

## Antioxidant Activity and Effects of *Thymus Vulgaris* and *Mentha Longifolia* Extracts and Essential Oils on Ruminal Fermentation Parameters by Gas Production Method

Sara Moeini<sup>1</sup>, Hossein Abdi Benemar<sup>2,\*</sup>, Seifdavati Jamal<sup>3</sup>, Mohammadreza Malekzadeh<sup>4</sup>, Reza SeyedSharifi<sup>5</sup> and Morteza Jafaroghli<sup>6</sup>

1. MSc in Animal Nutrition, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. [afrozber@yahoo.com](mailto:afrozber@yahoo.com)
2. \*Corresponding Author, Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran, E-mail: [abdibenemar@uma.ac.ir](mailto:abdibenemar@uma.ac.ir)
3. Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. [jseifdavati@uma.ac.ir](mailto:jseifdavati@uma.ac.ir)
4. Expert, Agricultural Jihad Organization of Ardabil Province, Ardabil, Iran. [m\\_malekzadeh57@yahoo.com](mailto:m_malekzadeh57@yahoo.com)
5. Professor, Department of Animal Sciences, Faculty of Agricultural Science and Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran. [sharifi\\_r@uma.ac.ir](mailto:sharifi_r@uma.ac.ir)
6. Academic Staff Member, Department of Agriculture, Payame Noor University (PNU), Tehran, Iran. [morteza\\_jafaroghli@pnu.ac.ir](mailto:morteza_jafaroghli@pnu.ac.ir)

### Article Info

**Article type:**  
Research Article

**Article history:**

Received 28 April 2026  
Received in revised form 3 May 2026  
Accepted 5 May 2026  
Available online 20 May 2026

**Keywords:**

Essential Oil;  
Rumen Fermentation;  
Digestibility;  
*In Vitro*,  
Medical plants.

### ABSTRACT

**Objective:** This experiment was conducted to investigate the effects of thyme and oregano extracts and essential oils on rumen fermentation parameters and to evaluate their antioxidant activity.

**Materials and Methods:** The effects of the extracts and essential oils of these plants on rumen fermentation parameters, including gas production, were investigated. Gas production parameters, ammonia and methane production were measured. The experimental diets included 1) control without essential oil or extract, 2) control + 100 µL thyme extract, 3) control + 200 µL thyme extract, 4) control + 100 µL oregano extract, 5) control + 200 µL oregano extract, 6) control + 10 µL thyme essential oil, 7) control + 20 µL thyme essential oil, 8) control + 10 µL oregano essential oil, 9) control + 20 µL oregano essential oil. The antioxidant activity of their extracts and essential oils was evaluated by measuring the free radical scavenging power of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

**Results:** This study showed that the addition of essential oils and extracts of thyme and oregano had the greatest effect in reducing gas and methane production, volatile fatty acid concentration, ammonia nitrogen, and metabolizable energy in the experimental diets compared to the control group. The essential oil had the greatest effect on the control + 20 µL thyme essential oil compared to the other treatments. The reduction in gas production due to oregano essential oil was more severe in the control + 20 µL oregano essential oil compared to the control + 10 µL oregano essential oil. Oregano extract increased gas production in the control + 100 µL oregano extract and control + 200 µL oregano extract compared to the control group. The concentration required to inhibit 50% DPPH radical (IC50) for oregano extract was 461.34 µg/ml, and the IC50 concentration for thyme extract was 517.80 µg/ml. The free radical inhibition of thyme essential oil was 80.24% at the IC50 concentration of thyme extract, and the free radical inhibition of oregano essential oil was 81.42% at the IC50 concentration of oregano extract.

---

**Conclusion:** The results showed that the use of thyme and oregano essences reduced gas production and fermentation parameters. Essential oils had higher antioxidant activity than extracts at the same concentration. Therefore, essential oils are a better option than extracts for achieving rumen effects.

---

**Cite this article:** Moeini, Sara., Abdi Benmar , Hossein., Seifdavati, Jamal., Malekzadeh, Mohammadreza., SeyedSharifi, Reza., & Jafaroghli, Morteza. (2026). Antioxidant activity and effects of thymus vulgaris and mentha longifolia extracts and essential oils on ruminal fermentation parameters by gas production method. *New Approaches in Animal Sciences*, 1 (2), 1-22. <http://doi.org/10.22098/naas.2026.19643.1015>



© The Author(s).

**Publisher:** University of Mohaghegh Ardabili.

**DOI:** <http://doi.org/10.22098/naas.2026.19643.1015>

---

## Introduction

Thyme (*Thymus vulgaris*) is an aromatic plant belonging to the genus *Thymus* of the mint family. It has antioxidant properties because it contains one percent of essential oil, mainly thymol and carvacrol. The active ingredients of plants are generally extracted by two methods: extraction or essential oil extraction. Essential oils are aromatic compounds obtained from various parts of plants (such as bark, leaves, flowers, fruits, seeds, and roots). Since these compounds evaporate when exposed to air and normal heat, they are also called volatile oils or essential oils. The essential oil and extract of this plant contain compounds that reduce methane and acetate, improve nitrogen metabolism in the rumen, reduce the deamination of amino acids, increase microbial protein production, and reduce ammonia nitrogen. Oregano (*Mentha longifolia*) is a species of mint in the Lamiaceae family. with compounds whose essential oils extracted from this plant have antioxidant and antibacterial properties. In recent years, products containing plant-based active ingredients have been widely used as feed additives to stimulate livestock production performance. The mechanisms of action of these compounds are diverse and include improving palatability and feed intake, stimulating digestive enzyme secretion, antibacterial activity, immunomodulatory effects, rumen effects, and antioxidant properties (Benchaar et al., 2009). This experiment aimed to investigate the effects of extracts and essential oils of the medicinal plants thyme and oregano on rumen fermentation parameters and their antioxidant activity.

## Method

The maceration method was used to prepare the extract of thyme and oregano. To obtain the essential oil, the dried ground samples of thyme and oregano were poured into a flask in powder form, filled to two-thirds of the flask's volume with distilled water, and the Clevenger device was connected to the flask. The heat source was turned on, and the start time of the experiment was recorded. In addition, the boiling time and the first drop of essential oil were noted. The effects of the extract and essential oil of these plants on the rumen fermentation parameters of a basal diet were investigated by laboratory gas production. So that the gas production parameters, the ammonia amount and methane produced were measured using the same gas test method. The experimental diets included: 1) control without essential oil or extract, 2) control +100 µL thyme extract, 3) control +200 µL thyme extract, 4) control +100 µL oregano extract, 5) control +200 µL oregano extract, 6) control +10 µL thyme essential oil, 7) control +20 µL thyme essential oil, 8) control +10 µL oregano essential oil, 9) control +20 µL oregano essential oil. The antioxidant activity of the extracts and essential oils was evaluated by measuring the free radical scavenging power of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

## Results

The results of this study showed that adding essential oil to a basic diet for Holstein cows had a significant effect on gas production. There was also a significant difference in production among the treatments containing essential oil. Thyme and oregano essential oils had the greatest effect in reducing gas production compared to the control, and thyme and oregano extracts had the greatest effect. There was also a significant difference in the extracts among the treatments

containing essential oil. In the essential oil treatment (control + 50 µl thyme essential oil), the greatest effect was observed across all replicates compared to the other treatments. The reduction in gas production due to oregano essential oil was more severe in treatment (control + 20 µl oregano essential oil) compared to treatment (control + 10 µl oregano essential oil) at all repeats. Oregano extract increased gas production in treatments (control + 100 µl oregano extract) and (control + 200 µl oregano extract) compared to the control. Oregano extract in the initial hour of fermentation (2 hours) caused a decrease in gas production compared to the control group. Still, at other times, it increased gas production compared to the control group. In the thyme extract, treatment 2 (control + 100 µl of thyme extract) increased gas production compared to the control group. Still, in treatment 3 (control + 200 µl of thyme extract), with a slight increase in the concentration of thyme extract compared to the control group, at times 2, 4, 6, 8, 12, and 24 hours, it caused a decrease in gas production, but at times 48, 72, and 96 hours, it caused an increase in gas production. According to the results, thyme and oregano essential oils reduced gas and methane production, volatile fatty acid concentrations, ammonia nitrogen, and metabolizable energy of the experimental diets compared to the control treatment. The concentration required to inhibit 50% DPPH radical (IC<sub>50</sub>) for oregano extract was 461.34 µg/mL, and the IC<sub>50</sub> concentration for thyme extract was 517.80 µg/mL. The free radical inhibition of thyme essential oil was 80.24% at the IC<sub>50</sub> concentration of thyme extract and 81.42% at the IC<sub>50</sub> concentration of oregano extract.

### **Conclusions**

The results of the present study showed that thyme and oregano essential oils reduced gas production and fermentation parameters. However, thyme and oregano extracts did not affect gas production, organic matter digestibility, metabolizable energy, or volatile fatty acid content. It is also important to consider changes in other fermentation products, such as ammonia nitrogen, methane, and the composition of the microbial population, in these experiments. Essential oils showed higher antioxidant activity than extracts at similar concentrations. Therefore, essential oils are a better option than extracts for rumen effects.

### **Author Contributions**

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

### **Data Availability Statement**

Data available on request from the authors.

### **Ethical Considerations**

The authors avoided data fabrication, falsification, and plagiarism, and any form of misconduct.

***Funding***

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

***Conflict of Interest***

The authors declare no conflict of interest.

## فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات عصاره و اسانس گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) و پونه (*Mentha longifolia*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای به روش آزمون گاز

سارا معینی<sup>۱</sup>، حسین عبدی بنمار<sup>۲\*</sup>، جمال سیف دواتی<sup>۳</sup>، محمدرضا ملک زاده<sup>۴</sup>، رضا سیدشیرینی<sup>۵</sup>، مرتضی جعفر اوغلی<sup>۶</sup>

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. [afrozber@yahoo.com](mailto:afrozber@yahoo.com)

\*۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

پست الکترونیکی: [abdibenemar@uma.ac.ir](mailto:abdibenemar@uma.ac.ir)

۳- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. [jsiefdavati@uma.ac.ir](mailto:jsiefdavati@uma.ac.ir)

۴- کارشناس سازمان جهاد کشاورزی استان اردبیل، ایران. [m\\_malekzadeh57@yahoo.com](mailto:m_malekzadeh57@yahoo.com)

۵- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران. [sharifi\\_r@uma.ac.ir](mailto:sharifi_r@uma.ac.ir)

۶- عضو هیات علمی گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران، ایران. [morteza\\_jafaroghli@pnu.ac.ir](mailto:morteza_jafaroghli@pnu.ac.ir)

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**هدف:** این آزمایش برای بررسی اثرات عصاره و اسانس آویشن و پونه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها انجام شد.

**نوع مقاله:**

مقاله پژوهشی

**روش پژوهش:** اثرات عصاره و اسانس این گیاهان بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای با تولید گاز بررسی شد. فراسنجه‌های تولید گاز، میزان آمونیاک و متان تولیدی اندازه‌گیری شد. جیره‌های آزمایشی شامل 1) جیره شاهد بدون اسانس یا عصاره، 2) جیره شاهد به همراه 100 میکرولیتر عصاره آویشن، 3) جیره شاهد به همراه 200 میکرولیتر عصاره آویشن، 4) جیره شاهد به همراه 100 میکرولیتر عصاره پونه، 5) جیره شاهد به همراه 200 میکرولیتر عصاره پونه، 6) جیره شاهد به همراه 10 میکرولیتر اسانس آویشن، 7) جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس آویشن، 8) جیره شاهد به همراه 10 میکرولیتر اسانس پونه، 9) جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس پونه بودند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس آن‌ها با سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد 2 و 2- دی فنیل - 1- پیکریل هیدرازیل (DPPH) ارزیابی شد.

**تاریخ دریافت:**

1405/02/08

**تاریخ بازنگری:**

1405/02/13

**تاریخ پذیرش:**

1405/02/15

**تاریخ انتشار:** 1405/02/30

**یافته‌ها:** افزودن اسانس و عصاره آویشن و پونه نسبت به گروه شاهد بیشترین تأثیر را در پایین آمدن تولید گاز، تولید متان، غلظت اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و انرژی قابل متابولیسم جیره‌های آزمایشی در مقایسه با گروه شاهد داشتند. اسانس بیشترین تأثیر را بر جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس آویشن در مقایسه با سایر تیمارها داشت. کاهش تولید گاز در اثر اسانس پونه در جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس پونه در مقایسه با جیره شاهد به همراه 10 میکرولیتر اسانس پونه شدیدتر بود. عصاره پونه در جیره شاهد به همراه 100 میکرولیتر عصاره پونه و جیره شاهد به همراه 200 میکرولیتر عصاره پونه در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش گاز تولیدی شد. غلظت لازم مهار 50 درصدی رادیکال (IC50) DPPH برای عصاره پونه 461/34 میکروگرم در میلی لیتر و غلظت IC50 برای عصاره آویشن 517/80 میکروگرم در میلی لیتر بودند. 80/24 درصد مهار رادیکال آزادی اسانس آویشن در غلظت IC50 عصاره آویشن و 81/42 درصد مهار رادیکال آزادی اسانس پونه در غلظت IC50 عصاره پونه بود.

**کلیدواژه‌ها:**

اسانس،

تخمیر شکمبه،

قابلیت هضم،

شرایط آزمایشگاهی،

گیاهان دارویی.

**نتیجه‌گیری کلی:** استفاده از اسانس آویشن و پونه باعث کاهش تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری شد. اسانس‌ها در غلظت مشابه فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به عصاره‌ها داشتند. اسانس‌ها گزینه بهتری نسبت به عصاره‌ها با هدف داشتن اثرات شکمبه‌ای می‌باشد.

**استاد:** معینی، سارا؛ عبدی بنمار، حسین؛ سیف دوانی، جمال؛ ملک زاده، محمدرضا؛ سیدشریفی، رضا و جعفر اوغلی، مرتضی. (1405). فعالیت آنتی اکسیدانی و اثرات عصاره و اسانس گیاه آویشن (*Thymus vulgaris*) و پونه (*Mentha longifolia*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای به روش آزمون

گاز. *یافته‌های نوین علوم دامی*، 1 (2)، 1-22

<http://doi.org/10.22098/naas.2026.19643.1015>



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه محقق اردبیلی.

## ۱. مقدمه

طی ۶۰ سال گذشته، یکی از روش‌های رایج برای بهبود عملکرد دام، افزودن مقادیر کمتر از دوز درمانی آنتی‌بیوتیک‌ها به خوراک بوده که قادر بود بازده رشد را تا ۱۰ درصد افزایش دهد (Russel و Hoilihan، ۲۰۰۳). مونسنین، لازالوسید و سالیونامیسین از متداول‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در نشخوارکنندگان هستند که همگی متعلق به خانواده آنتی‌بیوتیک‌های یونوفور می‌باشند. کاربرد عمده این ترکیبات در پرورش دام‌های گوشتی، به‌ویژه در دوره پرواربندی، متمرکز است؛ درحالی‌که به دلیل احتمال وجود باقیمانده‌های آنتی‌بیوتیکی در شیر، استفاده از آن‌ها در دام‌های شیری محدود شده است. سازوکار عمل آن‌ها، اختلال در شیب یون‌ها در غشای سلولی باکتری‌ها (به‌ویژه باکتری‌های گرم مثبت) و در پی آن، ایجاد تغییرات سودمند در الگوی تخمیر شکمبه‌ای است (Cooke و Marques، ۲۰۲۱). این تغییرات منجر به افزایش نسبت پروپیونات به استات تولیدی می‌شود که با کاهش تولید متان و کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین خوراک در شکمبه همراه است. هردوی این موارد در نهایت به بهبود کارایی خوراک کمک می‌کنند. همچنین این ترکیبات به کاهش وقوع اسیدوز و نفخ در دام یاری می‌رسانند. با این وجود، باقیمانده‌های سوء این آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن و گوشت دام، و نیز توسعه سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، باعث کاهش مصرف این ترکیبات شده و پژوهشگران را به‌سوی بررسی جایگزین‌های آنتی‌بیوتیکی سوق داده است. یکی از مهم‌ترین این جایگزین‌ها، استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی است (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۸).

اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی ترکیباتی هستند که قابلیت کاهش تولید متان و استات و بهبود متابولیسم نیتروژن در شکمبه را دارند. این ترکیبات، با کاهش فرآیند دامیناسیون اسیدهای آمینه، منجر به افزایش تولید پروتئین میکروبی و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شده‌اند (McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳). از این رو، فعالیت ترکیبات ثانویه گیاهی به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی خوراک، مورد توجه ویژه میکروبیولوژیست‌های شکمبه‌ای و متخصصین تغذیه قرار گرفته است.

مواد مؤثره گیاهان به‌طور کلی به دو روش عصاره‌گیری یا اسانس‌گیری استخراج می‌شوند. اسانس‌ها (Essential Oils)، ترکیبات معطری هستند که از اندام‌های مختلف گیاهان (مانند پوست، برگ، گل، میوه، دانه و ریشه) به دست می‌آیند. از آنجاکه

این ترکیبات در تماس با هوا و حرارت عادی تبخیر می‌شوند، به آن‌ها روغن‌های فرار یا اسانس‌های روغنی نیز گفته می‌شود. اسانس‌ها مایعاتی آب‌گریز (هیدروفوب) و تغلیظ‌شده حاوی ترکیبات فرار آروماتیک (عمدتاً ترپن‌ها و مشتقات ترپنی) هستند (Benchaar و همکاران، ۲۰۰۹). این ترکیبات فرار از طریق تقطیر مواد فرار موجود در اندام‌های گیاه تازه یا خشک همراه با بخار آب به دست می‌آیند و وزن آن‌ها اغلب کمتر از آب است. اسانس‌ها در الکل کاملاً حل می‌شوند، درحالی‌که با آب غیرقابل امتزاج هستند. در حال حاضر، رایج‌ترین روش‌های صنعتی برای استخراج اسانس، دو روش تقطیر و استخراج با حلال است (González-Hernández و همکاران، ۲۰۲۴).

عصاره‌ها (Extracts) حاصل عصاره‌گیری درواقع یک روش استخراج بر مبنای مکانیسم حلالیت (شامل حلال‌های آبی، الکلی یا هیدرو الکلی) است. دستگاه آزمایشگاهی شناخته‌شده برای این کار، دستگاه سوکسله است که در آن، ماده جامد و حلال در تماس مستقیم با یکدیگر قرار می‌گیرند. اگرچه روش‌های قدیمی عصاره‌گیری بر پایه قرارگیری گیاه در حلال مناسب (مانند سوکسله، خیساندن یا تقطیر) استوار است، اما روش‌های نوین‌تری نظیر عصاره‌گیری با امواج فراصوت، امواج ماکروویو و مایع فوق بحرانی نیز برای استخراج ترکیبات فعال گیاهان مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Zolfaghari و Yegdaneh، ۲۰۱۰).

آویشن (*Thymus vulgaris*) گیاهی معطر از جنس آویشن و تیره نعناعیان است که به‌طور گسترده به‌عنوان ادویه و همچنین به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به‌عنوان نگهدارنده غذایی کاربرد دارد. (Abdollahzadeh و همکاران، ۲۰۱۴). آویشن معمولاً حاوی حدود ۱ درصد اسانس است که بخش اعظم آن را ترکیبات تیمول و کارواکرول (۲۰ تا ۸۰ درصد) و هیدروکربن‌های مونوترپنی مانند پی-سیمن و گاما-ترپنین تشکیل می‌دهد (Leung و Foster، ۱۹۹۶). بورچر (۱۹۶۵) گزارش کرد که انکوبه کردن کازئین در مایع شکمبه به همراه تیمول (۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر)، منجر به تجمع اسیدهای آمینه، کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی و جلوگیری از آمین‌زایی می‌شود. مطالعه دیگری نشان داد که دوزهای پایین تیمول (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) تأثیری بر تخمیر میکروبی شکمبه نداشت، درحالی‌که دوزهای بالاتر (۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر) باعث کاهش اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی و همچنین افزایش نسبت استات به پروپیونات گردید (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۸). اثرات آنتی‌اکسیدانی آویشن نیز در تغذیه گوساله‌های شیرخوار به اثبات رسیده است (Asghari و همکاران، ۲۰۲۳).

پونه (*Mentha longifolia*) گونه‌ای از نعنای برگ‌های کرک دار سبز نقره‌ای، دنداندار و ظاهری غبارآلود است. این گیاه دارای ساقه‌های چهارگوش و گل‌های آبی‌رنگ و مجتمع در انتهای شاخه‌ها می‌باشد. ترکیبات اسانس‌های روغنی استخراج‌شده از این گیاه، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی هستند. (Kohansal و همکاران، 2009) پونه حاوی ۱ میلی‌لیتر اسانس به ازای هر ۱۰۰ گرم ماده خشک بوده و شامل ۵۵ ماده مؤثره است که مهم‌ترین آن‌ها پلی‌گون (۵۴٫۶ درصد) و منتول (۱۵٫۱ درصد) می‌باشند.

در سال‌های اخیر، فرآورده‌های حاوی مواد مؤثره گیاهی به‌عنوان افزودنی خوراکی برای تحریک عملکرد تولیدی دام به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مکانیسم عمل این ترکیبات متنوع است و شامل بهبود طعم و مصرف خوراک، تحریک ترشح آنزیم‌های هضمی، فعالیت‌های ضد باکتریایی، تنظیم‌کنندگی ایمنی، اثرات شکمبه‌ای و خواص آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Benchaar و همکاران، 2009).

هدف اصلی این تحقیقات، دست‌کاری تخمیر شکمبه‌ای از طریق حذف پروتوزوا، بهبود متابولیسم پروتئین و افزایش کارایی حیوانات نشخوارکننده بوده است (Kamra و همکاران، 2008؛ Patra و همکاران، 2006).

با توجه به محدود بودن مطالعات در زمینه بررسی و مقایسه اثرات اسانس و عصاره گیاهان دارویی، هدف از این آزمایش، بررسی اثرات عصاره و اسانس گیاهان دارویی آویشن و پونه بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها بود.

## 2. مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره گیاهان آویشن و پونه

برای تهیه عصاره گیاهان دارویی آویشن و پونه، از روش خیساندن (ماسه‌راسیون یا Maceration) استفاده شد (Abubakar و Haque، 2020). کلیه اندام‌های هوایی گیاهان پیش از عصاره‌گیری، با استفاده از آسیاب آزمایشگاهی تا رسیدن به پودری با اندازه ذرات الک ۱ میلی‌متر، آسیاب گردیدند. سپس، به ازای هر ۱۰۰ گرم پودر گیاهی، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۵۰ درصد به‌عنوان حلال اضافه شد. مخلوط به مدت ۷۲ ساعت در دمای اتاق و در محیط تاریک نگهداری شد و این فرآیند روزانه سه نوبت به هم زده شد. پس از انقضای زمان خیساندن، تفاله گیاهی با استفاده از پارچه توری ریز از حلال جدا گردید. برای اطمینان از استخراج کامل مواد مؤثره، تفاله‌های باقیمانده یک‌بار دیگر با اتانول ۵۰ درصد شستشو داده شدند. مایع حاصل (شامل اتانول،

آب و مواد محلول گیاهی به همراه ریزدانه‌های معلق) با استفاده از قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره یک تصفیه شد. حلال زدایی و تغلیظ مایع تصفیه‌شده، با استفاده از دستگاه تبخیر در خلاء دوار (Bibby RE 200 England، ساخت انگلستان) در دمای ۶۰ درجه سلسیوس و تحت شرایط خلأ، تا کاهش حجم به حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر انجام پذیرفت. میزان ماده خشک موجود در محلول تغلیظ شده اندازه‌گیری و بازده عصاره‌گیری محاسبه گردید. در نهایت، عصاره‌ها با افزودن حلال استاندارد، به غلظت ۱۰ درصد ماده خشک استانداردسازی شدند (Azadbakht و همکاران، 2017) و تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای تیره در یخچال نگهداری شدند.

### تهیه اسانس گیاهان آویشن و پونه

برای استخراج اسانس نمونه خشک و آسیاب‌شده آویشن و پونه، مقدار مشخصی از پودر گیاهی در بالون ژوژه ریخته شد و بالون تا دوسوم حجم خود با آب مقطر پر گردید. سپس دستگاه کلونجر (یا دستگاه تقطیر با بخار آب) به بالون ژوژه متصل شد. منبع حرارت روشن شد و زمان شروع آزمایش ثبت گردید. هم‌زمان، زمان جوشیدن و همچنین زمان خروج اولین قطره اسانس یادداشت شد. از آنجاکه اسانس دارای چگالی کمتر از آب است، بر روی سطح آب قرار گرفته و در نهایت جمع‌آوری گردید (Faizi و همکاران، 2012).

### ارزیابی تأثیر اسانس و عصاره گیاهان پونه و آویشن بر تخمیر شکمبه‌ای

به‌منظور ارزیابی تأثیر اسانس و عصاره‌های به‌دست‌آمده، فراسنجه‌های تولید گاز، میزان آمونیاک و متان تولیدی در محیط شکمبه با استفاده از روش آزمون گاز آزمایشگاهی (Gas Test) اندازه‌گیری شدند. (Menke و همکاران، 1979) بدین منظور، یک جیره پایه برای گاو هلشتاین شیرده با وزن ۶۵۰ کیلوگرم و تولید شیر ۳۵ کیلوگرم در روز (با 3/5 درصد چربی و ۱۷ درصد پروتئین) بر اساس توصیه‌های (NRC 2001) و نرم افزار آن تنظیم گردید تا احتیاجات مغذی آن تأمین شود. مقادیر اسانس و عصاره بر اساس تیمارهای آزمایشی (مشخص شده در جدول ۱)، به جیره غذایی گروه شاهد اضافه شدند.

تعداد 9 جیره‌های آزمایشی عبارت بودند از: (1) جیره شاهد بدون اسانس یا عصاره، (2) جیره شاهد به همراه 100 میکرولیتر عصاره آویشن، (3) جیره شاهد به همراه 200 میکرولیتر عصاره آویشن، (4) جیره شاهد به همراه 100 میکرولیتر عصاره پونه، (5) جیره شاهد به همراه 200 میکرولیتر عصاره پونه، (6) جیره شاهد

سرنگ‌ها به مدت ۷۲ ساعت در دستگاه انکوباتور گردونه‌دار (Shaker Incubator) در دمای ۳۹ درجه سلسیوس که با سرعت یک دور در دقیقه برای مخلوط‌سازی مداوم محتویات در حال چرخش بود، قرار گرفتند. میزان گاز تولیدی داخل سرنگ‌ها در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت قرائت و ثبت گردید. میانگین گاز تولیدی در سرنگ‌های گروه شاهد، به‌عنوان حجم بلانک (Blank Volume) برای تصحیح گاز تولیدی سرنگ‌های حاوی نمونه‌ها در هر زمان، مطابق فرمول زیر مورد استفاده قرار گرفت (Menke و همکاران، ۱۹۷۹):

$$V = (200 \times (V_t - V_b)) / W$$

که در رابطه فوق V برابر حجم گاز تصحیح‌شده برحسب میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک نمونه خوراک،  $V_t$  برابر حجم گاز تولیدی در سرنگ‌های حاوی نمونه خوراک برحسب میلی‌لیتر،  $V_b$  برابر حجم گاز تولیدی در سرنگ‌های فاقد نمونه خوراک برحسب میلی‌لیتر و W برابر وزن ماده خشک نمونه خوراک برحسب میلی‌گرم می‌باشد.

به همراه ۱۰ میکرولیتر اسانس آویشن، ۷ جیره شاهد به همراه ۲۰ میکرولیتر اسانس آویشن، ۸ جیره شاهد به همراه ۱۰ میکرولیتر اسانس پونه، ۹ جیره شاهد به همراه ۲۰ میکرولیتر اسانس پونه. بدین ترتیب با توجه به اینکه عصاره‌های مورد استفاده به‌صورت ۱۰ درصد ماده مؤثره بودند، سطوح به‌کاررفته در تیمارهای حاوی اسانس و عصاره برابر بودند. به‌منظور انجام آزمون تولید گاز، مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از جیره غذایی در سه تکرار در سرنگ‌های شیشه‌ای توزین گردید. این آزمون در دو نوبت (Run) مستقل و با سه تکرار شاهد در هر نوبت اجرا شد. شیرابه شکمبه (Rumen fluid) از کشتارگاه صنعتی دام بزرگ اردبیل در حین کشتار و پاره کردن و تخلیه شکمبه در بطری‌های آب معدنی ضمن پرکردن کامل جمع‌آوری، صاف و در شرایط بی‌هوازی نگهداری و در کلمن آب گرم (۳۹ درجه سلسیوس به آزمایشگاه منتقل شد. سپس، بزاق مصنوعی (تهیه‌شده طبق استاندارد) به نسبت ۲ به ۱ با شیرابه مخلوط گردید. پس‌از آن، ۳۰ میلی‌لیتر از مخلوط بزاق مصنوعی-شیرابه به داخل هر سرنگ تزریق شد و حجم اولیه (در زمان صفر) یادداشت گردید. سپس،

جدول ۱- اجزای خوراکی، ترکیب شیمیایی و انرژی قابل سوخت‌وساز جیره پایه

Table 1. Ingredients, chemical composition and metabolizable energy of the basic diets

| Diet ingredients (% DM)        | Basic diet |
|--------------------------------|------------|
| Alfalfa hay, dry               | 18.90      |
| Corn silage                    | 20.92      |
| Barley grain                   | 12.73      |
| Corn grain                     | 11.98      |
| Wheat bran                     | 0.43       |
| Soybean meal                   | 14.00      |
| Sugar beet pulp                | 8.23       |
| Canola meal                    | 4.90       |
| Whole cotton seed              | 5.99       |
| Ca carbonate                   | 1.01       |
| Di-Ca phosphate                | 0.14       |
| NaCl                           | 0.22       |
| Min-Vit premix                 | 0.65       |
| Chemical composition           |            |
| Metabolizable energy (Mcal/Kg) | 2.51       |
| Crude protein (% DM)           | 17.00      |
| Ether extract (% DM)           | 3.50       |
| Ca (% DM)                      | 0.85       |
| P (% DM)                       | 0.40       |

میکروبی (MP) از رابطه Blummel و همکاران (۱۹۹۷) برآورد شد.

رابطه‌ها عبارت‌اند از:

$$ME \text{ (MJ/kg DM)} = 1.06 + 0.1570GP + 0.0084CP + 0.0220EE - \quad (3)$$

انرژی قابل متابولیسم (ME)، انرژی ویژه شیردهی (NEL) و ماده آلی قابل‌هضم (DOM) با استفاده از معادلات Menke و همکاران (۱۹۷۹) و Menke و Steingass (۱۹۸۸) به‌صورت زیر محاسبه گردید. میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر (SCFA) طبق رابطه Getachew و همکاران (۲۰۰۲) و نیز مقدار پروتئین

گردید. درصد بازدارندگی (RSA) DPPH هر یک از عصاره‌ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (Shimada و همکاران، 1992):

$$RSA = [(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times 100 \quad (8)$$

به‌طوری که  $A_{sample}$  میزان جذب نمونه،  $A_{control}$  میزان جذب کنترل منفی، RSA فعالیت گیرندگی رادیکال بود. برای بررسی بهتر فعالیت آنتی رادیکالی اسانس و عصاره، از شاخص IC50 استفاده شد که بیان‌گر غلظتی از اسانس و عصاره است که توان کم شدن غلظت رادیکال آزاد DPPH اولیه به 50 درصد مقدار اولیه را دارد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند (Meizoso و همکاران، 2006).

### تجزیه آماری داده‌ها

داده‌های آزمون گاز توسط رویه GLM نرم‌افزار SAS (نسخه 2003.9/1) به‌صورت اسپلیت پلات تجزیه گردید، زیرا آزمون در دو سری (run) طی دو هفته مجزا انجام شد. در رابطه مدل آماری زیر، تیمار به‌عنوان پلات اصلی و سری به‌عنوان پلات فرعی فرض شد.

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + e_{ij} + R_k + (TR)_{ik} + e_{ijk} + e_{ijkl} \quad (9)$$

در این مدل،  $Y_{ijkl}$  مقدار هر مشاهده،  $\mu$  میانگین،  $T_i$  اثر تیمار،  $e_{ik}$  اثر متقابل تیمار و تکرار،  $R_k$  اثر سری (run)،  $(TR)_{ik}$  اثر متقابل تیمار و سری،  $e_{ijk}$  خطای اسپلیت-پلات، و  $e_{ijkl}$  خطای نمونه‌برداری است. برای تجزیه داده‌های بقیه آزمایش‌ها از طرح کاملاً تصادفی، رویه MIXED و مدل آماری ذیل استفاده شد.

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad (10)$$

در مدل بالا،  $Y_{ij}$  مقدار مشاهده،  $\mu$  میانگین،  $T_i$  اثر تیمار و  $e_{ij}$  خطای آزمایشی است. میانگین‌های مربوط به تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری 5 درصد مقایسه گردید.

### 3. نتایج و بحث

تأثیر افزودن اسانس و عصاره گیاهان آویشن و پونه بر میزان تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیری در جدول 2 و 3 نشان داده شده است. نتایج نشان داد که افزودن اسانس تأثیر معنی‌داری بر میزان تولید گاز داشت ( $P < 0/05$ ). در بین تیمارهای دارای عصاره نیز از نظر میزان تولید گاز افزایش معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). اسانس آویشن و پونه نسبت به گروه شاهد و عصاره آویشن و عصاره پونه بیشترین تأثیر را در

$$0.0081CA \\ NEL (MJ/kg DM) = \quad (4)$$

$$-0.36 + 0.115GP + 0.0054CP + 0.0139CF - 0.0054CA \\ DOM (\%DM) = 9 + 0.99GP + 0.0595CP + 0.018CA \quad (5)$$

$$SCFA (mmol/200mgDM) = 0.0222GP - 0.00425 \quad (7)$$

$$MP (g/kg OMD) = [19.3 \times DOM (Kg)] \times 6.25 \quad (6)$$

### تعیین نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه و تخمین متان

غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در ساعات مختلف پس از شروع فرآیند انکوباسیون، با استفاده از روش فنل-هیپوکلریت تعیین گردید (Broderick و Kang 1980). برای قرائت جذب نوری، از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر استفاده شد. برای تعیین میزان تولید متان، کل گاز تولیدی پس از اتمام تخمیر ۲۴ ساعته قرائت شد. سپس، ۴ میلی‌لیتر محلول هیدروکسید سدیم ۱۰ مولار به داخل سرنگ تزریق شد تا دی‌اکسید کربن ( $CO_2$ ) را جذب کند. حجم گاز باقیمانده در سرنگ، برآورد متان (به همراه مقادیر اندکی هیدروژن) خواهد بود (Anele و همکاران، 2011).

### سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی با اندازه‌گیری قدرت

#### مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره‌ها و اسانس‌های موردبررسی، با اعمال تغییرات جزئی بر روش به‌کاررفته شده توسط Meizoso و همکاران (2006) تعیین گردید.

#### تهیه محلول‌ها و فرآیند سنجش

ابتدا، 23/5 میلی گرم DPPH (از شرکت سیگما آلد ریچ) در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول حل شد. سپس 10 میلی‌لیتر از این محلول با افزودن متانول به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول اصلی DPPH با غلظت موردنیاز تهیه شود. غلظت‌های مختلفی از عصاره و اسانس مورد آزمایش آماده‌سازی گردید. 0/1 میلی‌لیتر از محلول‌های عصاره/اسانس با 3/9 میلی‌لیتر از محلول DPPH مخلوط شدند تا حجم نهایی به ۴ میلی‌لیتر برسد. مخلوط‌ها به مدت ۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده شده و جذب نوری آن در طول موج ۵۱۶ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر یادداشت شد. برای کالیبراسیون دستگاه، از متانول خالص استفاده شد و برای نمونه شاهد، 0/1 میلی‌لیتر متانول به محلول DPPH اضافه

پایین آمدن تولید گاز داشتند. در بین تیمارهای دارای اسانس نیز اختلاف معنی‌داری نسبت به عصاره‌ها وجود داشت ( $P<0/05$ ). با توجه به جدول ۲ عصاره آویشن و عصاره پونه در بعضی ساعات باعث افزایش تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد شد ( $P<0/05$ ).

جدول ۲- تأثیر اسانس و عصاره آویشن و پونه بر روند تولید گاز در زمان‌های مختلف انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)

Table 2. The effect of essential oil and extract of thyme and oregano on gas production in different incubation times (milliliters per 200 mg of dry matter)

| Diets   | 2 hour              | 4 hour               | 6 hour              | 8 hour               | 12 hour             | 24 hour            | 48 hour            | 72 hour             | 96 hour             |
|---------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|
| 1       | 8.60 <sup>a</sup>   | 14.04 <sup>ab</sup>  | 20.34 <sup>ab</sup> | 25.98 <sup>abc</sup> | 39.91 <sup>bc</sup> | 61.66 <sup>b</sup> | 74.17 <sup>c</sup> | 78.40 <sup>c</sup>  | 80.12 <sup>d</sup>  |
| 2       | 8.85 <sup>a</sup>   | 14.04 <sup>ab</sup>  | 20.91 <sup>a</sup>  | 26.84 <sup>ab</sup>  | 40.87 <sup>bc</sup> | 63.34 <sup>b</sup> | 78.31 <sup>b</sup> | 82.67 <sup>b</sup>  | 84.08 <sup>c</sup>  |
| 3       | 7.04 <sup>bcd</sup> | 12.21 <sup>c</sup>   | 18.47 <sup>bc</sup> | 25.58 <sup>bc</sup>  | 38.97 <sup>cd</sup> | 62.60 <sup>b</sup> | 78.72 <sup>b</sup> | 85.29 <sup>ab</sup> | 87.33 <sup>b</sup>  |
| 4       | 7.97 <sup>abc</sup> | 14.23 <sup>ab</sup>  | 20.80 <sup>a</sup>  | 27.22 <sup>a</sup>   | 41.77 <sup>ab</sup> | 66.35 <sup>a</sup> | 81.84 <sup>a</sup> | 87.15 <sup>a</sup>  | 89.34 <sup>ab</sup> |
| 5       | 8.44 <sup>a</sup>   | 15.00 <sup>a</sup>   | 21.72 <sup>a</sup>  | 28.28 <sup>a</sup>   | 43.73 <sup>a</sup>  | 67.65 <sup>a</sup> | 83.75 <sup>a</sup> | 88.74 <sup>a</sup>  | 91.87 <sup>a</sup>  |
| 6       | 6.69 <sup>cd</sup>  | 13.22 <sup>abc</sup> | 18.82 <sup>bc</sup> | 23.80 <sup>c</sup>   | 31.26 <sup>e</sup>  | 43.24 <sup>d</sup> | 54.60 <sup>e</sup> | 58.95 <sup>e</sup>  | 60.97 <sup>f</sup>  |
| 7       | 2.30 <sup>e</sup>   | 2.65 <sup>e</sup>    | 2.85 <sup>e</sup>   | 4.83 <sup>e</sup>    | 5.21 <sup>g</sup>   | 8.54 <sup>f</sup>  | 20.12 <sup>g</sup> | 23.61 <sup>g</sup>  | 39.78 <sup>h</sup>  |
| 8       | 8.36 <sup>ab</sup>  | 12.78 <sup>bc</sup>  | 17.67 <sup>c</sup>  | 23.82 <sup>c</sup>   | 36.91 <sup>d</sup>  | 47.01 <sup>c</sup> | 63.63 <sup>d</sup> | 67.99 <sup>d</sup>  | 70.83 <sup>e</sup>  |
| 9       | 5.75 <sup>d</sup>   | 8.39 <sup>d</sup>    | 11.49 <sup>d</sup>  | 15.06 <sup>d</sup>   | 21.58 <sup>f</sup>  | 36.34 <sup>e</sup> | 50.46 <sup>f</sup> | 51.71 <sup>f</sup>  | 52.64 <sup>g</sup>  |
| SEM     | 0.422               | 0.560                | 0.614               | 0.821                | 0.765               | 0.681              | 1.041              | 1.164               | 1.042               |
| P value | 0.007               | 0.006                | 0.009               | 0.005                | 0.007               | 0.006              | 0.008              | 0.007               | 0.009               |

1) Control diet, 2) The control diet with 100 microliters of thyme extract, 3) The control diet with microliters of thyme extract, 4) The control diet with 100 microliters of oregano extract, 5) The control diet with 200 microliters of oregano extract, 6) The control diet with 10 microliters of thyme essential oil, 7) The control diet with 20 microliters of thyme essential oil, 8) The control diet with 10 microliters of oregano essential oil, 9) The control diet with microliters of oregano essential oil.

SEM: standard error of the means.

Different letters in each column indicate a significant difference at the 0.05 level.

شاهد به همراه ۲۰۰ میکرو لیتر عصاره آویشن) با افزایش کمی غلظت عصاره آویشن در مقایسه با گروه شاهد در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت باعث کاهش گاز تولیدی شد اما در زمان‌های ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت باعث افزایش گاز تولیدی شد. نتایج مربوط به تأثیر افزودن اسانس و عصاره آویشن و پونه بر قابلیت هضم ماده آلی، انرژی خالص شیردهی، انرژی متابولیسمی، پروتئین قابل متابولیسم و غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). با توجه به جدول ۲ قابلیت هضم ماده آلی در اسانس آویشن و پونه در مقایسه با گروه شاهد کاهش داشته است اما قابلیت هضم ماده آلی در عصاره آویشن و پونه در مقایسه با گروه شاهد افزایش پیدا کرده است. تیمار ۷ (جیره شاهد به همراه ۲۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن) بیشترین کاهش قابلیت هضم ماده آلی را در مقایسه با تیمارهای دیگر دارد.

با توجه به جدول ۳ انرژی متابولیسمی و انرژی خالص شیردهی در اثر افزودن اسانس و عصاره پونه و آویشن در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). بیشترین انرژی متابولیسم و انرژی خالص شیردهی در مقایسه با گروه شاهد در سطوح مختلف عصاره‌ها دیده می‌شود. با توجه به جدول ۳ پروتئین قابل متابولیسم در

از نظر اسانس بیشترین تأثیر را تیمار ۷ (جیره شاهد به همراه ۲۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن) در تمامی زمان‌ها در مقایسه با سایر تیمارها داشت. با توجه به جدول ۲ در تیمارهایی که اسانس آویشن و پونه وجود داشت باعث کاهش تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد شده است. اسانس آویشن در تیمار ۷ (جیره شاهد به همراه ۲۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن) در مقایسه با تیمار ۶ (جیره شاهد به همراه ۱۰ میکرولیتر اسانس آویشن) در تمامی زمان‌ها بیشترین کاهش گاز تولیدی را داشتند. با توجه به جدول ۲ اسانس پونه در مقایسه با گروه شاهد باعث کاهش گاز تولیدی شده است. کاهش تولید گاز در اثر اسانس پونه در تیمار ۹ (جیره شاهد به همراه ۲۰۰ میکرولیتر اسانس پونه) در مقایسه با تیمار ۸ (جیره شاهد به همراه ۱۰ میکرولیتر اسانس پونه) در تمامی زمان‌ها شدیدتر بود. عصاره پونه در تیمار ۴ (جیره شاهد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره پونه) و ۵ (جیره شاهد به همراه ۲۰۰ میکرولیتر عصاره پونه) در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش گاز تولیدی شده است. عصاره پونه در ساعت آغازین تخمیر (۲ ساعت) باعث کاهش گاز تولیدی نسبت به گروه شاهد شد اما در زمان‌های دیگر باعث افزایش گاز تولیدی نسبت به گروه شاهد شده است. در عصاره آویشن در تیمار ۲ (جیره شاهد به همراه ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آویشن) در مقایسه با گروه شاهد باعث افزایش گاز تولیدی شد اما در تیمار ۳ (جیره

اسانس و عصاره آویشن و پونه در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). افزودن عصاره توانسته است سبب بهبود بازده تولید پروتئین میکروبی محیط تخمیر گردد ( $P<0/05$ ). به‌طوری‌که در سطوح مختلف عصاره‌های آویشن و پونه در مقایسه با گروه شاهد پروتئین قابل متابولیسم افزایش پیدا کرده است.

با توجه به جدول 3 غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در اسانس و عصاره آویشن و پونه در مقایسه با گروه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). به ترتیب کمترین غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در مقایسه با گروه شاهد در تیمارهای 7، 6، 9 و 8 بود اما بیشترین غلظت اسیدهای چرب کوتاه زنجیر در مقایسه با گروه شاهد در سطوح مختلف عصاره آویشن و پونه دیده شد.

جدول 3- اثر سطوح مختلف اسانس و عصاره آویشن و پونه بر قابلیت هضم و متغیرهای تخمیر برون تنی  
Table 3. The effect of different levels of essential oil and extract of thyme and oregano on *in vitro* digestibility and fermentation variables

| Diets   | OMD<br>(%DM)       | ME<br>(MJ/kg DM)   | NEI<br>(MJ/kg DM)  | SCFA<br>(mmol/200mgDM) | MP<br>(g/kg OMD)   |
|---------|--------------------|--------------------|--------------------|------------------------|--------------------|
| 1       | 71.13 <sup>b</sup> | 10.95 <sup>b</sup> | 9.30 <sup>b</sup>  | 1.36 <sup>b</sup>      | 85.80 <sup>b</sup> |
| 2       | 72.79 <sup>b</sup> | 11.21 <sup>b</sup> | 9.56 <sup>b</sup>  | 1.40 <sup>b</sup>      | 87.80 <sup>b</sup> |
| 3       | 72.06 <sup>b</sup> | 11.09 <sup>b</sup> | 9.44 <sup>b</sup>  | 1.38 <sup>b</sup>      | 86.92 <sup>b</sup> |
| 4       | 75.78 <sup>a</sup> | 11.68 <sup>a</sup> | 10.02 <sup>a</sup> | 1.47 <sup>a</sup>      | 91.41 <sup>a</sup> |
| 5       | 77.06 <sup>a</sup> | 11.89 <sup>a</sup> | 10.22 <sup>a</sup> | 1.50 <sup>a</sup>      | 92.96 <sup>a</sup> |
| 6       | 52.90 <sup>d</sup> | 8.05 <sup>d</sup>  | 6.44 <sup>d</sup>  | 0.96 <sup>d</sup>      | 63.81 <sup>d</sup> |
| 7       | 18.54 <sup>f</sup> | 2.61 <sup>f</sup>  | 1.06 <sup>f</sup>  | 0.19 <sup>f</sup>      | 22.36 <sup>f</sup> |
| 8       | 56.63 <sup>c</sup> | 8.65 <sup>c</sup>  | 7.03 <sup>c</sup>  | 1.04 <sup>c</sup>      | 68.31 <sup>c</sup> |
| 9       | 46.06 <sup>e</sup> | 6.97 <sup>e</sup>  | 5.37 <sup>e</sup>  | 0.80 <sup>e</sup>      | 55.56 <sup>e</sup> |
| SEM     | 0.674              | 0.106              | 0.105              | 0.015                  | 0.813              |
| P value | 0.005              | 0.006              | 0.009              | 0.005                  | 0.008              |

1) Control diet, 2) The control diet with 100 microliters of thyme extract, 3) The control diet with microliters of thyme extract, 4) The control diet with 100 microliters of oregano extract, 5) The control diet with 200 microliters of oregano extract, 6) The control diet with 10 microliters of thyme essential oil, 7) The control diet with 20 microliters of thyme essential oil, 8) The control diet with 10 microliters of oregano essential oil, 9) The control diet with microliters of oregano essential oil.

SEM: standard error of the means.

Different letters in each column indicate a significant difference at the 0.05 level.

تیمار 9 (جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس پونه) و تیمار 7 (جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس آویشن) و تیمار 8 (جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس پونه) به ترتیب کمترین گاز متان را ایجاد کردند.

اثر آنتی اکسیدانی عصاره و اسانس آویشن و پونه با استفاده از روش DPPH در جدول 5 و 6 نشان داده شده است. نتایج تحقیق نشان داد که اسانس و عصاره آویشن و پونه فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی دارند. در این آزمایش قدرت مهار رادیکال‌های آزاد توسط اسانس و عصاره آویشن و پونه به روش آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت به‌طوری‌که توانایی آن‌ها در مهار رادیکال آزاد 2و2- دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل یا DPPH ارزیابی شد.

با افزایش غلظت اسانس و عصاره‌ها، مهار رادیکال‌ها با قدرت بیشتری انجام گرفت. غلظتی از اسانس و عصاره که 50 درصد مهار رادیکالی را منجر می‌شوند، به‌عنوان IC50 شناخته شده و

اثر سطوح مختلف اسانس و عصاره آویشن و پونه بر غلظت متان و آمونیاک در مایع شکمبه پس از 24 ساعت انکوباسیون در جدول 4 نشان داده شده است. میزان متان تولیدی بر اساس میلی‌لیتر متان به ازای 200 میلی‌گرم ماده خوراکی و میلی‌لیتر متان به ازای ماده آلی تخمیر شده و میلی‌لیتر متان به ازای دیواره سلولی تخمیر شده و همچنین میزان تولید گاز متان به‌صورت درصد از گاز 24 ساعت در هر چهار سطح اسانس به‌کاربرده شده در مقایسه با گروه شاهد کم شدن معنی‌داری را نشان داد ( $P<0/05$ ). تیمار 7 (جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس آویشن) و 9 (جیره شاهد به همراه 20 میکرولیتر اسانس پونه) کمترین مقدار متان تولیدی (میلی‌لیتر متان به ازای 200 میلی‌گرم ماده خوراکی) را داشت. اما در سطوح عصاره کاربردی در مقایسه با گروه شاهد میزان متان تولیدی افزایش داشته است.

میزان متان تولیدی (تولید گاز متان درصد از گاز 24 ساعت) در هر سطوح عصاره به‌کاربرده شده باعث افزایش متان شد اما

اسانس‌های موردنظر نیز تعیین گردید. بدین ترتیب، درصد مهار رادیکال آزاد توسط اسانس آویشن در غلظت برابر ۸۰/۲۴ درصد و مهار رادیکال آزاد توسط اسانس پونه در غلظت برابر با IC50 عصاره پونه ۸۱/۴۲ گردید که نشان‌دهنده فعالیت بیش از ۱/۶ برابری اسانس در مقایسه با عصاره‌های آویشن و پونه بود.

داده‌های به‌دست‌آمده در جدول شماره ۶ آورده شده است. بر اساس جدول ۵، غلظت IC50 عصاره پونه برابر با ۴۶۱/۳۵ میکروگرم در میلی‌لیتر و غلظت IC50 عصاره آویشن برابر با ۵۱۷/۷۹ میکروگرم در میلی‌لیتر ثبت گردید. به‌منظور مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره و اسانس، پس از تعیین IC50 عصاره‌های موردبررسی، در همان غلظت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جدول ۴- اثر سطوح مختلف اسانس و عصاره آویشن و پونه بر غلظت متان و آمونیاک در مایع شکمبه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون

Table 4. The effect of different levels of essential oil and extract of thyme and oregano on the concentration of methane and ammonia in the rumen fluid after 24 hours of incubation.

| Diets   | Methane<br>(mL/200 mg<br>diet) | Methane<br>(mL/g fermented<br>organic matter) | Methane<br>(mL/g fermented<br>cell wall) | Methane<br>(% of gas<br>24 hours) | Ammonia<br>(mg/dL)  |
|---------|--------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------|
| 1       | 6.53 <sup>c</sup>              | 5.72 <sup>c</sup>                             | 2.29 <sup>c</sup>                        | 10.61 <sup>b</sup>                | 8.60 <sup>a</sup>   |
| 2       | 7.11 <sup>b</sup>              | 6.22 <sup>b</sup>                             | 2.49 <sup>b</sup>                        | 11.23 <sup>b</sup>                | 8.58 <sup>a</sup>   |
| 3       | 7.20 <sup>b</sup>              | 6.30 <sup>b</sup>                             | 2.52 <sup>b</sup>                        | 11.51 <sup>b</sup>                | 7.04 <sup>bcd</sup> |
| 4       | 8.47 <sup>a</sup>              | 7.41 <sup>a</sup>                             | 2.96 <sup>a</sup>                        | 12.76 <sup>a</sup>                | 7.97 <sup>abc</sup> |
| 5       | 7.20 <sup>b</sup>              | 6.30 <sup>b</sup>                             | 2.52 <sup>b</sup>                        | 10.65 <sup>b</sup>                | 8.44 <sup>a</sup>   |
| 6       | 4.73 <sup>d</sup>              | 4.14 <sup>d</sup>                             | 1.66 <sup>d</sup>                        | 10.96 <sup>b</sup>                | 6.69 <sup>cd</sup>  |
| 7       | 0.47 <sup>f</sup>              | 0.41 <sup>f</sup>                             | 0.17 <sup>f</sup>                        | 5.57 <sup>d</sup>                 | 22.36 <sup>e</sup>  |
| 8       | 4.12 <sup>e</sup>              | 3.60 <sup>e</sup>                             | 1.44 <sup>e</sup>                        | 8.76 <sup>c</sup>                 | 2.30 <sup>ab</sup>  |
| 9       | 0.49 <sup>f</sup>              | 0.43 <sup>f</sup>                             | 0.17 <sup>f</sup>                        | 1.36 <sup>e</sup>                 | 8.36 <sup>d</sup>   |
| SEM     | 0.102                          | 0.089                                         | 0.035                                    | 0.276                             | 0.089               |
| P value | 0.009                          | 0.005                                         | 0.009                                    | 0.006                             | 0.007               |

1) Control diet, 2) The control diet with 100 microliters of thyme extract, 3) The control diet with microliters of thyme extract, 4) The control diet with 100 microliters of oregano extract, 5) The control diet with 200 microliters of oregano extract, 6) The control diet with 10 microliters of thyme essential oil, 7) The control diet with 20 microliters of thyme essential oil, 8) The control diet with 10 microliters of oregano essential oil, 9) The control diet with microliters of oregano essential oil.

SEM: standard error of the means.

Different letters in each column indicate a significant difference at the 0.05 level.

جدول ۵ - غلظت IC50 عصاره پونه و آویشن

Table 5. IC50 concentration of oregano and thyme extracts

| Samples         | DPPH. IC50 (µg/mL) |
|-----------------|--------------------|
| Oregano extract | 461.35             |
| Thyme extract   | 517.80             |

جدول ۶- اثر مهار رادیکال آزاد توسط اسانس آویشن و پونه در غلظت برابر با IC50 عصاره آویشن و پونه (درصد)

Table 6. Effect of free radical inhibition by thyme and oregano essential oil at a concentration equal to IC50 of thyme and oregano extract (%)

| Samples               | DPPH. IC50 (µg/mL) |
|-----------------------|--------------------|
| Oregano essential oil | 81.41              |
| Thyme essential oil   | 80.24              |

به دلیل کم بودن اسانس آویشن و پونه از IC50 عصاره آویشن و پونه معادل زده شد و یک غلظت درست شد، و اسانس پونه ۱/۶۲۸ برابر قدرت مهارکنندگی اسانس در غلظت مشابه IC50 عصاره پونه شد و اسانس آویشن ۱/۶۰۴ برابر عصاره آویشن شد.

## بحث

در این مطالعه به‌طور کلی، افزودن اسانس پونه و آویشن بر میزان تولید گاز در مقایسه با گروه شاهد تأثیر کاهشی معنی‌داری داشت که موافق با نتایج Castillejos و همکاران (2008)، Martinez, Borchers (1965) و Talebzadeh و همکاران (2006) و Talebzadeh و همکاران (2012) است. با افزودن سطوح مختلف اسانس آویشن در شرایط آزمایشگاهی کاهش حجم گاز را در ساعت‌های مختلف انکوباسیون گزارش کردند. در مطالعه Martinez و همکاران (2006) نیز کم شدن گاز تولیدی در سطوح مختلف اسانس آویشن گزارش شد. Borchers (1965) گزارش کرد که آویشن بر تخمیر میکروبی شکمه تأثیرگذار است و سبب کاهش گاز تولیدی می‌شود. Fattahnia و همکاران (2015) گزارش کردند که افزودن اسانس آویشن به جیره باعث کاهش پتانسیل کل تولید گاز و تولید گاز 24-ساعته شدند. Garcia-Gonzalez و همکاران (2008) گزارش کردند افزودن اسانس، باعث کم شدن گاز تولیدی در یک محیط کشت 24-ساعته شدند.

برخی محققین، کاهش گاز تولیدی کل را به کاهش قابلیت هضم ماده خشک مربوط دانستند. در مورد اثر گیاهان دارویی بر تولید گاز، گزارش‌های متعدد و نتایج متغیری ارائه شده است. در بیشتر مطالعات، کاهش و در برخی عدم تغییر یا افزایش در آن را به واسطه گنجاندن گیاهان دارویی به جیره نشخوارکنندگان گزارش نموده‌اند. کاهش تولید گاز می‌تواند به دلیل خاصیت ضد میکروبی گیاه دارویی، عصاره یا اسانس آن باشد که با اثرگذاری بر فعالیت میکروارگانیسم‌ها از تولید گاز جلوگیری می‌کند. به عبارت دیگر، کاهش گاز تولیدی می‌تواند بر اثر کاهش فرآیند تخمیر و کاهش تجزیه ماده آلی باشد که در نهایت منجر به کاهش تولید اسیدهای چرب فرار و کاهش انرژی قابل سوخت و ساز می‌شود. در مورد افزایش گاز تولیدی در اثر استفاده از گیاهان دارویی، عصاره‌ها، اسانس‌ها و ترکیبات فعال آن‌ها پیشنهاد شده است که برخی از اجزای اسانس‌ها به عنوان منبع کربن به وسیله میکروارگانیسم‌های شکمه استفاده می‌شوند که باعث تولید گاز ۲۴ ساعته بالاتر می‌شود (Mirzaei Cheshmehgachi و همکاران، 2023).

در شرایط انکوباسیون آزمایشگاهی، تخمیر کربوهیدرات‌های خوراک منجر به تولید گاز، توده میکروبی و اسیدهای چرب فرار (VFA) می‌شود؛ تولید گاز به‌عنوان یک شاخص کلیدی برای ارزیابی سرعت و میزان تجزیه‌پذیری ماده آلی تلقی می‌گردد.

افزودن اسانس‌های آویشن و پونه به محیط کشت، همبستگی مستقیمی با کاهش در پارامترهای انرژی‌زا و تجزیه نشان داد؛ به‌طوری‌که هم‌زمان با کاهش تجزیه ماده آلی، مقادیر تولید گاز، غلظت VFA و در نهایت انرژی قابل سوخت‌وساز (ME) و انرژی خالص شیردهی (NEL) کاهش همسویی یافتند. این کاهش انرژی قابل متابولیسم، مستقیماً به کاهش فرآیند تخمیر و در نتیجه کاهش تجزیه ماده آلی نسبت داده می‌شود. کاهش تولید گاز در شرایط برون‌تنی، دلیل مستقیمی بر تضعیف فرآیند تخمیر کربوهیدرات‌ها و افت در پتانسیل انرژی‌زایی خوراک است. این یافته‌ها با نتایج تحقیقات پیشین همسو است، به‌گونه‌ای که Fereydonpour و همکاران (2015) دریافتند گونه‌های آویشن بر انرژی متابولیسمی و قابلیت هضم ماده خشک تأثیر معناداری دارند، و Patra و همکاران (2006) و Talebzadeh و همکاران (2012) نیز کاهش معنی‌دار قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را در حیواناتی که از جیره‌های حاوی اسانس گیاهی استفاده کرده بودند، گزارش کرده‌اند.

شکمه، یک محیط تعادلی از غلظت اسیدهای چرب فرار در شکمه (پروپیونات، استات، بوتیرات و لاکتات)، آمونیاک، بافرهای شکمه و بزاق است (Mlamboa و همکاران، 2008). هر چه میزان تخمیر شکمه افزایش یابد، محصولات فرعی حاصل از آن یعنی اسیدهای چرب فرار نیز افزایش می‌یابد. Castillejos و همکاران (2008) نشان دادند که اسانس پونه همانند آویشن و میخک حتی در پایین‌ترین سطح (۵ میلی‌گرم در لیتر در مایع کشت ثابت به افزایش ۳۹ تا ۵۹ درصدی در غلظت اسیدهای چرب فرار کل منجر شد. Luo و همکاران (2023) گزارش کردند که اسانس‌های نعنای فلفلی، آویشن، پونه و ریحان بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار، نسبت مولی استات، پروپیونات، بوتیرات و آمونیاک محیط کشت تأثیری نداشتند. در مقابل، در آزمایشی اسانس آویشن باعث کاهش هضم مواد غذایی و تولید اسیدهای چرب فرار شد (Calsamiglia و همکاران، 2007).

در آزمایشی با استفاده از تکنیک تولید گاز گزارش کردند، استفاده از سطوح 25، 50، 100 و 150 میکرولیتر اسانس روغنی اکالیپتوس تأثیری بر قابلیت هضم ماده آلی و ماده خشک نداشت (Sallam و همکاران، 2009). در آزمایشی دیگر که با گوسفند اخته انجام گرفت، قابلیت هضم ماده آلی، ماده خشک، پروتئین و الیاف غیرقابل حل در شوینده خشی تحت تأثیر افزودن روغن پونه کوهی قرار نرفت (Wang و همکاران، 2009).

تولید آمونیاک را به همراه داشت (Newbold و همکاران، ۲۰۰۴).

Garcia-Gonzalez و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند اسانس، باعث کم شدن تولید متان در یک محیط کشت ۲۴ ساعته شدند و همچنین گزارش کردند که اسانس‌های نعنای فلفلی، نعنای، پونه و آویشن تغییر معنی‌داری در الگوی تخمیر شکمبه، به‌خصوص کاهش تولید متان ایجاد نکردند و تنها تغییرات ناچیزی را سبب شدند. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی نشان داده شده است که به تعدادی از ترکیبات ترپنوئید و فنولیک اجزای شیمیایی و گروه‌های ساختاری موجود در اسانس‌های گیاهی، اثرات متقابل بین آن‌ها و نسبت‌های موجود در آن‌ها مربوط می‌شود. هسته فنولی در تیمول و کارواکرول مانند یک سلاح شیمیایی عمل می‌کند. این ساختار شیمیایی به آن‌ها اجازه می‌دهد تا به‌عنوان یک عامل نفوذی غشایی عمل کنند (فعالیت ضد میکروبی) و به‌عنوان یک جاروب‌گر رادیکال آزاد عمل کنند (فعالیت آنتی‌اکسیدانی). بنابراین، هرگونه تغییر در غلظت این ترکیبات فنولیک در یک عصاره گیاهی، مستقیماً بر شدت و نوع فعالیت بیولوژیکی آن عصاره تأثیر می‌گذارد (Can و همکاران ۲۰۲۵) اسانس‌های گیاهی، به علت ماهیت هیدروفوبیکی (آبگریز)، بسیار شبیه به لیپیدهای غشای سلول باکتریایی هستند و ویژگی‌های ضد باکتریایی آن‌ها به ماهیت هیدروفیلیک (چربی‌دوست) آن‌ها برمی‌گردد (Dorman و Deans، ۲۰۰۰) این مکانیسم به ویژگی‌های لیپوفیلیک اجزای تشکیل‌دهنده اسانس‌های گیاهی و توانایی گروه عاملی آن‌ها ارتباط دارد. اسانس‌های گیاهی به‌طور انتخابی از عمل تعدادی از پروتوزوئرها ممانعت می‌کنند و تولید گاز متان را کاهش می‌دهند. در مطالعه‌ای حدود ۲۵-۹ درصد تولید متان در شکمبه از طریق حضور پروتوزوئرها مژک‌دار است (Dorman و Deans، ۲۰۰۰). تیمول جزء اصلی ترکیبات فنلی در آویشن و کارواکرول نیز یک جزء فرعی است. این ترکیبات بر فرآیند تخمیر شکمبه‌ای به‌واسطه افزایش سیالیت و نفوذپذیری غشاء سلولی و اختلال در تولید پروتئین در غشاء سلولی که به تجزیه دیواره سلولی و خروج مواد سیتوپلاسمی به خارج از سلول منجر می‌شوند، تأثیر خود را می‌گذارند. گزارش شده است که تیمول یک ممانعت‌کننده قوی تولید متان در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد، با توجه به اینکه بیشترین حجم گاز تولیدشده در شکمبه شامل متان و دی‌اکسید کربن می‌باشد (Castillejos و همکاران، ۲۰۰۸).

. در آزمایش دیگری هیچ تغییری در نتیجه کاربرد اسانس‌های گیاهی بر مصرف خوراک، قابلیت هضم مواد مغذی و عملکرد مشاهده نشد (Benchaa و همکاران، ۲۰۰۸). هرچند در آزمایشی، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های مخلوط با اسانس‌های گیاهی، به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد (Patra و همکاران، ۲۰۰۶). همچنین کاهش ماده آلی در شرایط برون تنی در نتیجه افزودن ۴۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس پونه کوهی و ۸۰۰ میلی‌گرم در لیتر اسانس میخک گزارش شده است (Benchaa و همکاران، ۲۰۰۸). در آزمایشی متناقض، افزودن ۲۰۰ گرم نعنای به ازای هرروز به جیره در گاوهای نر اخته هلستاین قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و پروتئین خام تمایل به افزایش داشت. (Ando و همکاران، ۲۰۰۳) افزودن اسانس به‌خصوص در سطوح بالا باعث کاهش قابلیت هضم ماده آلی شد Fraser و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرول در سطوح بالا اثرات ضد میکروبی غیراختصاصی دارند که احتمالاً منجر به کاهش فعالیت گروه‌هایی از باکتری‌ها شده‌اند که در هضم خوراک دخیل هستند. در صورتی که چنین نتیجه‌ای به شرایط عملی تغذیه نشخوارکنندگان تعمیم داده شود، به دلیل کاهش هضم ماده آلی باعث کاهش عملکرد دام می‌شود. اثر سطوح مختلف اسانس و عصاره آویشن و پونه بر غلظت متان و آمونیاک در مایع شکمبه پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۴ مشاهده می‌شود. نتایج مطالعه عصاره و اسانس نیز نشان داد که اسانس آویشن و پونه بهترین نتایج کاهش گاز متان و نیتروژن آمونیاکی را داشت و اختلاف معنی‌داری را در مقایسه با گروه شاهد داشت ( $P < 0/05$ ). استفاده از عصاره آویشن و پونه به روش آزمایشگاهی تأثیری در کاهش متان نداشت. در مقایسه با گروه شاهد عصاره و اسانس آویشن و پونه در تمامی سطوح توانسته‌اند غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) را کاهش دهند ( $P < 0/05$ ). تیمار ۷ (شاهد + ۲۰ میکرولیتر اسانس آویشن) در مقایسه با تیمارهای دیگر بیشترین کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی را داشته است. تولید آمونیاک در شکمبه به دلیل شکار باکتری توسط پروتوزوآ و متابولیسم نیتروژن آن و فعالیت زیاد باکتری‌های تولیدکننده آمونیاک می‌باشد (McIntosh و همکاران، ۲۰۰۳). نتایج مشابهی گزارش شده است که در حضور گیاه دارای ساپونین و عصاره گیاهی دارای ساپونین باعث کاهش نیتروژن آمونیاکی شده است (Mao و همکاران، ۲۰۱۰) اضافه کردن مخلوطی ویژه‌ای از اسانس گیاهان بومی بریتانیا کاهش

محققان مشاهده کردند که تیمول دارای اثر مهاری بر جذب گلوکز توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه است. علاوه بر این، تیمول بر رشد میکروارگانیسم‌های شکمبه، فعالیت آنتی اکسیدانی و بهبود عملکرد سیستم ایمنی دام‌ها تأثیر مثبت دارد. با وجود این یافته‌ها، مطالعات مربوط به ارزیابی کاربرد اسانس آویشن در خوراک دام در منابع علمی محدود است. باین‌حال، شواهد متعددی از آزمایش‌های آزمایشگاهی (*In Vitro*) فعالیت ضد میکروبی آویشن را از طریق کاهش تولید متان و تأثیر بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه تأیید نموده‌اند (García و Castro، 1998، Ayuso).

31 ترکیب شیمیایی در اسانس پونه که در مجموع 95/79 درصد از کل ترکیبات را تشکیل می‌دهد شناسایی شده است. پیریتون (16/32 درصد)، پیریتون (62/29 درصد) و آلفا ترپینول (40/6 درصد) عمده ترکیبات موجود در اسانس پونه می‌باشند. ترکیب‌های عمده تشکیل دهنده اسانس آویشن تیمول (52/4 درصد)، گاماترپین (6/17 درصد)، پاراسیم (2/13 درصد) و کارواکرول (1/6 درصد) است (Sadeghzadeh و همکاران، 2006).

Sharififar و همکاران (2007) ترکیب‌های عمده اسانس آویشن را تیمول (59/37 درصد)، کارواکرول (65/33 درصد)، پاراسیم (72/7 درصد) و گاماترپین (88/3 درصد) گزارش کردند.

غلظت IC50 عصاره اتانولی نعنای معادل 28/5 میکروگرم در میلی لیتر و بوتیلید هیدروکسی تولوئن برابر با 10/1 میکروگرم در میلی لیتر گزارش شده است (Sweetie و همکاران، 2007). در ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی عصاره متانولی پونه با روش DPPH، میزان IC50 عصاره متانولی 74/4 میلی گرم در میلی لیتر گزارش کردند (Golluce و همکاران، 2007). تفاوت در داده‌های به دست آمده با داده‌های گزارش شده پیشین می‌تواند به گونه گیاه، وضعیت گیاه از نظر تازه یا خشک بودن و شرایط محیطی رشد و برداشت گیاه مربوط باشد. بر اساس شواهد موجود ارتباط مثبتی بین میزان قدرت آنتی اکسیدانی و ترکیبات فنلی گیاهان وجود دارد. از طرف دیگر به نظر می‌رسد ترکیبات فنلی که به صورت گسترده در گیاهان یافت می‌شوند، که دارای قدرت آنتی اکسیدانی بالایی هستند (Bahramikia و همکاران، 2009). Puertas-Mejia و همکاران (2002) فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی تیمول، کارواکرول را گزارش کردند. در نتیجه،

می‌توان گفت دلیل فعالیت بالای آنتی اکسیدان اسانس آویشن و پونه، حضور ترکیب‌های فنلی مانند تیمول و کارواکرول است. مطالعه‌ای توسط Simbar و همکاران (2008) روی پنج گونه مختلف آویشن شیرازی از مناطق جغرافیایی گوناگون انجام شد که در آن فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها با استفاده از روش DPPH ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که در نمونه‌هایی با قدرت آنتی اکسیدانی پایین‌تر، غلظت تیمول، کارواکرول، و همچنین مونوترپن‌ها و سسکویی‌ترین‌های اکسیژنه، نسبت به سایر نمونه‌ها کمتر بوده است. ترکیبات مونوترپن (اعم از اکسیژنه و هیدروکربنه) به عنوان ترکیبات کلیدی با خاصیت آنتی اکسیدانی شناخته می‌شوند. در واقع، ترین‌ها به عنوان یکی از اجزای اصلی ساختاری اسانس، عامل اصلی خاصیت آنتی اکسیدانی آن محسوب می‌گردند.

#### 4. نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در شرایط آزمایشگاهی، استفاده از اسانس آویشن و پونه باعث کاهش تولید گاز و سایر فراسنجه‌های تخمیری شد؛ باین‌حال، عصاره‌های آویشن و پونه تأثیری بر مقدار تولید گاز، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم و مقدار اسیدهای چرب فرار نداشتند. این مشاهدات تأکید می‌کند که ترکیبات فعال موجود در اسانس‌ها تأثیر قوی‌تری بر کاهش فرایندهای تجزیه‌ای شکمبه دارند، در حالی که عصاره‌ها فاقد این اثر بازدارنده در مقیاس تخمیر بودند، لذا بررسی دیگر تولیدات نظیر نیتروژن آمونیاکی، متان و ترکیب جمعیت میکروبی نیز حائز اهمیت است. علاوه بر این، هر دو فرم دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی بودند، به طوری که با افزایش غلظت عصاره‌ها، این فعالیت افزایش می‌یافت، اما اسانس‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری در غلظت مشابه نسبت به عصاره‌ها از خود نشان دادند. بر اساس این نتایج دوگانه، اسانس‌ها گزینه بهتری برای دستیابی به اثرات مطلوب شکمبه‌ای خواهند بود؛ اما در زمینه اثرات آنتی اکسیدانی، با وجود فعالیت کمتر، عصاره‌ها به دلیل قیمت پایین‌تر می‌توانند به عنوان یک جایگزین اقتصادی مورد توجه قرار گیرند.

#### سپاسگزاری

در نهایت از دانشگاه محقق اردبیلی که در انجام و بررسی این تحقیق ما را یاری فرمودند کمال تشکر و قدردانی را داریم.

#### تضاد منافع نویسندگان

حاوی منابع مختلف نشاسته و چربی با روش تولید گاز. نشریه پژوهش در نشخوار کنندگان، ۳(۳)، ۳۷-۵۸.

فریدون پور، مریم؛ بیات کوهسار، جواد؛ غلامعلی پورعلمداری، ابراهیم و ابراهیمی، پونه. (۱۳۹۵). اثر اسانس گونه‌های مختلف آویشن بر فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، پژوهش‌های تولیدات دامی. ۷(۱۴)، ۱۰۹-۱۱۴.

فیضی، پیمان؛ کمالی، حسین؛ یزدانی، احمد و هاشمی مقدم، حمید. (۱۳۹۱). مقایسه روش استخراج کلونجر (تقطیر با آب) و استخراج با حلال برای استخراج اسانس روغنی گیاه آدک و آنالیز ترکیب مواد با گاز کروماتوگرافی- اسپکتروسکوپی جرمی. نشریه دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، ۴، ۳۵-۴۱.

کهنسال، محمدرضا؛ قربانی، محمد و رفیعی، هادی. (۱۳۸۸). بررسی عوامل محیطی و غیر محیطی مؤثر بر پذیرش آبیاری بارانی مطالعه موردی استان خراسان رضوی. اقتصاد کشاورزی و توسعه، ۱۷(۱)، ۹۷-۱۱۲.

<https://doi.org/10.30490/aead.2009.5.112>  
8829

## References

- Abdollahzadeh, E., Rezaei, M. & Hosseini, H. (2014). Antibacterial activity of plant essential oils and extracts: The role of thyme essential oil, nisin, and their combination to control *Listeria monocytogenes* inoculated in minced fish meat. *Food Control*, 35(1), 177-183. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.07.004>
- Agarwal, A.K. (2007). Experimental investigation of the effect of biodiesel utilization on lubricating oil tribology in diesel engines. *Journal of Automobile Engineering*, 219, 703-13. <https://doi.org/10.1115/1.3077659>
- Akbartefaghi, M., Ghasemi, E. & Khorvash, M. (2018). Performance, rumen fermentation and blood metabolites of dairy calves fed starter mixtures supplemented with herbal plants, essential oils or monensin. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 102, 630-638. <https://doi.org/10.1111/jpn.12842>

نویسندگان این مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص نگارش و انتشار مطالب و نتایج این پژوهش ندارند.

## دسترسی به داده‌ها

همه اطلاعات و نتایج در متن مقاله ارائه شده است.

## مشارکت نویسندگان

نویسنده اول: طراحی و اجرای پژوهش، جمع‌آوری داده‌ها، نگارش نسخه اولیه مقاله  
نویسنده دوم، سوم و بقیه: جمع‌آوری و وارد کردن داده‌ها در نرم‌افزار، ویرایش و بازبینی مقاله، کنترل نتایج

## منابع

فتاح نیا، فرشید؛ محمدی زاد، طاهر؛ آذرفر، آرش؛ خطیب جو، علی و تاسلی، گلنار. (۱۳۹۴). اثر اسانس آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در جیره‌های

- Abubakar, A.R. & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 12(1), 1-10. <https://doi.org/10.4103/jpbs.JPBS17519>
- Ando, Y., Shimizugawa, T., Takeshita, S., Ono, M., Shimamura, M., Koishi, P. & Furukawa, H. (2003). A decreased expression of angiopoietin-like 3 is protective against atherosclerosis in apoE-deficient mice. *Journal of Lipid Research*, 44, 1216-1223. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300031-JLR200>
- Anele, U.Y., Südekum, K-H., Hummel, J., Arigbede, O.M., Oni, A.O., Olanite, J.A., Böttger, C., Ojo, V.O. & Jolaosho, A.O. (2011). Chemical characterization, in vitro dry matter and ruminal crude protein degradability and microbial protein synthesis of some cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) haulm varieties. *Animal Feed Science and Technology*, 163, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.11.005>

- Asghari, M., Abdi-Benemar, H., Maheri-Sis, N., Salamatdoust-Nobar, R., Salem, A.Z.M., Zamanloo, M.R. & Anelee, U.Y. (2021). Effects of emulsified essential oils blend on performance, blood metabolites, oxidative status and intestinal microflora of suckling calves. *Animal Feed Science and Technology*, 277, 114954. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2021.114954>
- Azadbakht, M., Hosseini, A.S. & Fakhri, M. (2017). Necessity to standardization of extract of medicinal plants in the investigations and manner to do it. *Razi Journal of Medical Sciences*, 23(11), 8-17.
- Bahramikia, S., Ardestani, A. & Yazdanparast, R. (2009). Protective effects of four Iranian medicinal plants against free radical-mediated protein oxidation. *Food Chemistry*, 115, 37-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.11.054>
- Benchaar, C., Hristov, A.N. & Greathead, H. (2009). Essential oils as feed additives in ruminant nutrition. Pages 111-146 in *Phytogenics in Animal Nutrition: Natural Concepts to Optimize Gut Health and Performance*. T. Steiner, ed. Nottingham University Press, Nottingham, UK.
- Benchaar, C., Calsamiglia, S., Chaves, A.V., Fraser, G.R., Colombatto, D., McAllister, T.A. & Beauchemin, K.A. (2008). A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 209-228. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.04.014>
- Blummel, M., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology Animal Nutrition*, 77, 34-24. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00734.x>
- Borchers, R. (1965). Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *Journal of Animal Science*, 24, 1033- 1038. <https://doi.org/10.1128/aem.44.3.561-569.1982>
- Broderick, G.A. & Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*, 63(1), 64-75. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(80\)82888-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(80)82888-8)
- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L. & Ferret, A. (2007). Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90, 2580-2595. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-644>
- Gan, C., Langa, E., Wang, G. Van Bambeke, F., Ballester, D. & Pino-Otín, M.R. (2025). Mechanisms of action and resistance prevention of synergistic thymol and carvacrol combinations with antibiotics in *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. *Natural Products and Bioprospecting*, 15, 36. <https://doi.org/10.1007/s13659-025-00518-7>
- Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J. & Ter Wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feedlot-type diets. *Animal Feed Science Technology*, 145, 259-270. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.037>
- Castro, M.D.L., & García-Ayuso, L.E. (1998). Soxhlet extraction of solid materials: An outdated technique with a promising innovative future. *Analytica Chimica Acta*, 369, 1-10. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
- Chaney, A. & Marbach, E.P. (1962). Modified reagents for determination of urea and ammonia. *Clinical Chemistry*, 8, 130-132.
- Dorman, H.J.D. & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 308-316. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x>
- Faizi, P., Kamali, K., Yazdani, A. & Hashemi Moghadam, H. (2012). Comparison of solvent extraction and hydrodistillation of essential oil from *Biebersteinia multifida* DC. Conjunction with gas chromatography - mass spectroscopy, *Journal of North Khorasan University of Medical Sciences (Natural Products and Medicinal Plants Suplemntry)*, 4, 35-41. [In Persian]
- Fattahnia, F, Mohammadizadeh, T., Azarfar, A., Khatib Joe, A. & Tasley, G. (2015). Effect of *Zataria multiflora* essential oil on

- rumen fermentation processes in diets containing different sources of starch and fat by gas production method. *Journal of Ruminant Research*, 3, 37-58. [In Persian]
- Fereydonpour, M., Bayat Kohsar, J., Gholamalipour, Alamdari, A. & Ebrahimi, P. (2015). Effects of different thyme species on parameters of gas production, digestibility and rumen fermentation parameters in vitro conditions. *Animal Production Research*, 7, 109-114. [In Persian]
- Fraser, G.R., Chaves, A.V., Wang, Y., McAllister, T.A., Beaucheminand, K.A. & Benchaar, C. (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *Journal Dairy Science*, 90, 2315-2328. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-688>
- Garcia-Gonzalez, R., Lopez, S., Fernandez, M. & Gonzalez, J. S. (2008). Dose-response effects of Rheum officinal root and Frangulaalnus bark on ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science Technology*, 145, 319-334. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.05.040>
- Getachew, G., Makkar, H.P.S. & Becker, K. (2002). Tropical browses: contents of phenolic compounds, in vitro gas production and stoichiometric relationship between short chain fatty acid and in vitro gas production. *The Journal of Agricultural Science*, 139, 341-352. <https://doi.org/10.1017/S0021859602002393>
- Golluce, M., Sahin, F., Sokmen, M., Ozer, H., Daferera, D., Sokmen, A., Polissiou, M., Adiguzel, A. & Ozken, H. (2007). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry*, 103, 1449-1456. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.061>
- González-Hernández, R.A., Valdez-Cruz, N.A. & Trujillo-Roldán, M.A. (2024). Factors that influence the extraction methods of terpenes from natural sources. *Chemical Papers*, 78, 2783-2810. <https://doi.org/10.1007/s11696-024-03339-z>
- Kohansal, M.R., Ghorbani, M. & Rafiei, H. (2009). Study of effective environmental and non-environmental factors in adoption sprinkler irrigation methods: Case Study of Khorasan Razavi Province. *Eqtesad-E Keshavarzi Va Towse'e*, 17, 97-112. [In Persian]
- Luo, Z., Liu, T., Li, P., Cheng, S. & Casper, D.P. (2023). Effects of essential oil and/or encapsulated butyrate on fecal microflora in neonatal Holstein calves. *Animals*, 13, 3523. <https://doi.org/10.3390/ani13233523>
- Mao, S.Y., Zhang, G. & Zhu, W.Y. (2010). Effect of disodium fumarate on in vitro rumen fermentation of different substrates and rumen bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *Asian Australasian Journal Animal Science*, 20, 543-549. <https://doi.org/10.5713/ajas.2007.543>
- Marques, R.D.S. & Cooke, R.F. (2021). Effects of Ionophores on Ruminal Function of Beef Cattle. *Animals: an open access Journal from MDPI*, 11(10), 2871. <https://doi.org/10.3390/ani11102871>
- Martinez, S., Madrid, J., Hernandez, F., Megia, M.D., Sotomayor, J.A. & Jordan, M.J. (2006). Effect of Thyme essential oils (*Thymus hyemalis* and *Thymus zygis*) and Monensin on in vitro ruminal degradation and volatile fatty acid production. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 4, 6598-6602. <https://doi.org/10.1021/jf060985p>
- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A. & Newbold, C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environment Microbiology*, 69, 5011-5014. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.8.5011-5014.2003>
- Meizoso, R., Marin, F.R., Herrero, M., Señorans, F. J., Reglero, G., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2006). Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano.

- Chemical and functional characterization. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1560–1565. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.01.018>
- 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 and Developmen*, 27, 7-55.
- Menke, K.H., Raab, L., Salewski, A., Steingass, H., Fritz, D. & Schneider, W. (1979). The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feedingstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. *Journal of Agriculture Science (Cambridge)*, 93, 217–229.
- Mirzaei Cheshmehgachi, S., Moeini, M. M., & Khamisabadi, H. (2023). Effect of different levels of *Foeniculum vulgare* and *Nigella sativa* powder on rumen fermentation parameters and protozoa population of Sanjabi sheep by in vitro and in vivo methods. *Animal Production Research*, 12(3), 49-63. <https://doi.org/10.22124/AR.2023.23257.1730>
- Mlamboa, V., Mouldb, F.L., Sikosana, J.L. N., Smith, T., Owen, E. & Mueller-Harvey, I. (2008). Chemical composition and in vitro fermentation of tannin-rich tree fruits. *Animal Feed Science and Technology*, 140, 402-417. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2007.03.001>
- Nagy, J.G. & Tengerey, R.P. (1968). Antibacterial action of essential oil of *Artemisia* as an ecological factor. II. Antibacterial action of volatile oil of *Artemisia tiridentata* (big sagebrush) on bacteria from the rumen of mule deer. *Journal of Applied Microbiology*, 16, 441-444. <https://doi.org/10.1128/am.16.3.441-444.1968>
- National Research Council (NRC). (2001). Nutrient Requirement of Dairy Cattle, 7<sup>th</sup> revised ed. National Academy of Science, Washington DC.
- Newbold, C.J., McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R. & Wallace, R.J. (2004). Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 114, 105-112. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2003.12.006>
- Patra, A.K., Kamra, D.N. & Agarwal, N. (2006). Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts in in vitro gas production test. *International Congress Series*, 1293, 176–179. <https://doi.org/10.1016/j.ics.2006.01.025>
- Puertas-Mejia, M., Hillebrand, S., Stashenko, E. & Winterhater, P. (2002). In vitro radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 17, 380-4. <https://doi.org/10.1002/ffj.1110>
- Sadeghzadeh, L., Whitenin, F. & Olia, P. (2006). Antimicrobial composition and antimicrobial properties of essential oil of *Sh. Research and Development*, 56, 52-71.
- Sallam, S.M.A., Bueno, I.C.S., Brigide, P., Godoy, P.B., Vitti, D.M.S.S. & Abdalla, A.L. (2009). Efficacy of eucalyptus oil on in vitro ruminal fermentation and methane production, *Options Mediterraneennes. Serie A. Seminaires Mediterraneens*, 85, 267-272.
- SAS Institute. (2003). SAS User's Guide: Statistics, Release 9.1. SAS Inst. Inc, Cary, NC.
- Shahsavari, N., Barzegar, M., Sahari, M. & Naghdi Badi, H. (2008). An investigation on the antioxidant activity of essential oil of *Zataria multiflora* Boiss, in soybean oil. *Journal of Medicinal Plants*, 7, 56-68.
- Sharififar, F., Moshafi, M.H., Mansouri, S.H., Khodashenas, M. & Khoshnoodi, M. (2007). In vitro evaluation of antioxidant activities of the oil and methanol extract of endemic *Zataria Boiss*. *Food Control*, 18, 800-805. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.04.002>
- Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992). Antioxidative

- properties of xanthone on the auto oxidation of soybean in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 945-948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a005>
- Simbar, M., Azarbad, Z., Mojab, F. & Alavi Majd, H. (2008). A comparative study of therapeutic effects of zataria multiflora vaginal cream and metronidazole vaginal gel on bacterial vaginosis. *Phytomedicine*, 15(12), 1025-31. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.004>
- Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T. & Arsenakis, M. (1995). Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2384 – 2388. <https://doi.org/10.1021/jf00057a013>
- Sweetie, R., Kanatt, R.C. & Arun, S. (2007). Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation –processed lamb meat. *Food Chemistry*, 100, 451-458. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.066>
- Talebzadeh, R., Alipour, D., Saharkhiz, M.J., Azarfar, A. & Malecky, M. (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. *Animal Feed Science and Technology*, 172, 115-124. <https://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.11.011>
- Wang, M., Jiang, J., Tan, Z., Tang, S., Sun, Z. & Han, X. (2009). In situ ruminal crude protein and starch degradation of three classes of feedstuffs in goats. *Journal Applied Animal Research*, 36, 23-28. <https://doi.org/10.1080/09712119.2009.9707023>
- Zolfaghari, B. & yegdaneh, A. (2010). Recent advances in extraction methods of medicinal plant components. *Journal of Herbal Drugs*, 1(1), 51-55.