



Effects of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) Essential Oil on Ruminal Fermentation Parameters, Nutrient Degradability, and Methane Production *in vitro*

Mohsen Kazemi^{1*}

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Animal Science, University of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran

*Corresponding Author's Email: phd1388@gmail.com; m.kazemi@tjamcaas.ac.ir

Received: 30-11-2025
Revised: 04-01-2026
Accepted: 07-01-2026
Available Online: 04-04-2026

How to cite this article:

Kazemi, M. (2026). Effect of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil on ruminal fermentation parameters, nutrient degradability, and methane production in an *in vitro* system. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 18(1), 29-41. (in Persian with English abstract).
<https://doi.org/10.22067/Ijasr.2026.96772.1282>

Introduction: The utilization of natural feed additives to modulate rumen fermentation processes and mitigate enteric methane emissions has garnered considerable attention as a sustainable nutritional strategy in ruminant production systems. Plant-derived essential oils (EOs), with their complex bioactive profiles, offer a promising alternative for shifting the rumen microbial ecosystem toward improved fermentation efficiency. Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.), a perennial herb belonging to the *Lamiaceae* family, is widely recognized for its medicinal and aromatic properties. The essential oil extracted from this plant contains numerous biologically active components, notably pinocamphone, β -pinene, and various sesquiterpenes, which collectively exhibit potent antimicrobial, antifungal, and antioxidant activities. These multifaceted biological properties suggest substantial potential for optimizing rumen fermentation dynamics and improving nutrient utilization. The present study was therefore designed to systematically evaluate the effects of different inclusion levels of whole Hyssop essential oil (HEO) on *in vitro* gas production kinetics, methane emission patterns, key fermentation parameters, and microbial indices in ruminal fluid. The central hypothesis was that, due to its antimicrobial properties, HEO could establish an optimal balance between suppressing methane production and maintaining or even improving ruminal fermentation efficiency at a specific concentration. Therefore, this investigation aimed to assess the impact of HEO on ruminal methane output, volatile fatty acid profile, nutrient degradability, and microbial protein synthesis efficiency to identify its optimal dietary inclusion level.

Materials and Methods: The experiment was conducted in a completely randomized design with five treatments and four replicates. Treatments included different levels of HEO (0, 50, 100, 150, and 200 mg/L of culture medium). The essential oil was obtained via hydrodistillation using a Clevenger apparatus from the aerial parts of the plant collected at full flowering. Rumen fluid was collected from three fistulated male sheep (30 ± 3.5 kg body weight) fed a diet consisting of wheat straw and concentrate. The *in vitro* gas production technique was used, and samples were incubated at 39°C for 96 hours. Gas production was measured at 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, and 96 hours. Methane production was assessed at 24 hours by absorbing carbon dioxide with a 10 M NaOH solution. After 24 hours of incubation, additional fermentation and



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0)

 <https://doi.org/10.22067/Ijasr.2026.96772.1282>

microbial parameters were evaluated. These post-incubation analyses included measurements of pH, ammonia-nitrogen concentration, total volatile fatty acids (TVFA) concentration, and total protozoal count using a Neubauer chamber. Additionally, degradability of dry matter (DM), organic matter (OM), and neutral detergent fiber (NDF) were determined. Microbial biomass yield and microbial synthesis efficiency were calculated based on truly degraded organic matter and gas production data.

Results and Discussion: The addition of HEO significantly and dose-dependently reduced *in vitro* methane production. The effect was most pronounced at the highest dose, where methane production decreased by 31% at 200 mg/L compared with the control treatment ($P < 0.05$). This reduction is likely attributed to the direct inhibitory effect of the HEO bioactive compounds, particularly pinocamphone, on methanogenic archaea and protozoa. Cumulative gas production decreased significantly at all incubation time points compared to the control ($P < 0.05$). Total protozoal population declined linearly with increasing essential oil levels, showing a substantial 33% reduction at 200 mg/L compared to the control ($P < 0.05$), highlighting the strong antiprotozoal activity of the essential oil. TVFA concentration showed a quadratic response ($P < 0.05$), increasing up to the 100 mg/L level and then decreasing at higher doses, indicating a dual stimulatory and inhibitory effect on microbial fermentation. Notably, the 100 mg/L treatment significantly increased microbial biomass yield and microbial synthesis efficiency by 19% and 20%, respectively ($P < 0.05$), indicating a more efficient allocation of digested nutrients to microbial biomass production. Conversely, degradability of DM, OM, and NDF decreased linearly with increasing essential oil levels ($P < 0.05$), reflecting a general inhibitory effect on fibrolytic microbial activity at higher concentrations.

Conclusion: At an inclusion level of 100 mg/L, HEO achieved a significant methane reduction (14.3%) while improving microbial protein synthesis efficiency and maintaining acceptable nutrient digestibility. This specific level of HEO may therefore serve as an effective natural strategy for enhancing the efficiency of rumen fermentation and reducing the environmental impact of ruminant production through lower methane emissions. For practical application, further *in vivo* trials are recommended to validate these promising *in vitro* findings and to determine the appropriate dietary inclusion rate.

Keywords: Digestibility, Gas production, Herbal essential oil, Microbial synthesis efficiency, Protozoa population

اثر اسانس آبی گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) بر فراسنجه‌های تخمیری، تجزیه پذیری مواد مغذی و تولید متان شکمبه‌ای در شرایط برون تنی

محسن کاظمی*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۱۷

چکیده

استفاده از افزودنی‌های طبیعی برای تعدیل تخمیر شکمبه و کاهش تولید متان به عنوان رویکردی پایدار در تغذیه نشخوارکنندگان اهمیت یافته است. اسانس گیاهی زوفا (*Hyssopus officinalis* L.) با ترکیبات زیست فعال خود می‌تواند اکوسیستم میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار دهد. این پژوهش با هدف بررسی تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه کامل زوفا (۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) بر تولید گاز و متان، فراسنجه‌های تخمیری و شاخص‌های میکروبی شکمبه گوسفند در شرایط برون تنی انجام شد. نتایج نشان داد که افزودن اسانس زوفا موجب کاهش معنی دار تولید متان (تا ۳۱ درصد در سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر) و تولید گاز تجمعی (میلی لیتر) در تمام زمان‌های انکوباسیون گردید ($P < 0.05$). جمعیت پروتوزوای کل با افزایش سطح اسانس، کاهش خطی نشان داد و در سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به میزان ۳۳ درصد کمتر از شاهد بود ($P < 0.05$). غلظت اسیدهای چرب فرار کل تا سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش و سپس کاهش یافت ($P < 0.05$). توده میکروبی تولیدی و راندمان سنتز میکروبی در سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به ترتیب ۱۹ و ۲۰ درصد بهبود یافت ($P < 0.05$). به طور کلی، سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر به عنوان سطح بهینه برای تعدیل فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای شناسایی شد، زیرا ضمن کاهش معنی دار تولید متان، کارایی میکروبی را بهبود بخشیده و در عین حال قابلیت هضم مواد مغذی را حفظ نمود. این سطح می‌تواند به عنوان راهکاری مؤثر برای بهبود تخمیر شکمبه و کاهش انتشار متان پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، تولید گاز، جمعیت پروتوزوآ، راندمان سنتز میکروبی، قابلیت هضم

مقدمه

گیاهی، در کانون توجه پژوهش‌های نوین قرار گرفته است (Kazemi, 2019; Kazemi & Eskandary Torbaghan, 2019). در این میان، گیاهان دارویی به دلیل دارا بودن ترکیبات زیست فعال ثانویه، پتانسیل قابل توجهی برای تعدیل تخمیر شکمبه، بهبود سلامت دام و کاهش اثرات زیست محیطی از خود نشان داده‌اند (Kazemi, 2019; Kazemi & Eskandary Torbaghan, 2019).

گیاه زوفا (*Hyssopus officinalis* L.)، گونه‌ای چندساله از تیره نعنائیان (*Lamiaceae*) است که به طور بومی در مناطق مدیترانه تا آسیای مرکزی پراکنده شده است (Fathiazad et al., 2011). این گیاه به دلیل محتوای بالای اسانس (۳ تا ۱ درصد) از دیرباز در طب سنتی به عنوان ضداسپاسم، ضدسرفه، ضد عفونی کننده و خلط آور مورد استفاده قرار گرفته است (Kizil et al., 2010). اسانس زوفا حاوی ترکیبات متعددی از جمله پینوکامفون، β -پینن و سسکوئین ترپن‌ها

صنعت دامپروری به ویژه در بخش نشخوارکنندگان، با چالش‌های متعددی از جمله کاهش قابلیت هضم خوراک، تولید گازهای گلخانه‌ای (به ویژه متان) و عفونت‌های انگلی مواجه است. استفاده از افزودنی‌های خوراکی مصنوعی و آنتی بیوتیک‌ها برای مقابله با این چالش‌ها، به دلیل عوارض جانبی و ایجاد مقاومت دارویی، با محدودیت‌های فزاینده‌ای روبرو شده است (Zheng et al., 2025). از این رو، جست‌وجو برای جایگزین‌های طبیعی و ایمن، به ویژه از منابع

۱- گروه علوم دامی، مجتمع آموزش عالی تربت جام، تربت جام، ایران

(*) نویسنده مسئول: (Email: phd1388@gmail.com;

m.kazemi@tjamcaas.ac.ir

<https://doi.org/10.22067/Ijasr.2026.96772.1282>

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس گیاهی

پیکره‌های رویشی گیاه زوفا در مرحله گل‌دهی کامل و در اواسط تیرماه سال ۱۴۰۳ از گلخانه آموزشی-پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام جمع‌آوری گردید. نمونه‌ها بلافاصله به آزمایشگاه منتقل و به‌منظور کاهش رطوبت و دستیابی به وزن پایدار جهت آسیاب، در آن با دمای کنترل‌شده ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت خشک شدند. پس از این مرحله، تمامی بخش‌های گیاه (ساقه، برگ و گل) با استفاده از آسیاب مکانیکی به ذرات با اندازه دو میلی‌متر تبدیل گردید. اسانس‌گیری به‌روش تقطیر با بخار آب و با بهره‌گیری از دستگاه کلونجر انجام شد (Kazemi & Mokhtarpour, 2020). محصول نهایی در ویال‌های شیشه‌ای کهربایی، ریخته شده و برای جلوگیری از اکسیداسیون و تبخیر ترکیبات فرار، تا زمان آغاز آزمایش‌های تخمیر برون‌تنی در دمای چهار درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شد.

تهیه جیره پایه و جمع‌آوری مایع شکمبه

جیره غذایی مورد استفاده در محیط کشت، برپایه احتیاجات تغذیه‌ای یک گوسفند نر نژاد بلوچی در سن پنج ماهگی و وزن متوسط ۳۵ کیلوگرم تهیه شد (NRC, 2007). ترکیب شیمیایی این جیره (جدول ۱) براساس مقادیر استاندارد موجود در کتابخانه ترکیب مواد خوراکی نشخوارکنندگان محاسبه گردید. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی این جیره در جدول ۱ ارائه شده است.

مایع شکمبه مورد نیاز از سه رأس گوسفند نر بالغ نژاد بلوچی (با وزن $3/5 \pm 30$ کیلوگرم) مجهز به فیستولای دائم شکمبه‌ای تهیه شد. جیره نگهداری این حیوانات شامل کاه گندم و کنسانتره تجاری با تراکم انرژی ۱۰/۱۵ مگاژول در هر کیلوگرم ماده خشک بود.

آزمون تولید گاز و ارزیابی قابلیت هضم

محیط کشت مورد استفاده در آزمون تولید گاز با نسبت حجمی ۲ به ۱ از بزاق مصنوعی و مایع شکمبه تهیه گردید (Menke & Steingass, 1988). در هر یک از بطری‌های شیشه‌ای ۱۲۰ میلی‌لیتری، ۲۰۰ میلی‌گرم (براساس ماده خشک) از خوراک آسیاب‌شده (جدول ۱، با اندازه ذرات یک میلی‌متر) به همراه سطوح مختلف اسانس زوفا (صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در هر لیتر محیط کشت) ریخته شد. برای هر سطح تیماری، چهار تکرار در نظر گرفته شد. به‌منظور افزایش پایایی نتایج، این آزمون در دو دور مستقل (independent runs) و در دو روز مختلف انجام گردید.

است که نقش اصلی در بروز خواص ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی آن دارند (Mazzanti et al., 1998; Goncarius & Balmus, 2013). اگرچه خواص دارویی این گیاه به‌خوبی مستند شده است، اما کاربرد آن به‌عنوان یک افزودنی خوراکی در تغذیه دام، به‌ویژه در محیط کشت شکمبه، موضوعی نوپا و کمتر بررسی شده است. درحالی‌که تاکنون مطالعه‌ای روی بررسی سیستماتیک تأثیر اسانس زوفا بر تخمیر شکمبه نشخوارکنندگان صورت نگرفته است، شواهدی از اثرات زیست‌فعال مفید این گیاه در گونه‌های دیگر گزارش شده است. به‌عنوان مثال، نشان داده شده است که عصاره زوفا سبب تقویت پاسخ ایمنی در قزل‌آلا می‌شود (Yousefi et al., 2022). علاوه بر این، مطالعات نشان داده‌اند که عصاره زوفا با کاهش میزان اتوزینوفیل‌ها و تنظیم سطوح ایمونوگلوبولین‌های E و G در مدل موشی آسم، علاوه بر اثر ضدالتهابی، نقش مهمی در تنظیم سیستم ایمنی داشت (Ma et al., 2014). این یافته‌ها، لزوم بررسی پتانسیل این افزودنی طبیعی در محیط شکمبه را برجسته می‌سازد.

تخمیر شکمبه یک فرآیند پیچیده میکروبی است که کارایی آن بر عملکرد تولیدی دام تأثیر مستقیم دارد. پارامترهایی مانند تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک و آلی، غلظت اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و جمعیت پروتوزوآها، شاخص‌های کلیدی برای ارزیابی سلامت و کارایی شکمبه محسوب می‌شوند (Patra, 2007). از سوی دیگر، متان تولیدی در شکمبه نه‌تنها نمایانگر هدررفت ۲ تا ۱۲ درصدی انرژی خوراک است، بلکه به‌عنوان یک گاز گلخانه‌ای قوی نیز اثرات زیست‌محیطی نامطلوبی دارد (Pepeta et al., 2024). بنابراین، یافتن افزودنی‌هایی که بتوانند هم‌زمان کارایی تخمیر را بهبود بخشیده و تولید متان را کاهش دهند، از اهداف مهم تحقیقاتی است. مطالعات روی سایر اسانس‌های گیاهی مانند آویشن (Thymus vulgaris) و رزماری (Salvia rosmarinus) نشان داده‌اند که این ترکیبات می‌توانند از طریق سازوکارهایی مانند مهار جمعیت پروتوزوآها و آرکی‌های متان‌زا، تولید متان را کاهش دهند (Wencelová et al., 2015). بااین‌حال، اثرات این ترکیبات وابسته به دوز بوده و در سطوح بالا می‌توانند اثرات مهارکنندگی کلی بر ریزجانداران شکمبه داشته باشند.

بر این اساس، هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه کامل زوفا (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت) در مقایسه با شاهد بر روی پارامترهای کینتیک تولید گاز و متان، پارامترهای تخمیری، جمعیت پروتوزوآی کل، قابلیت تجزیه‌پذیری مواد مغذی و همچنین شاخص‌های کارایی میکروبی در یک محیط کشت برون‌تنی تولید گاز بود. فرضیه این پژوهش بر این اساس است که اسانس زوفا با توجه به خواص ضد میکروبی خود، بتواند در یک سطح بهینه، تعادل مطلوبی بین کاهش تولید متان و حفظ یا بهبود کارایی تخمیر شکمبه ایجاد نماید.

جدول ۱- اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره نهایی مورد استفاده در محیط کشت آزمایشگاهی (درصدی از ماده خشک)

Table 1- Feed ingredients and chemical composition of the final diet used in an *in vitro* culture medium (% of dry matter in the diet)

اقلام Ingredients	مقدار در جیره (درصد ماده خشک) Dietary inclusion (% of dry matter)
یونجه Alfalfa	12
سیلاژ ذرت Corn silage	12
جو آسیاب شده Ground barley	22
ذرت آسیاب شده Ground corn	22
کنجاله تخم پنبه Cottonseed meal	5
سبوس گندم Wheat bran	6
تقاله چغندر قند خشک Dried beet pulp	4
کنجاله سویا (۴۴ درصد پروتئین) Soybean meal (44% CP)	5
کاه گندم Wheat straw	7
اکسید روی Zinc oxide	1.5
مکمل ویتامینی-معدنی ^۱ Vitamin-mineral premix	1.5
نمک Salt	1.5
آهک Limestone	0.5
ترکیبات شیمیایی (درصدی از ماده خشک) Chemical composition (% of DM)	
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber	33
خاکستر Ash	12
چربی خام Ether extract	3.5
پروتئین خام Crude protein	15
کربوهیدرات‌های غیرالیافی Non-fiber carbohydrates	36.5
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری/کیلوگرم ماده خشک) Metabolizable energy (Mcal/kg DM)	2.3
کلسیم Calcium	0.60
فسفر Phosphorus	0.30

^۱ حاوی ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D₃، ۸۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۸۰۰۰ میلی‌گرم موننسن ۱۰ درصد، ۴۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان، ۷۴۰۰۰ میلی‌گرم کلسیم، ۱۵۶۰۰ میلی‌گرم سدیم، ۱۰۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۸ میلی‌گرم کبالت، ۶ میلی‌گرم سلنیوم، ۲۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۵۰ میلی‌گرم مس و ۳۰ میلی‌گرم ید.

¹ Contains 100,000 IU of vitamin A, 10,000 IU of vitamin D₃, 8,000 mg vitamin E, 8,000 mg of 10% monensin, 400 mg antioxidant, 74,000 mg calcium, 15,600 mg sodium, 1,000 mg manganese, 8 mg cobalt, 6 mg selenium, 2,000 mg zinc, 1,000 mg iron, 150 mg copper, and 30 mg iodine.

ساعت در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. همچنین برای محاسبه قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی، نمونه‌های فیلترشده و خشک‌شده، در محلول شوینده خنثی شست‌وشو و براساس معادله‌های مربوطه، قابلیت هضم آن‌ها تعیین شدند (Van Soest et al., 1991). برای تعیین قابلیت هضم مواد مغذی، از شیشه‌های آزمون تولید گاز به‌صورت جداگانه استفاده شد.

برای سنجش نیتروژن آمونیاکی، پنج میلی‌لیتر از محیط کشت فیلترشده با پنج میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۲ نرمال مخلوط و در دمای ۱۸- درجه سلسیوس تا زمان آنالیز با دستگاه کج‌لدال نگهداری شد (Komolong et al., 2001).

غلظت کل اسیدهای چرب فرار با استفاده از دستگاه تقطیر مارخام اندازه‌گیری گردید (Barnett & Reid, 1957). برای تعیین حجم گاز متان، در پایان ۲۴ ساعت انکوباسیون، چهار میلی‌لیتر سود ۱۰ مولار به فلاسک‌ها تزریق گردید تا دی‌اکسیدکربن جذب شده و حجم گاز باقی‌مانده به‌عنوان متان در نظر گرفته شود (Fievez et al., 2005).

برآورد پارامترهای میکروبی

ضریب تفکیک‌پذیری (Partitioning Factor: PF) از معادله ۱ (Vercoe et al., 2010; Makkar, 2010) و توده میکروبی تولیدشده (Microbial Mass Yield: MMY) از معادله ۲ (Makkar, 2010) محاسبه شدند.

$$PF = [c - (a - b)] / IVGP \quad \text{معادله (۱)}$$

$$MMY = [c - (a - b)] - (IVGP \times 2.2) \quad \text{معادله (۲)}$$

که در آن‌ها، a: وزن ماده خشک هضم‌نشده، b: وزن خاکستر نمونه هضم‌نشده، c: وزن ماده آلی اولیه (قبل از انکوباسیون) و IVGP: (*In vitro* Gas Production) حجم گاز خالص تولیدی در زمان ۹۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

راندمان سنتز میکروبی (%) از تقسیم MMY بر ماده آلی هضم شده واقعی حاصل شد.

برای شمارش کل پروتوزوا، پنج میلی‌لیتر از مایع شکمبه با پنج میلی‌لیتر فرمالین ۵۰ درصد و یک یا دو قطره رنگ بریلینت گرین مخلوط و پس از ۲۴ ساعت با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری تعداد پروتوزوا شمارش شد (Dehority, 2003).

معادله‌ها و آنالیزهای آماری

داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. اثر سطوح مختلف اسانس زوفا بر همه متغیرهای پاسخ (به‌جز پارامترهای کینتیک تولید گاز) با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک‌طرفه

در هر دور (run)، مایع شکمبه تازه جمع‌آوری و مورد استفاده قرار گرفت. برای هر سطح تیماری در هر دور، چهار تکرار در نظر گرفته شد. بنابراین، هر مقدار نهایی، حاصل میانگین هشت مشاهده (۲ دور $\times$ ۴ تکرار) می‌باشد. همچنین برای هر دوره انکوباسیون، چهار بطری شاهد (Blank) حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت و فاقد ماده خوراکی و اسانس، به‌منظور تصحیح گاز تولیدی ناشی از فعالیت متابولیکی زمینه‌ای مایع شکمبه، انکوبه شدند. بطری‌ها پس از تزریق ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت، با درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی ویژه مسدود شده و به مدت ۹۶ ساعت در حمام آب گرم با دمای ثابت ۳۹ درجه سلسیوس قرار داده شدند (Kazemi & Mokhtarpour, 2021). فشار و حجم گاز تولیدی در بازه‌های زمانی ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون، با استفاده از روش تئودورو و همکاران (Theodorou et al., 1994) اندازه‌گیری و ثبت گردید.

به‌طور مختصر، در بازه‌های زمانی مشخص انکوباسیون، فشار تولیدشده در داخل هر یک از بطری‌های شیشه‌ای با اتصال فشارسنج دیجیتالی از طریق سوزن‌های تزریق موجود در درپوش پلاستیکی، ثبت شد. سپس، هر بطری شیشه‌ای به یک سرنگ مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری (برند FORTUNA، ساخت آلمان) متصل گردید. پیستون سرنگ پیش از اتصال در موقعیت صفر تنظیم شده بود. پیستون سرنگ به آرامی کشیده شد تا تمام گاز تولیدشده از فلاسک به درون سرنگ انتقال یابد. در این مرحله، فشار داخل سیستم به فشار صفر رسید. در ادامه، حجم گاز مستقیماً از روی درجه‌بندی سرنگ خوانده و ثبت گردید. درپوش پلاستیکی هر یک از بطری‌ها از سرنگ جدا شده و بطری‌ها مجدداً برای ادامه انکوباسیون به داخل حمام آب گرم بازگردانده شدند (Theodorou et al., 1994). فشار گاز تولیدشده در داخل هر بطری با استفاده از یک سنسور (گیج) فشار دیجیتالی برند Autronics، مدل PSA-01-RC1/8، ساخت کره جنوبی (محدوده اندازه‌گیری: ۱۰۰-۰ کیلوپاسکال، دقت: $\pm 1\%$ از کل مقیاس) که از طریق سوزن تزریق متصل به درپوش بطری به سیستم متصل می‌شد، اندازه‌گیری و مقادیر فشار به‌صورت چشمی از روی نمایشگر دستگاه ثبت گردید.

سنجش‌های پس از انکوباسیون

پس از اتمام دوره انکوباسیون ۲۴ ساعته، pH محتوای هر بطری بلافاصله اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها از طریق پارچه پلی‌استری با قطر منافذ ۴۵ میکرون صاف گردید. بخش جامد باقی‌مانده برای تعیین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی به کروزه‌های از پیش توزین شده منتقل شد. برای محاسبه قابلیت هضم ماده آلی، نمونه‌ها به‌مدت چهار

مورد آزمون قرار گرفت. در صورت مشاهده تفاوت معنی‌دار بین تیمارها ($P < 0.05$)، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گردید. تمامی آنالیزها به‌وسیله نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) و رویه PROC GLM انجام پذیرفت.

منحنی تولید گاز با استفاده از مدل رگرسیون غیرخطی ارسکو و مکدونالد (Ørskov & McDonald, 1979) به‌صورت معادله ۳ برازش شد.

$$Y = b(1 - e^{-ct}) \quad (3)$$

که در آن، Y : حجم گاز تولیدشده تجمعی در زمان t ; b : پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر) و c : ثابت نرخ تولید گاز (h^{-1}) می‌باشد. پارامترهای کینتیک تولید گاز (b و c) برای هر تیمار با استفاده از رویه PROC NLIN در نرم‌افزار SAS و براساس داده‌های حجم گاز تجمعی برآورد شدند. مقادیر برآوردشده این پارامترها سپس به‌عنوان داده‌های جدید، در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از تجزیه واریانس (ANOVA) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد.

برای بررسی الگوی پاسخ متغیرها به افزایش سطح اسانس زوفا، در صورت معنی‌دار بودن اثر تیمار، تحلیل رگرسیون چندجمله‌ای (Polynomial Contrast) برای تشخیص روندهای خطی، درجه دو، درجه سه و درجه چهار انجام شد. این تحلیل با استفاده از دستور CONTRAST در رویه PROC GLM اجرا گردید.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه کامل زوفا بر پارامترهای تولید گاز و متان در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که افزودن اسانس زوفا به محیط کشت، تأثیر معنی‌داری بر کلیه پارامترهای تولید گاز و متان داشت ($P < 0.05$). تولید متان به‌طور خطی با افزایش سطح اسانس کاهش یافت، به‌طوری‌که در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر، حجم متان تولیدی به ۸/۵۰ میلی‌لیتر رسید که نسبت به شاهد (۱۲/۳۹ میلی‌لیتر) کاهشی معادل ۳۱/۴ درصد را نشان داد. احتمالاً این کاهش چشمگیر در تولید متان می‌تواند ناشی از اثرات ضد میکروبی ترکیبات فنلی موجود در اسانس زوفا بر جمعیت پروتوزوآها و آرکی‌های متان‌زا باشد. این فرضیه با مطالعات پیشین که حضور مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فنلی را در این گیاه گزارش کرده‌اند، هم‌خوانی دارد (Hatipoğlu et al., 2013). اگرچه محتوای ترکیبات فنلی در اسانس مورد استفاده در این آزمایش به‌طور مستقیم اندازه‌گیری نشد، اما گزارش‌های معتبر قبلی حضور مقادیر قابل توجهی از این ترکیبات را در زوفا تأیید می‌کنند (Skrypnik et al., 2022). بنابراین، اثرات مشاهده‌شده احتمالی را می‌توان به این دسته از ترکیبات زیست‌فعال، که خواص ضد میکروبی و تعدیل‌کنندگی

تخمیر برای آن‌ها به‌خوبی شناخته شده است، نسبت داد. همسو با جهت کلی اثر اسانس‌های گیاهی بر کاهش متان، مطالعات نشان داده‌اند که افزودن اسانس‌های حاوی ترکیبات فنلی قوی [مانند آویشن و پونه (*Origanum vulgare*)] نیز منجر به مهار متانوژن‌ها شد (Benetel et al., 2022). اگرچه ترکیب دقیق اسانس زوفا در این مطالعه اندازه‌گیری نشد، اما گزارش‌های معتبر حاکی از وجود ترکیبات زیست‌فعال مؤثر در آن مانند پینوکامفون‌ها، ایزوپینوکامفون‌ها، لینالول، ۱،۸-سینئول، لیمون و β -پینین است (Mazzanti et al., 1998; Goncariuș & Balmus, 2013). بنابراین، به‌طور کلی می‌توان پذیرفت که اسانس زوفا نیز از طریق سازوکارهای مشابه ضد میکروبی، قادر به کاهش جمعیت متانوژن‌ها است. علاوه بر این، افزودن پنج نوع اسانس گیاهی [میخک (*Syzygium aromaticum*)، اکالیپتوس (*Eucalyptus globulus*)، سیر (*Allium sativum*)، مرزنجوش (*Origanum majorana*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)] به محیط کشت، به‌طور معنی‌داری تولید متان را کاهش داد (Patra & Yu, 2012). این پژوهشگران، کاهش تولید متان را ناشی از کاهش قابل توجه جمعیت آرکی‌های متان‌زا در اثر افزودن اسانس‌ها دانسته‌اند (Patra & Yu, 2012). براساس نتایج این مطالعه، تمامی اسانس‌ها، به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر (یک گرم در لیتر)، به‌صورت خطی و وابسته به دوز، سبب کاهش معنی‌دار در تعداد ژن rRNA آرکئها شدند. برای مثال، اسانس مرزنجوش در بالاترین غلظت، جمعیت آرکی‌ها را تا حدود ۲/۸ واحد لگاریتمی (از ۷/۳۱ به ۴/۵۰) کاهش داد. این کاهش مستقیم در جمعیت ریزجانداران مسئول تولید متان، به‌عنوان سازوکار اصلی کاهش انتشار متان گزارش شده است (Patra & Yu, 2012). پتانسیل تولید گاز (از ۵۹/۳۸ به ۴۷/۱۶ میلی‌لیتر) و تولید گاز تجمعی در تمام زمان‌های اندازه‌گیری (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که می‌تواند نشان‌دهنده اثر مهارتی عمومی اسانس بر فعالیت میکروبی شکمبه باشد (Calsamiglia et al., 2007). علاوه بر فرضیه کاهش جمعیت باکتری‌های متان‌زا و سایر موارد توسط اغلب اسانس‌ها، فرضیه دیگری مطرح است که براساس آن، اسانس برخی گیاهان می‌تواند با ایجاد یک لایه آب‌گریز بر روی بخش‌های محلول خوراک، از تجزیه میکروبی آن‌ها در محیط کشت جلوگیری کرده و در نتیجه تولید متان و سایر گازها را کاهش دهد (Benetel et al., 2022). یکی از مهم‌ترین ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس گیاه زوفا، مونوترپنی به‌نام سیس-پینوکامفون (cis-pinocamphone) است (Pandey et al., 2014). این ترکیب با سهم ۴۹/۷ تا ۵۷/۷ درصدی، به‌وضوح جزء اصلی اسانس در تمام بخش‌های گیاه (برگ، گل و ساقه) محسوب می‌شود. ترکیب عمده بعدی پینوکارون (pinocarvone) است که با درصد ۵/۵ تا ۲۴/۹، به‌ویژه در اسانس گل، با غلظت بیشتری وجود دارد (Pandey et al., 2014). علاوه بر این، خواص ضدباکتریایی و

رخ داد، اما ممکن است نشان‌دهنده پاسخ تطبیقی و بازتوزیع جمعیت‌های میکروبی باقی‌مانده باشد. در این شرایط، ریزجانداران مقاوم‌تر یا جمعیت‌هایی که از مهار رقابتی خود سود برده‌اند، ممکن است فعالیت متابولیکی خود را افزایش دهند که این امر می‌تواند منجر به افزایش نرخ تخمیر اولیه شود (Calsamiglia et al., 2007; Patra & Yu, 2012).

ضدقارچی اسانس زوفا را به ترکیباتی از جمله پینوکامفون (pinocamphone) و همچنین پینوکاروون نسبت داده‌اند که بر اهمیت این ترکیب کلیدی در این گیاه اشاره دارد (Pandey et al., 2014). نرخ تولید گاز در تیمار ۱۵۰ میلی گرم در لیتر کاهش یافت، اما در تیمار ۲۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش معنی‌داری نشان داد که ممکن است ناشی از سازگاری میکروبی یا تغییر در مسیرهای متابولیکی باشد (Khiaosa-Ard & Zebeli, 2013). این افزایش نرخ تولید گاز در بالاترین سطح اسانس، اگرچه هم‌زمان با کاهش حجم کل گاز و متان

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه کامل زوفا بر فراسنجه‌های تولید گاز و متان

Table 2- The effect of different levels of hyssop (*Hyssopus officinalis*) essential oil on gas production kinetics and methane yield

سطح اسانس (میلی گرم/لیتر) Essential oil level (mg/L)	تولید گاز ۲۴ ساعته (میلی لیتر) Cumulative gas production at 24 hours (mL)	تولید گاز ۴۸ ساعته (میلی لیتر) Cumulative gas production at 48 hours (mL)	تولید گاز ۷۲ ساعته (میلی لیتر) Cumulative gas production at 72 hours (mL)	تولید گاز ۹۶ ساعته (میلی لیتر) Cumulative gas production at 96 hours (mL)	ثابت نرخ تولید گاز (درصد/ساعت) Fractional rate constant (%/h)	پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر) Gas production potential (mL)	حجم متان ^۱ (میلی لیتر) Methane volume ¹ (mL)
• (شاهد) 0 (Control)	48.95 ^a	57.14 ^a	61.09 ^a	61.71 ^a	0.097 ^b	59.38 ^a	12.39 ^a
50	45.90 ^{ab}	54.03 ^{ab}	58.58 ^{ab}	59.40 ^{ab}	0.100 ^b	56.54 ^{ab}	11.22 ^{ab}
100	44.35 ^b	51.45 ^b	56.07 ^b	57.37 ^b	0.098 ^b	54.34 ^b	10.62 ^{abc}
150	37.65 ^c	44.65 ^c	49.50 ^c	51.67 ^c	0.087 ^c	48.04 ^c	9.80 ^{bc}
200	38.92 ^c	44.52 ^c	48.22 ^c	49.45 ^c	0.111 ^a	47.16 ^c	8.50 ^c
SEM	1.02	1.21	1.19	1.11	0.0019	1.17	0.38
P-value							
خطی Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.005	<0.0001	<0.0001
درجه دو Quadratic	0.25	0.62	0.59	0.26	<0.0001	0.96	0.82
درجه سه Cubic	0.02	0.05	0.05	0.22	<0.0001	0.11	0.57
درجه چهار Quartic trend	0.008	0.06	0.06	0.11	0.001	0.07	0.92

^۱تولید گاز متان پس از ۲۴ ساعت دوره انکوباسیون اندازه‌گیری شد.

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح پنج درصد می‌باشد ($P < 0.05$).

^۱Methane production was measured after a 24-hour incubation period.

Different letters in each column indicate significant differences between the means at the 5% level ($P < 0.05$).

غلظت اسیدهای چرب فرار کل تا سطح ۱۰۰ میلی گرم در لیتر افزایش یافت (از ۹۵/۵۷ به ۹۸/۸۷ میلی مول در لیتر)، اما در سطوح بالاتر کاهش معنی‌داری نشان داد که بیانگر اثر دوگانه اسانس زوفا بر متابولیسم میکروبی است (Patra, 2011). میزان pH محیط کشت به‌طور خطی با افزایش سطح اسانس کاهش یافت که می‌تواند ناشی از تغییر در الگوی تخمیر و تولید بیشتر اسیدهای چرب فرار باشد که با نتایج علابی و همکاران (Alabi et al., 2023) هم‌خوانی دارد. همچنین غلظت نیتروژن آمونیاکی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت که احتمالاً می‌تواند مربوط به مهار فعالیت باکتری‌های پروتئولیتیک و اوره‌آز توسط ترکیبات فنولی موجود در اسانس باشد. مطابق با

تأثیر سطوح مختلف اسانس زوفا بر جمعیت پروتوزوآ و فراسنجه‌های تخمیری در جدول ۳ ارائه شده است. براساس نتایج، اسانس زوفا تأثیر معنی‌داری بر تمامی پارامترهای تخمیری داشت ($P < 0.05$). جمعیت پروتوزوآی کل به‌طور خطی با افزایش سطح اسانس کاهش یافت، به‌طوری‌که در سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر به $2/87 \times 10^5$ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت رسید که نسبت به شاهد ($4/27 \times 10^5$ سلول در میلی لیتر) کاهشی معادل ۳۲/۸ درصد را نشان داد. این نتیجه با یافته‌های بوداس و همکاران (Bodas et al., 2012) و نیز سلام و عبدالله (Sallam & Abdalla, 2011) مبنی بر اثرات ضدپروتوزوآیی برخی از اسانس‌های گیاهی هم‌خوانی دارد.

ترکیبات فنلی، گروه مهمی از متابولیت‌های ثانویه در گیاه زوفا هستند که تاکنون انواعی مختلفی از آن‌ها از جمله اسیدهای فنلی (مانند اسیدهای رزمارینیک، فرولیک، کافئیک، کلروژنیک و پی-کوماریک)، مشتقات فلاونول (از جمله روتین، کوئرسیتین و ایزو کوئرسیتین) و فلاون‌ها (مانند آپیزین و لوتئولین) در این گیاه شناسایی شده‌اند (Skrypnik et al., 2022).

یافته‌های این مطالعه، اسانس برخی گیاهان می‌تواند فعالیت‌های پروتئولیتیکی و اوره‌آزی را مهار کند (Selje et al., 2007; Dorantes-Iturbide et al., 2022; Saral et al., 2024). باکتری‌های اوره‌کافت (*Ureolytic bacteria*) و آنزیم اوره‌آز تولیدی آن‌ها، نقش کلیدی در تجزیه اوره به آمونیاک در اکوسیستم‌هایی مانند شکمبه دارند (Patra, 2015). بنابراین مهار آن‌ها می‌تواند منجر به کاهش غلظت آمونیاک شود (Patra, 2015).

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف اسانس گیاه کامل زوفا بر جمعیت کل پروتوزوآ و فراسنجه‌های تخمیری در شرایط برون تنی

Table 3- Effect of different levels of whole hyssop (*Hyssopus officinalis*) essential oil on total protozoa population and fermentation parameters under *in vitro* conditions

سطح اسانس (میلی‌گرم/لیتر) Essential oil level (mg/L)	pH	غلظت اسیدهای چرب فرار کل (میلی‌مول/لیتر) Total VFA concentration (mmol/L)	پروتوزوای کل ($\times 10^5$ سلول/میلی‌لیتر) Total protozoal population ($\times 10^5$ cells/mL)	غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم/دسی‌لیتر) Ammonia nitrogen concentration (mg/dL)
۰ (شاهد) 0 (Control)	6.78 ^a	95.57 ^{bc}	4.27 ^a	37.75 ^a
50	6.72 ^a	96.75 ^{ab}	3.97 ^b	36.75 ^{ab}
100	6.62 ^b	98.87 ^a	3.60 ^c	35.60 ^{bc}
150	6.48 ^c	93.50 ^c	3.15 ^d	34.32 ^c
200	6.30 ^d	89.25 ^d	2.87 ^d	32.40 ^d
SEM	0.04	0.80	0.12	0.45
P-value				
خطی Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
درجه دو Quadratic	0.0007	<0.0001	0.93	0.10
درجه سه Cubic	0.79	0.94	0.28	0.61
درجه چهار Quartic trend	0.84	0.013	0.66	0.83

حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌ها در سطح پنج درصد می‌باشد ($P < 0.05$).

همه پارامترهای تخمیری موجود در این جدول، پس از ۲۴ ساعت دوره انکوباسیون، اندازه‌گیری شدند.

Different letters in each column indicate significant differences between the means at the 5% level ($P < 0.05$).

All fermentation parameters presented in this table were measured following a 24-hour incubation.

منجر به بهبود تولید پروتئین میکروبی و راندمان سنتز پروتئین میکروبی و توده میکروبی شد (Mehdipour Golbotte et al., 2022; Brice et al., 2022). احتمالاً افزایش توده میکروبی و راندمان سنتز آن در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس زوفا را می‌توان ناشی از اثر تعدیل‌کننده وابسته به دوز دانست؛ به این معنا که این غلظت، تعادل میکروبی شکمبه را در جهتی مطلوب بازآرایی می‌کند. در این سطح، اسانس زوفا جمعیت پروتوزوآهای رقیب را کاهش داده و در نتیجه بخشی از منابع غذایی و نیتروژن که معمولاً توسط پروتوزوآها مصرف یا بازیافت می‌شود، در اختیار باکتری‌های مولد پروتئین میکروبی قرار می‌گیرد. هم‌زمان با کاهش هدررفت انرژی (کاهش متان) و کاهش نیتروژن قابل اتلاف (کاهش آمونیاک)، سهم بیشتری از انرژی و نیتروژن برای سنتز توده میکروبی قابل

تأثیر سطوح مختلف اسانس زوفا بر شاخص‌های تجزیه‌پذیری و فراسنجه‌های میکروبی در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اسانس زوفا تأثیر معنی‌داری روی برخی از شاخص‌های تجزیه‌پذیری و فراسنجه‌های میکروبی داشت ($P < 0.05$). هر دو شاخص توده میکروبی و راندمان سنتز آن، نسبت به شاهد، حدود ۱۹ درصد در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر بهبود یافتند، اما در سطوح ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش نشان دادند. این الگوی پاسخ درجه دو به‌وضوح نشان می‌دهد که سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، دوز بهینه اسانس زوفا برای حداکثر کارایی میکروبی بود. در سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر، راندمان سنتز توده میکروبی از ۲۵/۹۹ درصد به ۳۱/۰۵ درصد افزایش یافت که بهبود ۱۹/۵ درصدی را نشان می‌دهد. همسو با نتایج فعلی، افزودن اسانس‌های مختلف به محیط کشت

ضریب تفکیک پذیری در این مطالعه نشان دهنده بهبود هضم نبوده و در واقع، بازتابی از تغییر الگوی تخمیر و مهار برخی ریزجانداران است (Chouchen et al., 2018). از سوی دیگر، تجزیه پذیری NDF، ماده آلی و ماده خشک به طور خطی با افزایش سطح اسانس کاهش یافت ($P < 0.05$)، که احتمالاً ناشی از اثر بازدارندگی قوی ترکیبات زیست فعال اسانس (مانند ترپنوئیدها و فنل ها) بر جمعیت و فعالیت باکتری های تخصصی شکمبه است. این ترکیبات می توانند با مهار آنزیم های کلیدی هیدرولیتیک (مانند سلولاز و پروتئاز)، تخریب یکپارچگی غشاء سلولی باکتری های سلولولیتیک (مانند *Fibrobacter succinogenes*) و همچنین کاهش بیان ژن های مرتبط با تجزیه فیبر (CAZymes)، به طور مستقیم کارایی هضم دیواره سلولی گیاهی را کاهش دهند. در سطح ۲۰۰ میلی گرم در لیتر نیز تجزیه پذیری NDF نسبت به شاهد ۶/۸ درصد کاهش یافت که نشان دهنده حساسیت بالای جمعیت های میکروبی فیبرولیتیک به دوزهای افزایشی اسانس است.

استفاده می شود. علاوه بر این، اسانس زوفا ممکن است که از طریق تغییر الگوی تخمیر و افزایش تولید پیش سازهایی مانند پروپیونات، شرایط را برای کارآمدتر کردن سنتز توده میکروبی در محیط کشت، فراهم کرده باشد. مجموعه این فرآیندها باعث می شود که اسانس زوفا در این غلظت، به عنوان یک تعدیل کننده مؤثر تخمیر عمل کند. ضریب تفکیک پذیری نیز در سطح ۱۰۰ میلی گرم اسانس زوفا به حداکثر مقدار خود (۳/۱۹) میلی گرم ماده آلی حقیقی هضم شده/میلی لیتر گاز تولید شده) رسید که نشان دهنده بهبود کارایی تبدیل سوبسترا به زیست توده میکروبی است (Blümmel et al., 1997). همسو با نتایج مطالعه حاضر، افزودن اسانس اکالیپتوس به محیط کشت نیز موجب افزایش ضریب تفکیک پذیری شده است (Chouchen et al., 2018). پژوهشگران این افزایش را ناشی از کاهش نامتناسب تولید گاز نسبت به کاهش هضم ماده آلی تفسیر کرده اند. از آنجا که ضریب تفکیک پذیری از نسبت ماده آلی تجزیه شده به حجم گاز تولیدی محاسبه می شود، کاهش شدیدتر تولید گاز در قیاس با کاهش هضم ماده آلی به طور مستقیم موجب افزایش این شاخص می شود (Chouchen et al., 2018). بنابراین، افزایش

جدول ۴- تأثیر سطوح مختلف گیاه کامل زوفا بر شاخص های تجزیه پذیری و فراسنجه های میکروبی شکمبه

Table 4- The effect of different levels of whole hyssop plant (*Hyssopus officinalis* L.) on digestibility parameters and ruminal microbial parameters

سطح اسانس (میلی گرم/لیتر) Essential oil level (mg/L)	تجزیه پذیری ماده خشک (درصد) Dry matter degradability (%)	تجزیه پذیری ماده آلی (درصد) Organic matter degradability (%)	تجزیه پذیری الیاف نامحلول در شوینده خنثی (درصد) Neutral detergent fiber degradability (%)	راندمان سنتز توده میکروبی (درصد) Microbial mass synthesis efficiency (%)	توده میکروبی تولیدی (میلی گرم) Microbial biomass yield (mg)	ضریب تفکیک پذیری (میلی گرم ماده آلی حقیقی هضم شده/میلی لیتر گاز تولید شده) Partitioning factor (mg of truly degraded organic matter/mL of gas produced)
۰ (شاهد) 0 (Control)	65.25 ^a	74.90 ^a	47.07 ^a	25.99 ^b	47.68 ^b	2.97 ^b
50	64.42 ^a	73.82 ^{ab}	46.22 ^{ab}	28.29 ^{ab}	51.56 ^{ab}	3.07 ^{ab}
100	63.92 ^{ab}	73.15 ^{bc}	45.69 ^{ab}	31.05 ^a	56.82 ^a	3.19 ^a
150	62.47 ^{bc}	71.99 ^c	44.74 ^b	29.82 ^{ab}	48.34 ^{ab}	3.14 ^{ab}
200	61.10 ^c	70.08 ^d	43.01 ^c	29.50 ^{ab}	45.55 ^b	3.12 ^{ab}
SEM	0.38	0.40	0.35	0.59	1.19	0.026
P-value						
خطی Linear	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.03	0.24	0.03
درجه دو Quadratic	0.23	0.08	0.14	0.04	0.002	0.05
درجه سه Cubic	0.86	0.26	0.37	0.90	0.49	0.95
درجه چهار Quartic trend	0.54	0.81	0.91	0.33	0.05	0.32

حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین ها در سطح پنج درصد می باشد ($P < 0.05$).

پارامترهای مربوط به تجزیه پذیری مواد مغذی، پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، اندازه گیری شدند و مابقی پارامترها بعد از ۹۶ ساعت انکوباسیون محاسبه شدند.

Different letters in each column indicate significant differences between the means at the 5% level ($P < 0.05$).

The parameters related to nutrient degradability were measured after a 24-hour incubation, whereas the remaining parameters were determined after 96 hours of incubation.

نتیجه‌گیری کلی

به‌طور خلاصه، این مطالعه نشان داد که در شرایط برون-تنی، سطح ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس زوفا با ایجاد توازن میان کاهش ۱۴/۳ درصدی متان، افزایش ۱۹/۵ درصدی راندمان سنتز میکروبی و حفظ قابلیت هضم، به‌عنوان دوز بهینه عمل می‌کند. این الگوی پاسخ، احتمالاً از تعدیل انتخابی جمعیت میکروبی شکمبه (کاهش پروتوزوآها و متانوژن‌ها) نشأت می‌گیرد. با در نظر

گرفتن محدودیت ذاتی شرایط برون‌تنی (نبود جریان عبور مواد و تطبیق میکروبی)، تأیید این یافته‌ها در آزمایش‌های درون‌تنی ضروری است. مطالعه آینده باید بر تعیین دوز مؤثر در جیره کامل و ارزیابی پاسخ‌های عملکردی دام به این افزودنی متمرکز شود. در نهایت، برای بهره‌برداری عملی، پایداری اسانس در محیط شکمبه چالشی کلیدی است که راهکارهایی مانند ریزپوشانی می‌تواند برای رفع آن، مورد بررسی قرار گیرد.

References

- Alabi, J. O., Okedoyin, D. O., Anotaenwere, C. C., Wuaku, M., Gray, D., Adelusi, O. O., Ike, K. A., Olagunju, L. K., Dele, P. A., & Anele, U. Y. (2023). Essential oil blends with or without fumaric acid influenced *in vitro* rumen fermentation, greenhouse gas emission, and volatile fatty acids production of a total mixed ration. *Ruminants*, 3(4), 373-384. <https://doi.org/10.3390/ruminants3040031>
- Barnett, A. J. G., & Reid, R. (1957). Studies on the production of volatile fatty acids from grass in artificial rumen. 1. Volatile fatty acids production from fresh grasses. *The Journal of Agricultural Science*, 48(3), 315-321. <https://doi.org/10.1017/S0021859600031671>
- Benetel, G., Silva, T. D. S., Fagundes, G. M., Welter, K. C., Melo, F. A., Lobo, A. A., Muir, J. P., & Bueno, I. C. S. (2022). Essential oils as *in vitro* ruminal fermentation manipulators to mitigate methane emission by beef cattle grazing tropical grasses. *Molecules*, 27(7), 2227. <https://doi.org/10.3390/molecules27072227>
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & 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., & López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1-4), 78-93. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2012.07.010>
- Brice, R. M., Dele, P. A., Ike, K. A., Shaw, Y. A., Olagunju, L. K., Orimaye, O. E., Subedi, K., & Anele, U. Y. (2022). Effects of essential oil blends on *in vitro* apparent and truly degradable dry matter, efficiency of microbial production, total short-chain fatty acids and greenhouse gas emissions of two dairy cow diets. *Animals*, 12(17), 2185. <https://doi.org/10.3390/ani12172185>
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P. W., Castillejos, L., & Ferret, A. (2007). Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90(6), 2580-2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Chouchen, R., Attia, K., Darej, C., & Moujahed, N. (2018). Potential of eucalyptus (*Eucalyptus camaldulensis*) essential oil to modify *in vitro* rumen fermentation in sheep. *Journal of Applied Animal Research*, 46(1), 1220-1225. <https://doi.org/10.1080/09712119.2018.1486318>
- Dehority, B. A. (2003). Rumen Microbiology. British Library Cataloguing in Publication Data, 372 p.
- Dorantes-Iturbide, G., Orzuna-Orzuna, J. F., Lara-Bueno, A., Mendoza-Martínez, G. D., Miranda-Romero, L. A., & Lee-Rangel, H. A. (2022). Essential oils as a dietary additive for small ruminants: A meta-analysis on performance, rumen parameters, serum metabolites, and product quality. *Veterinary Sciences*, 9(9), 475. <https://doi.org/10.3390/vetsci9090475>
- Fathiazad, F., Mazandarani, M., & Hamedeyazdan, S. (2011). Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 1(2), 63-67. <https://doi.org/10.5681/apb.2011.009>
- Fievez, V., Babaymo, O. J., & Demeyer, D. (2005). Estimation of direct and indirect gas production in syringes: A tool to estimate short chain fatty acid production that requires minimal laboratory facilities. *Animal Feed Science and Technology*, 123-124(part 1), 197-210. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.05.001>
- Goncearius, M., & Balmus, Z. (2013). Diversity of the essential oil content and chemical composition of *Hyssopus officinalis* L. genotypes. *Muzeul Olteniei Craiova. Studii și comunicări. Științele Naturii*, 29(1), 171-178.
- Hatipoğlu, G., Sökmen, M., Bektaş, E., Daferera, D., Sökmen, A., Demir, E., & Şahin, H. (2013). Automated and standard extraction of antioxidant phenolic compounds of *Hyssopus officinalis* L. ssp. *angustifolius*. *Industrial Crops and Products*, 43: 427-433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.028>
- Kazemi, M. (2019). Effects of hexane extract of medicinal plant *Artemisia aucheri* Boiss. on fermentation characteristics, gas production parameters, and degradability under *in vitro* conditions. *Iranian Journal of*

- Medicinal and Aromatic Plants*, 35(6), 902-913. (In Persian). <https://doi.org/10.22092/ijmapr.2019.125475.2524>
16. Kazemi, M., & Eskandari Torbaghan, Y. (2019). The effect of oil extracted from *Borago officinalis* L. whole plant at flowering stage on some ruminal fermentation parameters of sheep. *Veterinary Clinical Pathology*, 13(3), 305-320. (In Persian). <https://doi.org/10.30495/jvcp.2019.669193>
 17. Kazemi, M., & Mokhtarpour, A. (2020). The effect of *Nepeta glomerulosa* Boiss. essential oil on *in vitro* gas production and ruminal fermentation. *Journal of Livestock Science and Technologies*, 8(2), 1-8. <https://doi.org/10.22103/jlst.2020.16510.1328>
 18. Kazemi, M., & Mokhtarpour, A. (2021). *In vitro* and *in vivo* evaluation of some tree leaves as forage sources in the diet of Baluchi male lambs. *Small Ruminant Research*, 201, 106416. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2021.106416>
 19. Khiaosa-Ard, R., & Zebeli, Q. (2013). Meta-analysis of the effects of essential oils and their bioactive compounds on rumen fermentation characteristics and feed efficiency in ruminants. *Journal of Animal Science*, 91(4), 1819-1830. <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5691>
 20. Kizil, S., Hasimi, N., Tolan, V., Kilinc, E., & Karatas, H. (2010). Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) essential oil. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38(3), 99-103. <https://doi.org/10.15835/nbha3834788>
 21. Komolong, M. K., Barber, D. G., & McNeill, D. M. (2001). Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. *Animal Feed Science and Technology*, 92(1-2), 59-72. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00246-2](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00246-2)
 22. Ma, X., Ma, X., Ma, Z., Wang, J., Sun, Z., Yu, W., Li, F., & Ding, J. (2014). Effect of *Hyssopus officinalis* L. on inhibiting airway inflammation and immune regulation in a chronic asthmatic mouse model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(5), 1371-1374. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1978>
 23. Makkar, H. P. S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: *In vitro* screening of plant resources for extra-nutritional attributes in ruminants. Springer, New York, pp. 106-144. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3297-3_7
 24. Mazzanti, G., Battinelli, L., & Salvatore, G. (1998). Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). *Flavour and Fragrance Journal*, 13(5), 289-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199809\)13:5<289::AID-FFJ750>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199809)13:5<289::AID-FFJ750>3.0.CO;2-A)
 25. Mehdi-pour Golbotte, M., Malecky, M., Aliarabi, H., & Zamani, P. (2022). Effects of different levels of the savory essential oil on *in vitro* ruminal fermentation parameters, microbial protein synthesis and protozoal populations in two diets supplemented with fish and soybean oil. *Journal of Ruminant Research*, 10(3), 87-110. (In Persian). <https://doi.org/10.22069/ejrr.2022.20101.1845>
 26. Menke, K.H., & 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.
 27. NRC. (2007). Nutrient requirements of small ruminants: Sheep, goats, cervids, and new world camelids. 6th Edition. Washington, DC: National Academy Press. 384p.
 28. Ørskov, E.R., & McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*, 92(2), 499-503. <https://doi.org/10.1017/S0021859600063048>
 29. Pandey, V., Verma, R.S., Chauhan, A., & Tiwari, R. (2014). Compositional variation in the leaf, flower and stem essential oils of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) from Western Himalaya. *Journal of Herbal Medicine*, 4(2), 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2013.12.001>
 30. Patra, A.K. (2007). Nutritional management in organic livestock farming for improved ruminant health and production: An overview. *Livestock Research for Rural Development*, 19(3), 41.
 31. Patra, A.K. (2011). Effects of essential oils on rumen fermentation, microbial ecology and ruminant production. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 416-428. <https://doi.org/10.3923/ajava.2011.416.428>
 32. Patra, A.K. (2015). Urea/ammonia metabolism in the rumen and toxicity in ruminants. In *Rumen Microbiology: From Evolution to Revolution* (pp. 329-341). Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2401-3_22
 33. Patra, A.K. & Yu, Z. (2012). Effects of essential oils on methane production and fermentation by, and abundance and diversity of, rumen microbial populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4271-4280. <https://doi.org/10.1128/AEM.00309-12>
 34. Pepeta, B.N., Hassen, A., & Tesfamariam, E.H. (2024). Quantifying the impact of different dietary rumen modulating strategies on enteric methane emission and productivity in ruminant livestock: A meta-analysis. *Animals*, 14(5), 763. <https://doi.org/10.3390/ani14050763>
 35. Sallam, S.M.A., & Abdalla, A.L. (2011). Antimethanogenic and antiprotozoal effect of some essential oils *in vitro*. *Egyptian Journal of Animal Production*, 48(2), 203-215. <https://doi.org/10.21608/ejap.2011.94074>
 36. Saral, Ö., Baltaş, N. & Karaköse, M. (2024). An inhibition potential on some metabolic enzymes (urease and

- xanthine oxidase), essential oil contents and antioxidant effect of *Sideritis lanata* L. *Chemical Papers*, 78(15), 8211-8217. <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03661-6>
37. Selje, N., Hoffmann, E.M., Muetzel, S., Ningrat, R., Wallace, R.J., & Becker, K. (2007). Results of a screening programme to identify plants or plant extracts that inhibit ruminal protein degradation. *British Journal of Nutrition*, 98(1), 45-53. <https://doi.org/10.1017/S0007114507472506>
38. Skrypnik, L., Feduraev, P., Styran, T., Golovin, A., Katserov, D., Nebreeva, S., & Maslennikov, P. (2022). Biomass, phenolic compounds, essential oil content, and antioxidant properties of Hyssop (*Hyssopus officinalis* L.) grown in hydroponics as affected by treatment type and selenium concentration. *Horticulturae*, 8(11), 1037. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8111037>
39. Theodorou, M.K., Williams, B.A., Dhanoa, M.S., McAllan, A.B., & France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. *Animal Feed Science and Technology*, 48(3-4), 185-197. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(94\)90171-6](https://doi.org/10.1016/0377-8401(94)90171-6)
40. Van Soest, P.V., Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(91)78551-2)
41. Vercoe, E.P., Makkar, H.P.S., & Schlink, A.C. (2010). *In vitro* screening of plant resources for extra nutritional attributes in ruminants: Nuclear and related methodologies. In: *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. Springer, New York, pp. 106-144. <https://doi.org/10.1007/978-90-481-3297-3>
42. Wencelová, M., Váradyová, Z., Mihalíková, K., Čobanová, K., Plachá, I., Pristaš, P., Jalč, D., & Kišidayová, S. (2015). Rumen fermentation pattern, lipid metabolism and the microbial community of sheep fed a high-concentrate diet supplemented with a mix of medicinal plants. *Small Ruminant Research*, 125: 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.01.028>
43. Yousefi, M., Hoseini, S.M., Abtahi, B., Vatnikov, Y.A., Kulikov, E.V., & Rodionova, N.Y. (2022). Effects of dietary methanolic extract of hyssop, *Hyssopus officinalis*, on growth performance, hepatic antioxidant, humoral and intestinal immunity, and intestinal bacteria of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Frontiers in Marine Science*, 9: 1026651. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1026651>
44. Zheng, S., Li, Y., Chen, C., Wang, N., & Yang, F. (2025). Solutions to the dilemma of antibiotics use in livestock and poultry farming: Regulation policy and alternatives. *Toxics*, 13(5), 348. <https://doi.org/10.3390/toxics13050348>