 173-204.

Nam, I.S., Garnsworthy, P.C. and Ahn1, J. H. (2006). Supplementation of Essential Oil Extracted from Citrus Peel to Animal Feeds Decreases Microbial Activity and Aflatoxin Contamination without Disrupting In vitro Ruminal Fermentation. *Journal of Animal Science*, 11: 1617-1622.

Newbold, C.J., Duval, S.M., McEwan, N.R., Y´a˜nez- Ruiz, D.R. and Hart, K.J. (2006). New feed additives for ruminants, European perspective. *In: Proceedings of the Pacific Northwest Animal Nutrition, Vancouver, BC, Canada*, 81–90.

Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Riccardo, L. and Wallace, R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 105–112.

NRC, (2001). Nutrient Requirements of Dairy Cattle. National Academy Press, Washington, DC.

Ottenstein, D. M. and Bartley, D. A. (1971). Improved gas chromatography separation of free acids C2- C5 in dilute solution. *Ann Chemistry*, 43: 952–955.

Radostits, O.M., Clive, C.C., Blood, D.C. and Hinchcliff, K.w. (2000). Veterinary medicine A textbook of 9th ed.; W.B Saunders, 93-284.

Reynal, S.M., Ipharraguerre, I.R., Liñ eiro, M., Brito, A.F., Broderick, G.A. and Clark, J.H.

Proceedings Nutrition Society, 63: 621-629.

Wendy, J.U. (1992). Rumen lactic acidosis. Part II. Clinical signs, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Continuing Education Article (Compendium)*, 14: 1265-1270.

Yang, W.Z., Ametaj, B.N., Benchar, C., Hem, L. and Beauchemin, K.A. (2010). Cinnamaldehyde in feedlot cattle diets: Intake, growth performance, carcass characteristics, and blood metabolites. *Journal of Animal Science*, 88: 1082-1092.