نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۹۳، ص. ۶۵-۵۴

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 6, No. 1, Spring 2014, p. 54-65

اثرات اسانس گیاه دارویی بومی مروتلخ *(Salvia mirzayanii)* بر تخمیر میکروبی شکمبه و قابلیت هضم مواد مغذی با استفاده از سیستم تولید گاز و کشت پیوسته دو جریانه

یونس اولادشنبه[۱]- محسن ساری[۲*]- مرتضی چاجی[۳]- طاهره محمدآبادی[۴]- محمد بوجارپور[۵]

تاریخ دریافت:۱۳۹۲/۲/۳
تاریخ پذیرش:۱۳۹۲/۱۰/۱

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی اثرات سطوح مختلف اسانس مروتلخ (*Salvia mirzayanii*) بر خصوصیات تخمیر شکمبه‌ای با استفاده از تکنیک تولید گاز و سیستم کشت پیوسته دوجریانه بود. آزمایش تولید گاز با افزودن سطوح ۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم اسانس به یک لیتر محیط کشت انجام شد. در مرحله بعد پنج فرمنتر کشت پیوسته دو جریانه (۱۷۵۰ میلی‌لیتر) در سه دوره متوالی ۹ روزه مورد استفاده قرار گرفت. دما ۳۸/۵°C و نرخ رقت فاز مایع (۱۰ درصد بر ساعت) و فاز جامد (۵ درصد بر ساعت) ثابت نگه داشته شد. فرمنترها روزانه با ۱۲۰ گرم ماده خشک تغذیه شدند. تیمارها با چینش طرح بلوک کاملاً تصادفی شامل سطوح مختلف اسانس (۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و یک سطح مونسین (۰/۱ درصد ماده خشک جیره) بود. افزودن اسانس مروتلخ به جیره موجب کاهش پتانسیل تولید گاز، تجزیه پذیری ماده آلی و پروتئین میکروبی شد. قابلیت هضم ماده آلی و NDF در سطح ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به تیمار شاهد در سیستم کشت پیوسته دوجریانه به طور معنی‌داری افزایش یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی قبل از خوراک صبح در تیمارهای با سطح ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار شاهد پایین‌تر بود. میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۸ ساعت پس از خوراک دهی در بالاترین سطح اسانس (۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کم‌ترین مقدار را داشت. نتایج مشخص نمود که اسانس مروتلخ خواص ضد میکروبی داشته و می‌تواند تخمیر شکمبه‌ای را تحت تاثیر قرار دهد. استفاده از سطح پایین روغن‌های ضروری موجود در اسانس مروتلخ می‌تواند بهبود دهنده قابلیت هضم مواد مغذی در شکمبه باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس مروتلخ، قابلیت هضم مواد مغذی، کشت پیوسته دوجریانه

مقدمه

دستکاری تخمیر شکمبه از جمله محورهای اصلی پژوهش‌های تغذیه نشخوارکنندگان در چند دهه اخیر می‌باشد. از ابتدای دهه ۱۹۷۰ یونوفرها به منظور تغییر جمعیت‌های میکروبی شکمبه و بهبود عملکرد تولید و سلامت حیوان استفاده می‌شدند (۳۱). به علت خطر انتقال بقایای آنتی‌بیوتیک به گوشت و شیر و نیز شکل گیری سویه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک (۱۵)، مصرف آن‌ها در بسیاری از کشورها محدود و یا ممنوع شده است (۸). در سال‌های اخیر استفاده از مواد جایگزین مانند عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی به دلیل فعالیت ضد میکروبی آنها در برابر میکروارگانیسم‌ها از جمله باکتری‌های شکمبه، مورد توجه قرار گرفته است (۸). متابولیت‌های ثانویه گیاهی بوسیله اختلال در ساختار دیواره سلولی، انتقال الکترون، شیب یونی، انتقال پروتئین، مراحل فسفوریلاسیون و سایر واکنش‌های وابسته به آنزیم، فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند (۱۳).

مروتلخ گیاهی بومی و منحصر به مناطق جنوبی ایران بوده و بوته‌ای و چند ساله متعلق به شاخه گیاهان گل‌دار (*Magnoliophyta*)، رده دولپه‌ای‌ها (*Magnoliopsida*)، خانواده *Lamiaceae* یا *Labiatae* جنس *Salvia* و گونه *Mirzayanii* می‌باشد (۴۱). در اسانس گیاه مروتلخ تعداد ۸۱ ترکیب شناسایی گردیده است که مهمترین آن‌ها لینالیل‌استات (۴/۱ درصد)، لینالول (۵/۲ درصد)، اسپاتولنول (۱۰/۴ درصد)، دلتا-کادنین (۵/۸ درصد)، آلفا-ترپینیل‌استات (۵/۲ درصد)، آلفا-کادینول (۴/۷ درصد)، آلفا-ترپینئول (۳ درصد)، بتا-اودسمول (۴/۵ درصد)، کوبنول (۴/۴ درصد) و تیمول (۲ درصد) می‌باشد (۲۶). در طب سنتی ایران عصاره

۱، ۲، ۳، ۴ و ۵- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و استادیاران گروه علوم دامی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
(*- نویسنده مسئول: Email: mohsensare@yahoo.com)

برگ‌های مروتلخ در درمان ناراحتی‌های معده بکار می‌رود (۱۹). همچنین اسانس مروتلخ دارای اثر مهارکنندگی در مقابل برخی باکتری‌های بیماری‌زا گرم مثبت و گرم منفی و همچنین قارچ‌ها می‌باشد (۲۵).

تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با بررسی اثرات اسانس مروتلخ بر تخمیر میکروبی و قابلیت هضم مواد مغذی در شکمبه صورت نگرفته است. هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات اسانس مروتلخ بر تخمیر میکروبی و قابلیت هضم مواد مغذی با استفاده از تکنیک تولید گاز و سیستم کشت پیوسته دوجریانه می باشد.

مواد و روش‌ها

گیاه مروتلخ پس از شناسایی در آزمایشگاه گیاه‌شناسی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان و تایید آن توسط دانشگاه علوم پزشکی شیراز، از خواستگاه بومی آن در منطقه لارستان در استان فارس تهیه شد و جهت اسانس‌گیری به شرکت باریج اسانس کاشان منتقل گردید. استخراج اسانس از بخش‌های هوایی (برگ) گیاه بوسیله تقطیر با بخار آب توسط دستگاه کلوونجر[1] با بازده ۰/۹ درصد انجام شد.

آزمایش تولید گاز

مایع شکمبه از سه رأس گاو نر فیستولا شده هولشتاین (با وزن ۳۱ ± ۶۵۰ کیلوگرم) به کمک لوله پلاستیکی و پمپ خلاء، قبل از تغذیه صبح جمع آوری شد. حیوانات با استفاده از جیره حاوی علوفه یونجه (۶۰/۳ درصد)، دانه ذرت (۱۷/۲ درصد)، دانه جو (۱۲/۲ درصد)، کنجاله سویا (۹/۷ درصد) و مکمل ویتامین و مواد معدنی (۰/۶ درصد) تغذیه می‌شدند. محتویات شکمبه به وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف شده و سپس به درون بطری در داخل فلاسک عایق‌دار آب گرم (۳۹ ^{o}C) قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال یافت. جهت اطمینان از شرایط بی هوازی مایع شکمبه صاف شده گاز دی اکسید کربن به آن تزریق می‌شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۹ ^{o}C) نگه‌داری گردید.

آزمایش تولید گاز با استفاده از روش منک و استینگس (۳۴) برای تعیین اثر سطوح مختلف اسانس مروتلخ (۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر خصوصیات تخمیر جیره حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد مواد متراکم صورت پذیرفت. ترکیب جیره مورد استفاده بر اساس ماده خشک شامل یونجه (۱۵ درصد)، دانه ذرت (۲۶ درصد)، دانه جو (۴۲/۶ درصد)، کنجاله سویا (۱۵ درصد)، آهک (۰/۵ درصد)، نمک (۰/۳ درصد) و مکمل ویتامین و مواد معدنی (۰/۶ درصد) بود که الگویی از جیره با مواد متراکم بالا در انتهای دوره پروار گوساله‌های نر را فراهم می‌ساخت. ترکیب شیمیایی جیره شامل ۱۶/۵ درصد پروتئین خام، ۲/۵۲ مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک انرژی قابل متابولیسم، ۵۷/۲ درصد NFC ، ۲۰/۳ درصد NDF، ۱۰/۵ درصد ADF، ۶/۸ درصد NDF علوفه‌ای، ۵/۲ درصد خاکستر و ۲/۶ درصد عصاره اتری بود. نمونه‌های خوراکی با آسیاب با غربال یک میلی‌متری آسیاب شده و تخمیر و تولید گاز نمونه‌های آزمایشی (برای هر تیمار ۳ تکرار) در سرنگ‌های شیشه‌ای ۱۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه سوبسترا، ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه بود، اندازه‌گیری شد. میزان گاز تولید شده در زمان‌های ۰، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از انکوباسیون ثبت گردید. پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون pH پایانی محیط کشت با استفاده از دستگاه pH متر (مدل ۷۴۴، شرکت Metrohm سوئیس) اندازه گیری شد. جهت تعیین تجزیه پذیری ماده آلی، با فرض حذف کامل بقایای میکروبی بوسیله شوینده (۵۳)، مواد باقی‌مانده هضم با استفاده از محلول شوینده خنثی به مدت یک ساعت جوشانده شد. مواد باقی‌مانده کاملا شسته شده و پس از انتقال به کروزه در دمای ۹۰ ^{o}C به مدت ۲۴ ساعت ابتدا خشک شده و سپس توزین گردید. پس از آن مواد باقی‌مانده به مدت ۴ ساعت در دمای ۶۰۰ ^{o}C خاکستر شدند و تجزیه پذیری ماده آلی برآورد گردید. در شروع آزمایش، سطوح مختلف اسانس به سرنگ‌ها افزوده شدند. مقدار اسانس افزوده شده به هر سرنگ در تیمارهای مختلف به ترتیب برابر صفر، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰، ۷۲ و ۱۴۴ میلی‌گرم بود.

به منظور تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادله ($P=b(1-e^{-ct})$) استفاده شد (۳۹). در این معادله فراسنجه b گاز تولیدی از بخش تخمیر پذیر، c ثابت نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک) و قابلیت هضم ماده آلی (درصد) با استفاده از معادله منک و همکاران (۳۵) محاسبه گردید.

$$ME\ (MJ/Kg\ DM) = 2.2 + 0.136\ GP + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2$$

$$IVOMD\ (\%) = 14.88 + 0.889\ GP + 0.45\ CP + 0.0651\ XA$$

DM: ماده خشک، CP: درصد پروتئین خام، XA: درصد خاکستر و GP: میلی لیتر گاز خالص تولیدی از ۳۰۰ میلی‌گرم نمونه خشک پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون.

پارتیشنینگ فاکتور پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (PF_{24}؛ مقیاسی از بازده تخمیر) به صورت نسبت ماده تجزیه شده واقعی (TDS) به حجم گاز (میلی‌لیتر) تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون (یعنی ماده آلی تجزیه شده واقعی/کل تولید گاز (GP_{24})) محاسبه شد (۴).

1- Clevenger

تولید پروتئین میکروبی (MP) به صورت زیر محاسبه گردید (۴):

MP (mg / g DM) = mgTDS-(ml gas × 2.2mg / ml)

که ۲/۲ عامل استوکیومتری بر حسب میلی‌گرم کربن، هیدروژن و اکسیژن مورد نیاز برای ساخت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) همراه با تولید یک میلی‌لیتر گاز (۴).

اسیدهای چرب کوتاه زنجیر با استفاده از معادله گتاچیو و همکاران (۱۸) به صورت زیر محاسبه شد:

SCFA (mmol/300 mg DM) = 0.0222 GP-0.00425

در این معادله GP: گاز خالص تولیدی پس از ۲۴ ساعت (میلی‌لیتر/۳۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) است.

نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS 9.2 (۴۲) آنالیز شدند. اختلاف تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از روش دانکن (۱۴) مورد بررسی قرار گرفت.

سیستم کشت پیوسته دو جریانه

پنج فرمنتر کشت پیوسته دو جریانه با حجم ۱۷۵۰ میلی‌لیتر در سه دوره متوالی ۹ روزه (۶ روز عادت پذیری و ۳ روز نمونه‌گیری) مورد استفاده قرار گرفت. فرمنترها با مایع شکمبه به دست آمده از کل محتویات شکمبه ۳ حیوان که جیره تغذیه شده به آنها در بخش آزمایش تولیدگاز آورده شده است، تلقیح گردیدند. مایع شکمبه با استفاده از ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید. دما ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد و نرخ رقت فاز مایع (۱۰ درصد بر ساعت) و فاز جامد (۵ درصد بر ساعت) ثابت نگه داشته شد. شرایط بی‌هوازی با تزریق مداوم نیتروژن با سرعت ۴۰ میلی‌لیتر بر دقیقه حفظ شد. بزاق مصنوعی به طور مداوم به فلاسک‌های تخمیر تزریق شده و برای شبیه‌سازی بازچرخ نیتروژن ۰/۴ گرم بر لیتر اوره به آن افزوده شد (۵۴). فرمنترها روزانه با ۱۲۰ گرم ماده خشک در سه بخش مساوی در ساعت‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ تغذیه می‌شدند.

تیمارها با چینش طرح بلوک کاملاً تصادفی و با سطوح مختلف اسانس مروتلخ (۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و یک سطح مونسین (۰/۱ درصد ماده خشک) بصورت تصادفی به واحدهای آزمایشی اختصاص یافتند. جیره مورد استفاده مشابه با جیره آورده شده در بخش تولید گاز می‌باشد. کنترل pH= ۶/۲ با تزریق اسید کلریدریک ۳ مولار یا سود ۵ مولار توسط pH متر (مدل ۸۲۷، شرکت Metrohm کشور سوئیس) صورت گرفت.

طی روزهای نمونه‌گیری (سه روز آخر هر دوره) مخازن جمع‌آوری خروجی‌های فلاسک‌های تخمیر[1] (فاز جامد و مایع) با قرار دادن در آب سرد با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد خنک نگه داشته شدند تا از فعالیت میکروبی ممانعت به عمل آید. خروجی‌های فاز جامد و مایع با یکدیگر مخلوط شده و پس از هم زده شدن به مدت یک دقیقه با استفاده از مخلوط‌کن، به کمک پمپ خلا، نمونه‌ای ۵۰۰ میلی‌لیتری از کل مخلوط گرفته می‌شد. در انتهای هر دوره نمونه‌های گرفته شده طی سه روز گذشته، یکی شده و پس از مخلوط کردن به مدت دو دقیقه، نمونه‌هایی برای اندازه‌گیری کل نیتروژن و نیتروژن آمونیاکی گرفته می‌شد. مابقی نمونه خشک شده و برای ماده خشک، خاکستر، NDF و ADF آنالیز شدند (۴۳).

تجزیه شیمیایی ماده خشک افلوانت با خشک کردن سه تکرار ۳۰۰ میلی‌لیتری از آن در ۶۵ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. در هر دوره آزمایشی به منظور برآورد تغییرات نیتروژن آمونیاکی نمونه گیری تا ۸ ساعت پس از خوراک دهی انجام شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر (Biochrom مدل Libra S22 ساخت کشور انگلیس) تعیین گردید (۵).

برای تعیین نیتروژن کل از روش کجلدال (با دستگاه هضم مدل ۲۰۴۰ و دستگاه تیتراسیون مدل ۲۳۰۰ شرکت Foss Tecator کشور سوئد) استفاده گردید. (۲).

داده‌ها در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری SAS (۴۲) آنالیز شدند. تفاوت در تیمارها در سطح احتمال ۵ درصد با استفاده از آزمون مقایسات چندگانه توکی (۵۲) برای قابلیت هضم و دانکن برای نیتروژن آمونیاکی مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

آنالیز روغن‌های ضروری مروتلخ جهت شناسایی ترکیبات غالب موجود در آن با استفاده از دستگاه GC به انجام رسید و ۱۰۷ ترکیب مورد تشخیص قرار گرفت که از این میان، لینالول و لینالیل استات بیشترین مقادیر را دارا بودند.

تولید گاز

پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز در شرایط افزودن مقادیر مختلف اسانس مروتلخ (۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) به جیره با مواد متراکم بالا طی ۹۶ ساعت انکوباسیون و همچنین تولید گاز ساعت‌های مختلف انکوباسیون (۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) در جدول ۱ و نمودار ۱ آورده شده است. در مقایسه با شاهد افزودن سطوح ۴۰۰ تا ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس مروتلخ باعث کاهش معنی‌دار (P<۰/۰۵) پتانسیل تولید گاز و افزایش معنی دار نرخ تولید گاز شدند. به طوری که افزودن سطح ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس (۰/۰۳۳۷ میلی‌لیتر بر ساعت) بیش‌ترین نرخ تولید گاز را داشت.

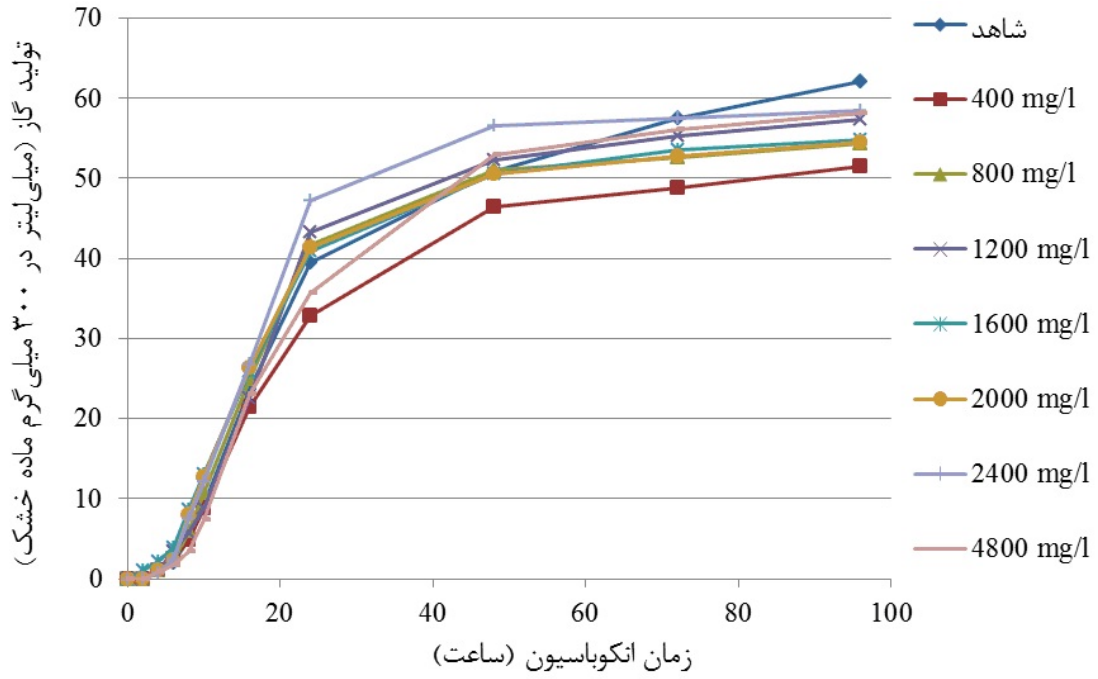
1- Effluent

جدول ۱- اثر سطوح مختلف اسانس مروتلخ در جیره حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد مواد متراکم بر فراسنجه‌های تولید گاز

تیمار*	فراسنجه‌های تخمیر		حجم گاز در ساعت‌های مختلف (میلی‌لیتر به ازای ۰/۳ گرم ماده خشک)			
	b (میلی‌لیتر)	c (میلی‌لیتر بر ساعت)	۲٤	٤۸	۷۲	۹٦
صفر	۷۱/۳±۴/۹^{a}	۰/۰۲۳۶±۰/۰۰۳۴^{c}	۳۹/۵^{c}	۵۰/۸^{bc}	۵۷/۵^{a}	۶۲/۲^{a}
۴۰۰	۵۴/۶±۳/۲^{c}	۰/۰۲۷۷±۰/۰۰۳۶^{b}	۳۳/۰^{d}	۴۳/۳^{d}	۴۶/۰^{c}	۴۹/۰^{d}
۸۰۰	۵۸/۹±۳/۶^{c}	۰/۰۳۱۸±۰/۰۰۴۶^{a}	۴۱/۷^{bc}	۵۰/۳^{bc}	۵۱/۷^{b}	۵۳/۰^{c}
۱۲۰۰	۶۴/۹±۴/۷^{b}	۰/۰۲۷۸±۰/۰۰۴۵^{b}	۴۳/۸^{b}	۵۲/۲^{bc}	۵۵/۲^{ab}	۵۷/۲^{b}
۱۶۰۰	۵۹/۱±۳/۲^{c}	۰/۰۳۱۰±۰/۰۰۳۹^{ab}	۳۹/۳^{c}	۴۹/۳^{c}	۵۲/۰^{b}	۵۳/۳^{c}
۲۰۰۰	۵۸/۱±۳/۲^{c}	۰/۰۳۳۷±۰/۰۰۴۴^{a}	۴۱/۵^{bc}	۴۹/۸^{bc}	۵۱/۷^{b}	۵۳/۰^{c}
۲۴۰۰	۶۵/۰±۴/۱^{b}	۰/۰۳۲۷±۰/۰۰۴۹^{a}	۴۷/۳^{a}	۵۶/۳^{a}	۵۷/۳^{a}	۵۸/۷^{ab}
۴۸۰۰	۶۹/۶±۵/۵۷^{a}	۰/۰۲۲۱±۰/۰۰۳۷^{c}	۳۶/۰^{d}	۵۳/۷^{ab}	۵۶/۰^{a}	۵۷/۷^{b}
SEM	۱/۴۴	۰/۰۰۱۲۶	۱/۰۶	۱/۲۴	۱/۱۷	۱/۲۴

b: پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر؛ c: نرخ تولید گاز؛ SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند ($P<۰/۰۵$)، *- سطوح مختلف اسانس مروتلخ (میلی‌گرم در لیتر).

پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون افزودن دو سطح ۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس باعث کاهش معنی‌دار حجم گاز تولیدی شدند ($P<۰/۰۵$). اما افزودن سطوح ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به تیمار شاهد تولید گاز (۲۴ ساعت) را افزایش دادند ($P<۰/۰۵$). پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون افزودن سطوح ۴۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به تیمار بدون مکمل، به ترتیب سبب کاهش و افزایش مقدار گاز تولیدی شدند ($P<۰/۰۵$) اما با دیگر سطوح افزایشی اسانس اختلاف معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نشد. در مقایسه با گروه شاهد پس از ۷۲ ساعت انکوباسیون افزودن سطوح ۴۰۰ ، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس باعث کاهش معنی‌دار حجم گاز تولیدی شدند ($P<۰/۰۵$). حجم گاز تولید شده پس از پایان انکوباسیون (۹۶ ساعت) نسبت به تیمار شاهد در تمام سطوح مکمل اسانس (به جز سطح ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کاهش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$).



شکل ۱- اثر سطوح مختلف اسانس مرو تلخ بر روند تولید گاز جیره حاوی ۱۵ درصد علوفه و ۸۵ درصد مواد متراکم

کاهش تولید گاز می‌تواند بدلیل خاصیت ضد میکروبی روغن‌های ضروری مروتلخ باشد که با محدود کردن فعالیت میکروارگانیسم‌ها از تولید گاز جلوگیری می‌کند. بیشتر حجم گاز تولید شده در شکمبه شامل دی اکسیدکربن و متان می‌باشد (۱۲). مواد افزودنی خوراکی برای کاهش تولید متان از طریق مکانیسم‌های متفاوتی مانند مهار پروتوزوآها، تحریک تولید پروپیونات، کاهش تولید هیدروژن، مهار مستقیم تولید کننده‌های متان عمل می‌کنند (۱۱). اگرچه تاکنون مطالعه‌ای با استفاده از گیاه مروتلخ یا عصاره و اسانس آن بر تخمیر میکروبی شکمبه صورت نپذیرفته است اما بررسی روغن‌های ضروری گیاهان دارویی نشان می‌دهد که ترکیبات موثر موجود در اسانس اکلیل کوهی، ریحان و گشنیز مشابهت‌هایی با اسانس مروتلخ به لحاظ لینالول و ۱و۸–سینئول دارند (۱۶). هماهنگ با یافته‌های آزمایش حاضر در مطالعه جهانی عزیز آبادی و همکاران (۲۴)، در ۲۴ ساعت انکوباسیون کشت دسته‌ای که در آن اثرات ۱۹ نوع اسانس گیاهی با استفاده از جیره‌ای حاوی ۲۰ درصد علوفه و ۸۰ درصد مواد متراکم مورد بررسی قرار گرفت مشاهده شد که اسانس‌های گشنیز، ریحان و اکلیل کوهی حجم گاز تولیدی را پس از پایان انکوباسیون کاهش دادند. ممکن است اسانس گیاه مروتلخ با مهار مستقیم تولید کننده‌های متان و همین طور کاهش کل اسیدهای چرب فرار سبب کاهش حجم گاز تولیدی در برخی زمان‌های انکوباسیون شده باشد. با اینحال بررسی الگوی گاز تولیدی نشان می‌دهد که اگرچه افزودن سطوح پایین اسانس به جیره، کاهش در تولید گاز و پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر را موجب گردیده است ولی با افزایش مقدار اسانس افزوده شده به محیط کشت، تاثیر آن بویژه در بالاترین سطوح، کاهش یافته و در برخی موارد تاثیری مشاهده نشده است. الگوی خاص و ناهمگون روغن‌های ضروری این گیاه (۲۶) در کنار امکان تخمیر اسکلت کربنی موجود در برخی ترکیبات موجود در اسانس توسط باکتری‌ها و نیز تحریک تخمیر میکروبی توسط آنها (۴۵) از جمله دلایل پیشنهادی برای پاسخ غیر خطی مشاهده شده در این فراسنجه‌ها می‌باشد. به دلیل محدودیت اطلاعات موجود در رابطه با تاثیر اسانس این گیاه بومی بر تخمیر شکمبه‌ای، مطالعات بیشتری برای جمع‌بندی نهایی مورد نیاز است.

قابلیت هضم

نتایج مربوط به اثر افزودن سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر قابلیت هضم ظاهری ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، پارتیشنینگ فاکتور، توده میکروبی، pH و همچنین تجزیه پذیری ماده آلی در جدول ۲ آورده شده است. قابلیت هضم ظاهری ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تیمار مکمل شده با سطوح ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به گروه شاهد افزایش یافت (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین مقدار با افزودن ۲۴۰۰ میلی‌گرم اسانس در لیتر محیط کشت مشاهده شد. اما سطوح ۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر نسبت به تیمار بدون مکمل اسانس کاهش معنی‌دار این شاخص‌ها را موجب گردید (P<۰/۰۵).

جدول ۲- اثر افزودن مقادیر مختلف اسانس مروتلخ بر برخی فراسنجه‌های تخمیر با استفاده از تولید گاز

تیمار*	ماده آلی تجزیه شده واقعی	IVOMD	ME	SCFA	PF	Biomass	pH
۰	۲۷۲/۷^{a}	۵۷/۷^{c}	۸/۵^{c}	۲/۹۱^{c}	۸/۸۲^{bc}	۲۰۴/۵^{ab}	۶/۵۱^{e}
۴۰۰	۲۶۵/۵^{a}	۵۲/۰^{d}	۷/۶^{d}	۲/۴۳^{d}	۱۰/۰۲^{a}	۲۰۷/۲^{a}	۶/۶۴^{dc}
۸۰۰	۲۶۶/۲^{a}	۵۹/۷^{bc}	۸/۸^{bc}	۳/۰۷^{bc}	۹/۹۵^{a}	۲۰۷/۳^{a}	۶/۶۰^{d}
۱۲۰۰	۲۵۲/۳^{bc}	۶۱/۶^{ab}	۹/۱^{ab}	۳/۲۳^{ab}	۸/۷۴^{bc}	۱۸۸/۸^{c}	۶/۷۲^{ab}
۱۶۰۰	۲۴۵/۵^{c}	۵۷/۶^{c}	۸/۵^{c}	۲/۹۰^{c}	۹/۲۷^{ab}	۱۸۷/۲^{c}	۶/۷۰^{abc}
۲۰۰۰	۲۵۲/۲^{bc}	۵۹/۵^{bc}	۸/۸^{bc}	۳/۰۶^{bc}	۹/۴۹^{ab}	۱۹۲/۹^{bc}	۶/۶۷^{bc}
۲۴۰۰	۲۵۶/۳^{b}	۶۴/۷^{a}	۹/۶^{a}	۳/۴۹^{a}	۹/۰۸^{abc}	۱۹۴/۲^{bc}	۶/۷۲^{ab}
۴۸۰۰	۲۳۴/۲^{d}	۵۳/۷^{d}	۷/۹^{d}	۲/۶۵^{d}	۸/۰۸^{c}	۱۷۰/۴^{d}	۶/۷۴^{a}
SEM	۲/۵۲	۱/۰۴	۰/۱۶۰	۰/۰۷۹	۰/۲۹۶	۳/۶۲	۰/۰۲۰۱

IVOMD: قابلیت هضم ظاهری ماده آلی (گرم در ۱۰۰ گرم ماده آلی) و ME: انرژی قابل متابولیسم (مگا ژول بر کیلوگرم ماده خشک) پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، SCFA: اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (میلی‌مول/ ۰/۳ گرم ماده خشک)، PF: میلی‌گرم ماده آلی هضم شده به ازای هر میلی‌لیتر گاز تولیدی؛ Biomass: میلی‌گرم توده میکروبی تولید شده در شکمبه. SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P <۰/۰۵).

*- سطوح مختلف اسانس مروتلخ (میلی‌گرم در لیتر).

اگرچه مقدار ماده آلی تجزیه شده واقعی در تیمار شاهد با تیمارهای دریافت کننده سطح ۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم اسانس در لیتر محیط کشت تفاوت معنی‌داری را نشان نداد اما سطوح بالاتر اسانس (۱۲۰۰ تا ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت) موجب کاهش معنی‌دار ماده آلی تجزیه شده واقعی گردید (P<۰/۰۵) که در بین این سطوح تیمار مکمل شده با ۴۸۰۰ میلی‌گرم اسانس در لیتر کم‌ترین مقدار (۲۳۴/۲ میلی‌گرم) را به خود اختصاص داد.

در آزمایش حاضر اسانس مورد استفاده حاوی اجزای مونوترپن‌های اکسیژن‌دار مانند لینالول، لینالیل استات، ۱و۸–سینئول و تیمول است که دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند (۴۷). ممکن است کاهش قابلیت هضم واقعی ماده آلی بوسیله برخی سطوح اسانس مروتلخ به علت ترکیبات فنولیک موجود در آن باشد.

موافق با آزمایش حاضر سلام و همکاران (۴۵)، در ۲۴ ساعت انکوباسیون در شرایط برون‌تنی، اثر اسانس‌های ۴ گونه گیاهی (بومادران[1]، نعناع، آرتیمیسیا جودایکا[2] و اسکینوس تریبین تیفولیوس[3]) را مورد بررسی قرار داده و بیان نمودند که قابلیت هضم حقیقی ماده خشک و ماده آلی (گرم در کیلوگرم ماده خشک) با اسانس نعناع (۵۰ و ۷۵ میکرولیتر در ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه)، بومادران (۵۰ میکرولیتر در ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه) و اسکینوس تریبین تیفولیوس (۵۰ و ۷۵ میکرولیتر در ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه) کاهش نشان داد. همچنین طالب‌زاده و همکاران (۵۰)، گزارش دادند، هنگامی که اسانس آویشن در سطوح ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر محیط کشت بکار رفت تنها در غلظت بالای ۴۵۰ میکروگرم، قابلیت هضم واقعی ماده آلی کاهش نشان داد. این محققین وجود ترکیبات فنولیک در این گیاهان را به عنوان دلیل اصلی کاهش قابلیت هضم مطرح نمودند. در مطالعه حاضر نیز مقدار ماده آلی تجزیه شده واقعی تنها در غلظت‌های بالای ۱۲۰۰ میلی‌گرم در لیتر کاهش یافت. اما قابلیت هضم ظاهری ماده آلی در برخی تیمارها (با سطوح ۱۲۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس) افزایش نشان داد. ممکن است این تغییرات به علت وجود مونوترپن‌های هیدروکربنی موجود در اسانس مروتلخ باشد که سبب تحریک فعالیت میکروبی و در نتیجه افزایش قابلیت تخمیر جیره شده است. در بین متابولیت‌های ثانویه ارزیابی شده، مونوترپن‌های اکسیژن‌دار و به ویژه مونوترپن‌های الکلی و آلدهیدی شدیداً رشد و متابولیسم میکروب‌های شکمبه را مهار می‌کنند، در حالی که مونوترپن‌های هیدروکربنی فعالیت مهارکنندگی کمی داشته و ممکن است گاهی اوقات فعالیت میکروبی را تحریک کنند (۴۵).

نتایج مربوط به اثر افزودن سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر مقدار پارتیشنینگ فاکتور (PF_{24})، تولید پروتئین میکروبی و pH پایانی انکوباسیون در جدول ۲ آورده شده است. میزان ماده آلی هضم شده به ازای هر میلی‌لیتر گاز تولیدی (PF) تیمار مکمل شده با سطوح پایین اسانس (۴۰۰ و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث افزایش معنی‌دار شاخص PF نسبت به تیمار شاهد شد (P<۰/۰۵). اما در سطوح بالاتر اسانس (۱۲۰۰، ۱۶۰۰، ۲۰۰۰، ۲۴۰۰ و ۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) هیچ تفاوت معنی‌داری با تیمار بدون مکمل (شاهد) مشاهده نگردید. توده میکروبی تولید شده در تیمار حاوی مقادیر متوسط اسانس (۱۲۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و سطح بالای اسانس (۴۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کاهش یافت اما هیچ کدام از تیمارهای دیگر اختلاف معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند.

نتایج مربوط به pH محیط کشت پایان انکوباسیون نشان داد که افزودن اسانس، افزایش pH محیط را در کلیه سطوح در مقایسه با تیمار شاهد موجب گردید و در بالاترین سطح اسانس بیش‌ترین مقدار pH (۶/۷۴) از لحاظ عددی مشاهده شد.

پارتیشنینگ فاکتور (PF) بیان کننده نسبت تجزیه واقعی سوبسترا به حجم گاز تولیدی در دوره‌های زمانی انکوباسیون (معمولا ۲۴ یا ۴۸ ساعت) می‌باشد (۳۸). کیم و همکاران (۲۸) گزارش نمودند هنگامی که کاه برنج با گیاه افسنطین که غنی از ترپن‌ها است جایگزین شود، تولید پروتئین میکروبی و جریان نیتروژن میکروبی به دئودنوم در گوسفند بهبود می‌یابد. لازم به ذکر است که اسانس افسنطین[4] دارای ترکیبات کامفور، ۱و۸ سینئول و وانیلین است (۲۹) که روغن ضروری با اهمیت ۱و۸–سینئول موجود در آن مشابه با مروتلخ می‌باشد. این یافته‌ها با نتایج آزمایش حاضر که در آن سطوح بالای اسانس مروتلخ موجب کاهش پروتئین میکروبی و راندمان تولید پروتئین میکروبی شدند، هماهنگ نیست. موافق با آزمایش حاضر سلام و همکاران (۴۵)، در بررسی اثر اسانس‌های بومادران، نعناع[5]، آرتیمیسیا جودایکا و اسکینوس تریبین تیفولیوس بیان نمودند که مقدار PF (میلی‌گرم ماده آلی تجزیه شده واقعی بر حجم گاز تولیدی) با اسانس نعناع (۵۰ و ۷۵ میکرولیتر در ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه) و اسانس بومادران (۵۰ میکرولیتر در ۷۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه) افزایش یافت. همچنین در مطالعه طالب زاده و همکاران (۵۰) بیان گردید هنگامی که سطح اسانس آویشن افزایش یابد مقدار پروتئین میکروبی و PF به ترتیب کاهش و افزایش نشان می‌دهد. افزایش pH احتمالاً به دلیل کاهش غلظت کل اسیدهای چرب فرار است که در دیگر مطالعات نیز نشان داده شده است (۳).

1- *Achillea santolina*
2- *Artemisia judaica*
3- *Schinus terebinthifolius*
4- *Artemisis vularis*
5- *Mentha microphylla*

در کل نتایج این بخش از آزمایش نشان می‌دهد که با وجود کاهش ماده آلی تجزیه شده واقعی و تولید توده باکتریایی با افزودن اسانس، احتمالاً به دلیل وجود مونوترپن‌های محرک تخمیر در کنار مونوترپن‌های دارای خواص ضد میکروبی در مرو تلخ، پاسخ یکنواختی در نتیجه افزودن این اسانس به محیط کشت مشاهده نشده و برای جمع‌بندی نهایی، مطالعات بیشتری مورد نیاز است.

آزمایش کشت پیوسته دو جریانه

نتایج مربوط به اثر مونسین و سطوح مختلف اسانس مروتلخ (۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی، ADF و NDF در جدول-۳ آورده شده است. اگرچه قابلیت هضم ظاهری ماده خشک در تیمار با سطح ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس و همچنین تیمار حاوی مونسین از نظر عددی بیشتر بود اما تفاوت معنی داری با تیمار شاهد مشاهده نگردید. افزایش در قابلیت هضم ظاهری ماده آلی در تیمار با سطح ۸۰۰ و ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس و تیمار مونسین نسبت به گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین قابلیت هضم ظاهری NDF روند مشابه‌ی را نشان داد به طوری که بالاترین میزان قابلیت هضم ظاهری NDF، در تیمار با سطح ۸۰۰ میلی‌گرم و پایین‌ترین میزان در تیمار با سطح ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس مشاهده گردید. از نظر قابلیت هضم ظاهری ADF، تفاوت معنی داری بین تیمارها مشاهده نشد. تیمار با سطح ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس کم‌ترین میزان قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، ماده آلی و NDF، را نشان داد.

اسانس مروتلخ حاوی ترکیبات آلفا ترپینیل استات، ۱و۸-سینئول، لینالول، لینالیل استات و گاما-کادینن است (۴۸). اثرات چنین ترکیباتی بر قابلیت هضم مواد مغذی در نشخوارکنندگان مطالعه نشده است. به نظر می‌رسد که اثرات ضد میکروبی اسانس مروتلخ به علت ترکیبات ۱و۸-سینئول و لینالول باشد (۲۵).

اگرچه روغن‌های ضروری موجود در گیاه مروتلخ الگویی منحصر به فرد داشته و تاکنون مطالعه‌ای در رابطه با تاثیر این گیاه بر تخمیر شکمبه‌ای صورت نپذیرفته است بررسی گیاهان دارویی نشان می‌دهد که ترکیبات موثر موجود در گیاهان جنس اسطخدوس (Lavandula) از جمله *Lavandula Angustifolia* و *Lavandula Officinalis* مشابهت‌هایی با *Salvia mirzayanii* به لحاظ لینالیل استات و لینالول دارد (۵۵). هماهنگ با آزمایش حاضر برودیسکو و همکاران (۶) با استفاده از فرمنترهای کشت پیوسته دوجریانه، مشاهده کردند *Lavandula Officinalis* تخمیر میکروبی ماده آلی جیره و همچنین قابلیت هضم حقیقی ماده آلی را افزایش داد. همچنین جیمنز-پیرالتا و همکاران (۲۷) اثرات مقادیر مختلف (۰/۶، ۱/۲ و ۱/۸ میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک جیره‌ای با مواد متراکم بالا) عصاره دو گونه درخت (*Leucaena leucocephala* و *Salix babylonica*)، را بر تخمیر میکروبی شکمبه در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار داده و مشاهده نمودند که در غلظت‌های بالا عصاره‌های گیاهی (۱/۲ و ۱/۸ میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)، مقادیر ماده تجزیه شده واقعی، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، اسیدهای چرب فرار کوتاه زنجیر و تولید پروتئین میکروبی در مقایسه با غلظت ۰/۶ میلی‌لیتر در گرم ماده خشک افزایش داد.

به نظر می‌رسد که اسانس مروتلخ در سطح پایین (۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت)، با تحت تاثیر قرار دادن محیط تخمیر یا فعالیت میکروارگانیسم‌های موثر در قابلیت هضم، بهبود این شاخص را به دنبال داشته است اما در سطوح بالاتر (۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر محیط کشت)، اثر مهارکنندگی بر میکروارگانیسم‌های شکمبه بروز یافته و این اثر مطلوب کاهش یافته است.

جدول ۳- اثر مونسین و سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر قابلیت هضم ظاهری برخی مواد مغذی جیره حاوی ۸۵ درصد مواد متراکم

مقدار اسانس مروتلخ	قابلیت هضم ظاهری (درصد)			
(میلی‌گرم در لیتر)	ماده خشک	ماده آلی	الیاف نامحلول در شوینده خنثی	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی
کنترل	۳۲/۲۳	۳۳/۸۰^{b}	۳۷/۷۸^{b}	۵۱/۴۳
۸۰۰	۴۰/۱۱	۴۱/۴۵^{a}	۵۷/۰۴^{a}	۴۶/۵۷
۱۶۰۰	۳۵/۳۹	۳۸/۹۴^{a}	۵۰/۳۱^{a}	۴۸/۸۶
۲۴۰۰	۳۱/۲۱	۳۳/۳۲^{b}	۲۸/۹۰^{c}	۴۸/۳۵
مونسین*	۳۵/۳۵	۴۰/۲۱^{a}	۵۳/۱۶^{a}	۶۳/۸۱
P value	۰/۰۹	۰/۰۴	۰/۰۳	۰/۰۷
S.E.M.	۲/۱۶	۱/۷۴	۳/۲۲	۳/۰۹

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی دار می باشند (P<۰/۰۵).

*- سطح ۰/۱ درصد ماده خشک جیره آنتی‌بیوتیک مونسین به عنوان کنترل مثبت.

موافق با آزمایش حاضر، تقوی نژاد و همکاران (۴۹) با استفاده از اسانس پونه (۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر) در ۲۴ ساعت انکوباسیون، گزارش دادند که قابلیت هضم حقیقی ماده آلی و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک در سطوح پایین افزایش یافت اما در سطح بالاتر این مقادیر را کاهش داد.

در فاز تاخیر، جمعیت‌های میکروبی برای تشکیل توده میکروبی روی ذرات خوراکی رشد و تکثیر می‌یابند که این رویه برای هضم مواد غیر محلول خوراکی لازم است (۱۲). نشان داده شده است که ترکیبات فنولیک، از هضم بخش‌های محلول مواد خوراکی (۱) و همچنین اتصال باکتری‌ها به بخش‌های غیر محلول مواد خوراکی جلوگیری می‌کند (۳۲). ترکیباتی با ساختار فنولیک مانند تیمول و کارواکرول (اجزای اصلی اسانس آویشن) بسته به مقدار استفاده، دارای اثرات ضد باکتریایی یا مهار رشد باکتری هستند (۱۷). ممکن است اجزای اسانس مروتلخ اثرات ضد میکروبی مانند تیمول و کارواکرول داشته باشد. می‌توان این گونه بیان کرد که سطوح بالای اسانس مروتلخ ممکن است اثرات مهارکنندگی بر برخی از گروه‌های باکتریایی داشته است. گزارش شده است که ساختارهای فنولیک می‌توانند با تخریب دیواره سلولی، غیر فعال کردن آنزیم‌ها و کم کردن سوبسترا و یون‌های فلزی که برای سوخت و ساز سلولی مورد نیاز است را موجب گردد (۲۰). سانتورو و همکاران (۴۶) اثرات ضد پروتوزوآیی روغن‌های ضروری پونه کوهی و آویشن را مورد مطالعه قرار داده و نشان دادند که به علت خاصیت آبگریزی این اسانس‌ها، آنها می‌توانند به غشای سلولی نفوذ کرده و در مسیرهای متابولیک سیتوپلاسم دخالت کنند.

در این مطالعه مونسین در مقایسه با تیمار شاهد افزایش غیر معنی‌دار قابلیت هضم NDF، ماده آلی وADF را موجب گردید. این نتایج با مشاهدات پلایزیر و همکاران (۴۰) که گزارش نمودند مونسین قابلیت هضم ظاهری NDF و ADF را در گاوهای تغذیه شده با علوفه بالا افزایش داد، اما اثر قابل توجهی بر قابلیت هضم فیبر در گاوهای تغذیه شده با جیره حاوی مواد متراکم بالا نداشت مطابقت دارد. به طور کلی در این آزمایش اثر مونسین بر قابلیت هضم مواد مغذی مشابه با سطح ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس بود.

الگوی تغییرات نیتروژن آمونیاکی تا ۸ ساعت پس از خوراک دهی صبح در جدول ۴ آورده شده است. غلظت نیتروژن آمونیاکی قبل از خوراک صبح (ساعت صفر) در تیمارهای با سطح ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس و همچنین ۸ ساعت پس از غذا دهی در تیمار مکمل شده با سطح ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس نسبت به تیمار شاهد پایین‌تر بود (P<۰/۰۵). اما در تیمار حاوی مونسین، غلظت نیتروژن آمونیاکی ۶ ساعت پس از خوراک دهی نسبت به تیمار شاهد بالاتر بود (P<۰/۰۵). میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۸ ساعت پس از خوراک دهی در تیمار مکمل شده با بالاترین سطح اسانس (۳۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) کم‌ترین مقدار را داشت (P<۰/۰۵). مقایسه‌ای که برای هر تیمار در فواصل ۲ ساعته، ۸ ساعت پس از خوراک دهی، با زمان قبل از خوراک دهی (زمان صفر) صورت گرفت، نشان داد که در زمان‌های ۲ و ۸ ساعت پس از خوراک دهی مقدار نیتروژن آمونیاکی در تیمار با سطح ۱۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر، نسبت به زمان قبل از خوراک دهی (ساعت صفر) بالاتر بود (P<۰/۰۵). اما در تیمار با سطح ۸۰۰ میلی‌گرم غلظت نیتروژن آمونیاکی، ۸ ساعت پس از خوراک دهی کاهش نشان داد (P<۰/۰۵).

جدول ٤- اثر مونسین و سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر مقدار نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در۱۰۰ میلی‌لیتر) تا ۸ ساعت پس از خوراک دهی صبح

زمان (پس از غذا دهی) ساعت	کنترل	۸۰۰	۱۶۰۰	۲٤۰۰	مونسین*	SEM
۰	۱۹/۴۹	۲۲/۰۷	۱۴/۷۸ ^{x}	۱۳/۳۱۳ ^{x}	۲۰/۷۲	۱/۱۶
۲	۱۸/۰۸	۱۸/۷۶	۲۳/۶۹ ^{y}	۱۶/۶۲۸	۲۰/۷۱	۱/۰۸
۴	۱۹/۹۰	۱۶/۶۹	۱۷/۶۲	۱۵/۲۹۸	۲۲/۸۸	۱/۴۵
۶	۱۶/۴۱	۱۵/۴۶	۱۴/۶۹	۱۵/۳۳۵	۲۲/۸۶ ^{x}	۱/۹۸
۸	۱۹/۷۵	۱۴/۱۴^{y}	۲۰/۵۰ ^{y}	۱۲/۴۸^{x}	۱۷/۰۰	۱/۸۰
SEM	۱/۹۶	۲/۲۵	۱/۲۱	۱/۵۵	۱/۴۸	
میانگین	۱۸/۷۲	۱۷/۴۲	۱۸/۲۵	۱۴/۵۵^{x}	۲۰/۸۳	۰/۹۳

X: در هر ردیف با تیمار کنترل تفاوت معنی‌دار دارد (P<۰/۰۵). Y: در هر ستون با ساعت صفر (قبل از خوراک دهی صبح) تفاوت معنی‌دار دارد (P<۰/۰۵). *- سطح ۰/۱ درصد ماده خشک جیره آنتی‌بیوتیک مونسین به عنوان کنترل مثبت.

جدول ۵- اثر مونسین و سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر نیتروژن کل و جریان نیتروژن آمونیاکی از فرمنترها

تیمار	نیتروژن کل (گرم در روز)	نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)
کنترل	۴/۴۸	۱۳/۷۸^{b}
۸۰۰	۳/۹۵	۱۷/۲۲^{ab}
۱۶۰۰	۴/۱۴	۲۰/۵۶^{a}
۲۴۰۰	۴/۳۸	۲۱/۴۲^{a}
مونسین*	۳/۸۶	۱۸/۸۷^{ab}
SEM	۰/۱۶۶	۱/۲۸

SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها، میانگین های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

*- سطح ۰/۱ درصد ماده خشک جیره آنتی‌بیوتیک مونسین به عنوان کنترل مثبت.

اثر مونسین و سطوح مختلف اسانس مروتلخ بر جریان نیتروژن آمونیاکی و نیتروژن کل خروجی از فرمنترها در جدول ۵ آورده شده است. جریان نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای مکمل شده با سطوح ۱۶۰۰ و ۲۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌داری نشان داد (P<۰/۰۵) اما تیمارهای دیگر (مونسین و سطح ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس) تفاوت معنی داری با شاهد مشاهده نگردید. اگرچه از نظر عددی باعث افزایش مقدار نیتروژن آمونیاکی شد. در رابطه با اثر اسانس بر مقدار نیتروژن کل، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نگردید. اگرچه در تیمارهای مکمل شده با سطح ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس و مونسین از نظر عددی نسبت به تیمار شاهد کمتر بود.

فرآیندهایی مانند دآمیناسیون اسیدهای آمینه خوراک، تجزیه میکروبی، جذب و استفاده میکروبی، غلظت آمونیاک را در شکمبه تنظیم می‌کنند (۲۲). هماهنگ با آزمایش حاضر تکیپ و همکاران (۵۱) با تغذیه برگ پونه کوهی (۵۰۰ گرم در روز) به گاوهای پر تولید مشاهده کردند که غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه افزایش یافت. دلیل این امر به وجود کارواکرول در اسانس پونه کوهی نسبت داده شد. همچنین بر اساس نتایج آزمایشات برون‌تنی گزارش شده که کارواکرول مقدار پپتیدهای بزرگ را کاهش و غلظت نیتروژن آمونیاکی را ۲ ساعت پس از خوراک دهی افزایش داد (۷). ماچبواوف و همکاران (۳۰) گزارش نمودند که با افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقادیر بالای سینمالدهید فعالیت تولید کننده‌های متان یا عملکرد تخمیر بوسیله کارواکرول/تیمول، کاهش یافت. این محققین بیان نمودند که تعداد قابل توجهی باکتری در فاز ساکن در انتهای ۱۶ ساعت انکوباسیون وجود دارد و بالا رفتن تولید آمونیاک به علت افزایش تجزیه باکتریایی است. همین طور در آزمایش تقوی نژاد و همکاران (۴۹)، بوسیله اسانس نعناع که حاوی کاروون، لیمونن، لینالول و ۱و۸-سینئول است (۳۷)، در ۲۴ ساعت انکوباسیون، سطوح ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم در لیتر، غلظت نیتروژن آمونیاکی افزایش داد اما در سطوح بالاتر به علت مهار فعالیت پروتئولیتیک این مقدار کاهش یافت. نشان داده شده است که مخلوط روغن‌های ضروری از رشد برخی باکتری‌های اصلی تولید کننده آمونیاک مانند کلستریدیوم استیکلاندی و پپتو استرپتوکوکوس انئربیوس ممانعت می‌کند در حالی که روی رشد سایر باکتری‌ها (به عنوان مثال، کلستریدیوم آمیلوفیلوم) اثری ندارد (۳۳). هماهنگ با یافته‌های آزمایش حاضر، کاستلیجوس و همکاران (۱۰) با استفاده از فرمنترهای کشت پیوسته نشان دادند که غلظت نیتروژن آمونیاکی ۲ ساعت پس از خوراک دهی نسبت به زمان صفر در تیمارهایی که با سطوح ۵، ۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر از مخلوط روغن‌های ضروری تغذیه شده بودند افزایش یافت.

سوخت و ساز پروتئین توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه فرآیند پیچیده‌ای است و به همین صورت، تاثیر اسانس‌های گیاهی بر متابولیسم پروتئین وابسته به مقدار، ترکیب شیمیایی و ساختار اسانس، متفاوت است (۹، ۲۳ و ۴۴). ممکن است اسانس مروتلخ با افزایش فعالیت پروتئولیتیک میکروارگانیسم‌های شکمبه و همچنین افزایش رشد برخی از باکتری‌های اصلی تولید کننده آمونیاک و افزایش تجزیه باکتریایی در فاز ساکن رشد موجب افزایش غلظت آمونیاک شده باشد.

بر اساس نتایج سنبلی و همکاران (۴۸)، جاویدنیا و همکاران (۲۵)، به نظر می‌رسد که اثرات ضد میکروبی اسانس مروتلخ به علت ترکیبات ۱و۸-سینئول (۲۱/۲ درصد) و لینالول (۸/۹ درصد) باشد. مقادیر بالای ۳۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم بسیاری از اسانس‌های گیاهی، منجر به کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و اسیدهای چرب فرار می‌شود، که نشان دهنده طیف وسیع خصوصیات ضد باکتریایی است، اما در مقادیر پایین‌تر اثرات نسبتاً کمی مشاهده می‌گردد (۲۱ و ۳۶). به عنوان مثال، در شرایط استفاده از مقادیر پایین اوگنول (۰/۳ و ۳ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت نیتروژن آمونیاکی تمایل به افزایش داشت و مقدار متوسط آن (۳۰ میلی‌گرم در لیتر) بدون تاثیر بود، در حالی که در بالاترین سطوح (۳۰۰، ۳۰۰۰ و ۵۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، غلظت نیتروژن آمونیاکی به طور معنی‌داری کاهش نشان داد (۱۱). یافته‌های این آزمایش تایید کننده تاثیر وابسته به دوز مشاهده شده در آزمایش حاضر می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس مروتلخ می‌تواند تخمیر شکمبه‌ای را تحت تاثیر قرار داده و اثرات ضد میکروبی آن وابسته به مقدار مورد استفاده است. با توجه به محدود بودن اطلاعات در دسترس درباره تاثیر روغن‌های ضروری مروتلخ بر میکروارگانیسم‌های شکمبه (باکتری‌ها، قارچ‌ها و پروتوزوآها)، پژوهش‌های بیشتری برای جمع بندی نهایی در این رابطه مورد نیاز می‌باشد.

منابع

1- Aharoni, Y., N. Gilboa, and N. Silanikove. 1998. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. Anim. Feed Sci. Technol. 71: 251–267.
2- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
3- Benchaar, C., A. V. Chaves, G. R. Fraser, Y. Wang, K. A. Beauchemin, and T. A. McAllister. 2007. Effects of essential oils and their components on in vitro rumen microbial fermentation. Can. J. Anim. Sci. 87:413–419.
4- Blummel, M., H. Steingss, and K. Becker. 1997. There relationship between in vitro gas production, in vitro microbial biomass yield and 15N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. B. J. Nutri. 77: 911–921.
5- Broderik, G. A. and J. H. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. J. Diary Sci. 63: 64-75.
6- Broudiscou, L. P., Y. Papon, and A. F. Broudiscou. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. Anim. Feed Sci. Technol. 87: 263–277.
7- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, M. D. Carro, and C. Kamel. 2005. Effect of garlic oil and four of its compounds on rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 88: 4393–4404.
8- Calsamiglia, S., M. Busquet, P. W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. J. Dairy Sci. 90: 2580-2595.
9- Castillejos, L., S. Calsamiglia, and A. Ferret. 2006. Effect of essential oils active compounds on rumen microbial fermentation and nutrient flow in *in vitro* systems. J. Dairy Sci. 89: 2649–2658.
10- Castillejos, L., S. Calsamiglia, A. Ferret, and R. Losa. 2007. Effects of dose and adaptation time of a specific blend of essential oils compounds on rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 132: 186–201.
11- Castro-Montoyaa, J., S. De Campeneere, G. Van Ranst, and V. Fievez. 2012. Interactions between methane mitigation additives and basal substrates on *in vitro* methane and VFA production. Anim. Feed Sci. Technol. 176: 47– 60.
12- Dehority, B. A. 2003. Rumen Microbiology. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
13- Dorman, H. J. D., and S. G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbio. 88: 308–316.
14- Duncan, D. B. 1955. Multiple ranges and multiple F-test. Biometr.11: 1–42.
15- Fandiño, G. R., A. V. Chaves, Y. Wang, T. A. McAllister, K. A. Beauchemin, and C. Benchaar. 2008. Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. J. Dairy Sci. 90: 2315-2328.
16- Fornari, T., G. Vicente, E. Vázquez, M. R. García-Risco, and G. Reglero. 2012. Review: Isolation of essential oil from different plants and herbs by supercritical fluid extraction. J. Chromat. 1250: 34-48.
17- Gallucci, M. N., M. Oliva, C. Casero, J. Dambolena, A. Luna, and J. Zygadlo. 2009. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microor-ganisms Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Bacillus cereus. Flavour. Frag. J. 24: 348–354.
18- Getachew, G., H. P. Makkar, and K. Becker. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. Br. J. Nutr. 84: 73–83.
19- Ghannadi, A. R. 2002. *Salvia hydrangea* Iranian Herbal Pharmacopeia, Tehran, pp. 57-65.
20- Goel, G., A. K. Puniya, C. N. Aguliar, and K. Singh. 2005. Interaction of gut microflora with tannins in feeds. Naturwissenschaften 92: 497–503.
21- Hart, K. J., D. R. Yanez-Ruiz, S. M. Duval, N. R. McEwan, and C. J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. Anim. Feed Sci. Technol. 147: 8–35.
22- Hristov, A. N., W. J. Price, and B. Shafii. 2005. A meta-analysis on the relationship between intake of nutrients and body weight with milk volume and milk protein yield in dairy cows. J. Dairy Sci. 88: 2860–2869.
23- Hristov, A. N., J. K. Ropp, S. Zaman, and A. Melgar. 2008. Effects of essential oils on in vitro ruminal fermentation and ammonia release. Anim. Feed Sci. Technol. 144: 55–64.
24- Jahani-Azizabadi, H., M. D. Mesgaran, A. R. Vakili, K. Rezayazdi, and M. Hashemi. 2011. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high

forage diet using in vitro batch culture. Afric. J. Microbiol. Res. 27: 4812-4819.
25- Javidnia, K., R. Miri, M. Assadollahi, and M. Gholami. 2009. Screening of selected plants growing in Iran for antimicrobial activity. Iran. J. Sci. Technol. 33: 329-333.
26- Javidnia, K., R. Miri, M. Kamalinejad, and A. Nasiri. 2002. Composition of Essential oil of Salvia mirzayanii from Iran. Flavour Frag. J. 17: 465-467.
27- Jiménez-Peralta, F. S., A. Z. M. Salem, P. Mejia-Hernández, M. González-Ronquillo, B. Albarrán-Portillo, R. Rojo-Rubio, and J. L. Tinoco-Jaramillo. 2011. Influence of individual and mixed extracts of two tree species on in vitro gas production kinetics of a high concentrate diet fed to growing lambs. Livest. Sci. 136: 192–200.
28- Kim, S. C., A. T. Adesogan, J. H. Shin, M. D. Lee, and Y. D. Ko. 2006. The effects of increasing the level of dietary wormwood (*Artemisia montana Pampan*) on intake, digestibility, N balance and ruminal fermentation characteristics in sheep. Livest. Sci. 100: 261-269.
29- Lee, S. J., H. Y. Chung, I. K. Lee, and I. D. Yoo. 1999. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of *Artemisia vularis* and their antioxidant activity. Korean J. Food. Sci. Technol. 31: 815-822.
30- Macheboeuf, D., D. P. Morgavi, Y. Papon, J. L. Mousset, and M. Arturo-Schaan. 2008. Dose response effects of essential oils on in vitro fermentation activity of the rumen microbial population. Anim. Feed Sci. Technol. 145: 335–350.
31- Martinez, S., J. Madrid, F. Hernandez., M. D. Megia, J. A. Sotomayor, and M. J. Jordan. 2006. Effect of Thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and Monensin on in vitro ruminal degradation and volatile fatty acid production. J. Agric. Food Chem. 54: 6598-6602.
32- McAllister, T. A., H. D. Bae, G. A. Jones, and K. J. Cheng. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. J. Anim. Sci. 72: 3004–3018.
33- McIntosh, F. M., P. Williams, R. Losa, R. J. Wallace, D. A. Beever, and C. J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5011–5014.
34- Menke, K. H. and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Anim. Res. Develop. 28: 7–55.
35- Menke, K. H., L. Raab, A. Salewski, H. Steingass, D. Fritz, and W. Schneider. 1979. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquorin vitro. J. Agric. Sci. 92: 217–222.
36- Min, B. R., G. T. Attwood, K. Reilly, W. Sun, J. S. Peters, T. N. Barry, and W. C. McNabb. 2002. *Lotus corniculatus* condensed tannins decrease *in vivo* populations of proteolytic bacteria and affect nitrogen metabolism in the rumen of sheep. Can. J. Microbiol. 48: 911–921.
37- Mkaddem, M., J. Bouajila, M. Ennajar, A. Lebrihi, F. Mathieu, and M. Romdhane. 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of Mentha (Longifolia L. and Viridis) essential oils. J. Food. Sci. 74: M358-M363.
38- Olivera, M. P. 1998. Use of *in vitro* gas production technique to assess the contribution of both soluble and insoluble fraction on the nutritive value of forage. A thesis submitted to the University of Aberdeen, Scotland, in partial fulfillment of the degree of Master of science in Animal Nutrition.
39- Orskov, E. R. and P. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to rate of passage. J. Agric. Sci. 92: 499-503.
40- Plaizier, J. C., A. Martin, T. Duffield, R. Bagg, P. Dick, and B. W. McBride. 2000. Effect of a prepartum administration of monensin in a controlled-release capsule on apparent digestibilities and nitrogen utilization in transition dairy cows. J. Dairy Sci. 83: 2918–2925.
41- Rechinger, K. H. 1982. Flora Iranica, Labiatae, Akademische Druke-u. Velagsansalt. Graz. Austria. 150: 479.
42- SAS Institute. 2009. SAS User's Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.
43- Stern, M. D., and H. W. Hoover. 1990. The dual flow continuous culture system. Pages 17–32 in Proc. Continuous Culture Fermenters: Frustration or Fermentation. Northwest ADSA-ASAS Regional Meeting, Chazy, NY.
44- Russell, J. B., R. Onodera, and T. Hino. 1991. Ruminal protein fermentation: New perspectives on previous contra-dictions. In: Tsuda, T., Sasaki, Y., Kawashima, R. (Eds.), Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants. Academic Press Limited, London, pp. 691–697.
45- Sallam, S. M. A., S. M. A. Abdelgaleil, I. C. S. Bueno, M. E. A. Nassera, R. C. Araujo, and A. L. Abdalla. 2011. Effect of some essential oils on in vitro methane emission. Arch. Anim. Nutr. 65: 203–214.
46- Santoro, G. F., M. Das Grac¸as Cardoso, L. G. Guimarães, A. P. Salgado, R. F. Menna-Barreto, and M. J. Soares. 2007. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on Trypanosoma cruzi (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. Parasitol. Res. 100: 783–790.
47- Sokovic, M., P. D. Marin, D. Brkic, and L. J. L. D. Griensven. 2007. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Ten Aromatic Plants against Human Pathogenic Bacteria. Food Global Science Books. 1: x-y.
48- Sonboli, A., B. Babakhani, and A. R. Mehrabian. 2006. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from Salvia. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a. J. Biosci. 61: 160-164.

49- Taghavi Nezhad, M., D. Alipour, M. Torabi Goudarzi, P. Zamani, and G. Khodakaramian. 2011. Dose Response to Carvone Rich Essential Oils of Spearmint (*Mentha spicata* L.): *in vitro* ruminal fermentation kinetics and digestibility. J. Agric. Sci. Tech. 13: 1013-1020.
50- Talebzadeha, R., D. Alipoura, M. J. Saharkhiz, A. Azarfar, and M. Malecky. 2012. Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on in vitro rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. Anim. Feed Sci. Technal. 172: 115-124.
51- Tekippe, J. A., A. N. Hristov, K. S. Heyler, T. W. Cassidy, V. W. Zheljazkov, J. F. S. Ferreira, S. K. Karnati, and G. A. Varga. 2011. Rumen fermentation and production effects of *Origanum vulgare* L. leaves in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 90: 5056-5079.
52- Tukey, J. W. 1953. The problem of multiple comparison. Unpublished notes, Princeton Univ., Princeton, NJ
53- Van Soest, P. J. 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant. Cornell University Press, Ithaca, NY, USA.
54- Weller, R. A. and A. F. Pilgrim. 1974. Passage of protozoa and volatile fatty acids from the rumen of a sheep and from a continuous in vitro fermentation system. Br. J. Nutr. 32:341–351.
55- Zheljazkov, V. D., T. Astatkie, and A. N. Hristov. 2012. Lavender and hyssop productivity, oil content, and bioactivity as a function of harvest time and drying. Ind. Crop. Prod. 36: 222–228.