نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۳، تابستان ۱۳۹۳
ص‌ص: ۷۱~۸۲

تاثیر اسانس گیاه رزماری بر قابلیت هضم خوراک و فراسنجه های خونی و شکمبه گوسفندان نژاد قزل

- **محسن صحرایی بلوردی** (نویسنده مسئول)

دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه ارومیه

- **رسول پیرمحمدی**

دانشیار، دانشگاه ارومیه

تاریخ دریافت : شهریور ماه ۹۱ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۸۹۲۵۱۷۹۳

Email: Sahraei_mohsen67@yahoo.com

چکیده:

این آزمایش به منظور بررسی تاثیر استفاده از اسانس رزماری بر قابلیت هضم خوراک، فرآسنجه های خونی و شکمبه گوسفندان نژاد قزل انجام شد. برای انجام آزمایش از ٤ راس گوسفند نر با میانگین وزن ۲± ٤٦ کیلوگرم در قالب طرح مربع لاتین ٤×٤ استفاده شد. تیمارها شامل جیره پایه (شاهد) به علاوه سه جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ٤۰۰ میلی گرم اسانس رزماری در روز بود. آزمایش در ٤ دوره ۲۱ روزه شامل ١٤ روز به عنوان دوره عادت پذیری و ۷ روز نمونه برداری انجام شد. قابلیت هضم خوراک به روش جمع آوری مدفوع تعیین گردید. مایع شکمبه گوسفندان در زمان های صفر ، ۲، ٤ و ٦ ساعت پس از خوراک دهی در روز بیستم نمونه برداری جمع آوری و مقادیر pH، نیتروژن آمونیاکی و کل اسیدهای چرب فرار آن اندازه گیری شد. روز پایانی نمونه برداری در زمان های صفر و ٤ ساعت پس از خوراک دهی از سیاهرگ گردنی وداج گوسفندان خون گیری به عمل آمد و میزان گلوکز، اوره، پروتئین کل و کراتینین آنها اندازه گیری گردید. نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که دز ۱۰۰ میلی گرم اسانس در مقایسه با تیمار شاهد و دز ۲۰۰ میلی گرم اسانس سبب کاهش کل اسیدهای چرب فرار شکمبه شد (P <۰/۰۵). غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه تیمار شاهد در تمامی زمان‌های نمونه برداری بالاتر از تیمار دوم و همچنین تیمار سوم نیز بالاتر از تیمار دوم و چهارم بود (P <۰/۰۵). در ٤ ساعت پس از مصرف خوراک غلظت کراتینین پلاسما در تیمار شاهد بالاتر از تیمار چهارم بود (P <۰/۰۵). به طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که دز ۲۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری ممکن است تاثیر مثبت بر هضم خوراک و تخمیر شکمبه گوسفندان داشته باشد. هرچند آزمایشات بیشتری در این زمینه باید انجام گیرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس رزماری، گوسفند قزل، قابلیت هضم، فراسنجه های شکمبه، فراسنجه های خون.

Animal Sciences Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 103 pp: 71-82

Effects of Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) essential oils on Digestibility, Blood and Rumen Parameters of Ghezel Sheep

By: M. Sahraei Belverdy, (Corresponding Author, Email: Sahraei_mohsen67@yahoo.com
Tel: +989189251793) MSc Graduated of Urmia University; R. Pirmohammadi, Associate Professor, Department of Animal Science, Urmia University, Urmia, Iran.

Received: September 2012 **Accepted: May 2013**

This study was conducted to evaluate effects of rosemary essential oils (REO) on feed digestibility, blood and rumen parameters of Ghezel sheep. Four male sheep with average body weight 46±2 kg were used in a 4×4 Latin square design. Treatments composed of Basal diet (control) in addition to diets containing 100 (RO100), 200 (RO200) and 400 (RO400) mg/day of REO. Sheep's fed with 4 diets at 4 periods of 21 days (14 days as adaptation and 7 days for sample collection). Digestibility was determined by fecal collection method. On 20 day of the experimental period, Ruminal liquor samples were taken at 0, 2, 4 and 6 hours after feeding for rumen pH, N-NH3 and total volatile fatty acids measurements. On the last day of each measurement period, Blood samples were taken at 0 and 4 hours after feeding, via jugular vein, and analyzed for glucose, urea, and total protein and creatinine contents. The results showed that Ruminal total volatile fatty acids in RO100 diet were lower than control and RO200 diets (P<0.05). Ruminal ammonia concentration in control diet was higher than RO100 diet at all sampling times and also RO200 diet was higher than RO100 and RO400 diets (P<0.05). Blood creatinine concentration in control diet was higher than RO400 diet at 4 h after feeding (P<0.05). In conclusion, treatment of 200 mg/day REO may have positive effect on feed digestibility and rumen fermentation of sheep; however more experiments are required in this field.

Key words: Rosemary essential oils, Ghezel sheep, Digestibility, Rumen parameters, Blood parameters.

مقدمه

آنتی بیوتیک‌ها به عنوان محرک رشد از سال ۱۹۴۸ برای بهبود عملکرد حیوانات مورد استفاده قرار گرفته‌اند(Nevel and Demeyer, 1988). با این وجود از سال ۱۹۹۷ سازمان سلامت جهانی (WHO[1]) و سازمان خوارو بار کشاورزی ملل متحد در مورد خطرات استفاده از آنتی بیوتیک‌های محرک رشد هشدار داده‌اند (FAO, WHO,2004)، به طوریکه استفاده از این ترکیبات از سال ۲۰۰۶ در اتحادیه اروپا ممنوع شد (European Commission, 2003). برای حل این مشکل جایگزین‌های متعددی شامل پروبیوتیک‌ها، پری بیوتیک‌ها، اسیدهای آلی، عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی پیشنهاد شده است. اسانس‌های گیاهی ترکیبات فعال طبیعی می‌باشند که از تقطیر گیاهان با بخار آب یا حلال‌های استخراج کننده جدا می‌شوند (Benchaar et al., 2008). قسمت‌های مختلف گیاه شامل گل‌ها، برگ‌ها، دانه‌ها، ریشه‌ها، ساقه‌ها و پوست برای اسانس گیری استفاده می‌شوند. از نظر شیمیایی اسانس‌های گیاهی عمدتا از ترکیبات ترپنوئیدی به خصوص مونوترپن‌ها، سسکویی ترپن‌ها و دی ترپن‌ها تشکیل شده‌اند. با این وجود میزان متفاوتی از هیدروکربن‌های آلیفاتیک با وزن ملکولی پایین، الکل-ها، اسیدها، آلدهیدها، استرهای آسیلی یا لاکتون‌ها و گاهی ترکیبات حاوی نیتروژن و سولفور، کومارین‌ها و هومولوگ‌های فنیل پروپانوئید در آنها یافت می شوند (Dorman and Deans, 2000). اسانس-های گیاهی به خصوص آنهایی که غنی از ترکیبات فنولی هستند خاصیت آنتی میکروبی قوی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند (Dean and Ritchie, 1987; Conner,1993). این ترکیبات به علت ماهیت چربی دوستی در غشاء سلول نفوذ کرده و سبب اختلال در انتقال الکترون، گرادیان یونی، انتقال پروتئین و فسفوریلاسیون اکسیداتیو غشاء می‌شوند (Ultee et al., 1999; Dorman and Deans, 2000). از اسانس‌ها به علت دارا بودن خاصیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی در تغذیه حیوانات استفاده شده است (Cowan,۱۹۹۹). نتایج برخی پژوهش‌ها نشان داد

که این مواد می‌توانند تخمیر شکمبه را به طور مطلوبی تغییر دهند (McIntosh et al., 2000; Benchaar et al., 2008; Greathead, 2003). گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis L*) متعلق به خانواده نعناعیان است که به صورت درختچه‌های کوچک و همیشه سبز دیده می‌شود. این گیاه بومی حوزه مدیترانه است و پرورش آن در بیشتر مناطق ایران معمول است. رزماری را می‌توان به عنوان یک محصول مزرعه‌ای تولید کرد. گیاه در خاک‌های با زهکشی مناسب با pH حدود ۶/۵ تا ۷ و تحت شرایط آب و هوای گرم و آفتابی رشد می‌کند (Peter, 2004) و نسبت به یخبندان حساس است (Domokos et al., 1997). روغن رزماری معمولا از طریق تقطیر با آب یا بخار حاصل می‌گردد، هرچند استخراج با حلال فوق بحرانی با استفاده از دی‌اکسید کربن هم در عمل دارای کاربرد است (Bicchi et al., 2000). در طب سنتی از آن برای درمان سر درد، آسم، بیماری‌های مفصلی و اختلالات گوارشی استفاده می‌شود (زرگری، ۱۳۶۹). روغن رزماری را می‌توان به عنوان تثبیت کننده چربی‌ها، روغن‌ها و غذاهای حاوی چربی و کره در برابر اکسیداسیون و در گوشت‌های تخمیری به کار برد (Pokorny et al.,1998). ترکیبات اصلی اسانس رزماری عمدتا شامل آلفا پینن، بتا پینن، سینئول، کامفن و کامفور می‌باشند (Benchaar et al., 2008) و دارای فعالیت ضد باکتریایی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی هستند (Bozin et al., 2007; Djenane et al., 2002) که به علت وجود دی ترپن‌های فنولی موجود در آن می‌باشد (Pintore et al., 2002). فعالیت ضد میکروبی اسانس رزماری علیه طیف گسترده‌ای از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی گزارش شده است (Pintore et al., 2002). آزمایشات نشان دادند که استفاده از اسانس رزماری موجب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی گوشت بره‌ها می‌شود (Monino et al., 2008; Nieto et al., 2010). مصرف عصاره رزماری در میش‌های شیرده سبب بهبود بازدهی استفاده از خوراک و عملکرد آنها شد که به تاثیر آن بر کاهش تجزیه پذیری پروتئین و نشاسته در شکمبه نسبت داده شده است (Chiofalo et al., 2011). همچنین استفاده از اسانس رزماری در جیره طیور گوشتی سبب بهبود راندمان رشد و سیستم ایمنی آنها گردید (Ghazalah and Ali, 2008). خاصیت آنتی میکروبی ترکیبات فعال اسانس رزماری می‌تواند سبب بهبود تخمیر شکمبه و عملکرد نشخوارکنندگان شود (Calsamiglia et al., 2007; Benchaar et al., 2008).

بنا بر این هدف از این تحقیق بررسی اثرات اسانس رزماری بر قابلیت هضم خوراک و فرآسنجه های خونی و شکمبه ای گوسفندان قزل بود.

مواد و روش‌ها:

آزمایش بر روی ۴ راس گوسفند نر قزل با میانگین وزن ۲±۴۶ کیلوگرم در قالب طرح مربع لاتین ۴×۴ در ۴ دوره انجام شد. هر دوره آزمایش ۲۱ روز بود که ۱۴ روز برای عادت پذیری قوچ ها به جیره آزمایشی در نظر گرفته شده بود و ۷ روز نیز به جمع آوری داده‌ها اختصاص داده شد. احتیاجات غذایی گوسفندان در سطح نگهداری بر اساس جداول استاندارد NRC[2] (۱۹۸۵) تعیین و توسط نرم افزار UFFDA[3] تنظیم شد. تیمارهای آزمایش شامل: ۱- جیره پایه (شاهد)، به علاوه سه جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری در روز بودند. جیره‌های آزمایشی به صورت کاملا مخلوط در دو وعده ۸ صبح و ۴ بعدازظهر در اختیار حیوانات قرار داده شد. قبل از هر وعده خوراک دهی، اسانس رزماری بر روی ۱۰۰ گرم کنسانتره اسپری شد و در اختیار حیوان گذاشته می‌شد تا از مصرف کل اسانس توسط حیوان اطمینان حاصل گردد. با توجه به اینکه حیوانات در حد نگهداری تغذیه می‌شدند لذا کل میزان کنسانتره و جیره‌ای که در اختیار آنها قرار گذاشته شد توسط آنها مصرف می‌شد. گوسفندان در طول دوره آزمایش در قفس‌های انفرادی نگهداری و به آب تمیز و کافی دست‌رسی داشتند. اسانس مورد استفاده آزمایش از شرکت باریج اسانس کاشان (ماده موثره اسانس رزماری، سینئول به میزان ۱۸ درصد بود) تهیه گردید. ۵ روز اول دوره نمونه برداری به جمع آوری مدفوع اختصاص داده شد. کل مدفوع تولیدی هر روز، صبح روز بعد و قبل از خوراک دهی نوبت صبح جمع آوری و توزین شد و پس از مخلوط کردن کامل کل مدفوع، ۱۰ درصد آن در فریزر نگهداری شد. همچنین از خوراک داده شده به حیوان نیز به طور روزانه نمونه برداری و تا زمان انجام آزمایش قابلیت هضم در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. جهت اندازه گیری مواد مغذی مدفوع و خوراک نمونه‌های فریز شده با یکدیگر مخلوط شدند و نمونه همگن به دست آمده جهت اندازه گیری میزان مواد مغذی استفاده شد. تمام نمونه های گرفته شده در آون با دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت ۴۸ ساعت خشک شده و پس از خرد شدن با آسیاب دارای قطر روزنه یک میلی متر مورد تجزیه آزمایشگاهی قرار گرفت. ماده خشک، پروتئین خام، چربی خام و خاکستر نمونه‌های مدفوع و خوراک توسط روش AOAC (۲۰۰۰) تعیین شد. دیواره سلولی و دیواره سلولی منهای همی سلولز توسط روش Van Soest همکاران(۱۹۹۱) اندازه گیری شد.

جدول ۱- ترکیب مواد خوراکی و مواد مغذی جیره پایه آزمایشی

اجزاء	مقدار
مواد خوراکی(درصد ماده خشک)	
یونجه خشک	۵۰
کاه جو	۱۰
دانه جو	۲۹/۴
سبوس گندم	۱۰
مکمل معدنی و ویتامینی	۰/۳۵
نمک	۰/۲۵
ترکیب شیمیایی	
انرژی قابل متابولیسم (مکاکالری در کیلوگرم)	۲/۳۲
ماده خشک (درصد)	۸۹/۴۵
پروتئین خام (درصد)	۱۱/۲۰
دیواره سلولی (درصد)	۴۳/۷۳
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (درصد)	۲۴/۷۰
عصاره اتری (درصد)	۲/۵۰
کلسیم (درصد)	۰/۶۲
فسفر (درصد)	۰/۳۵

نمونه گیری از شکمبه در روز بیستم هر دوره در زمان‌های صفر، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از خوراک دهی صبحگاهی توسط لوله مری انجام شد. جهت ممانعت از اختلاط بزاق و مایع شکمبه، ۲۰ سی سی اولیه مایع شکمبه دور ریخته می‌شد. بلافاصله پس از اخذ نمونه شکمبه، pH آن توسط pH متر مدل (metrohm ۸۲۷, USA) اندازه‌گیری شد. نمونه‌های مایع شکمبه با استفاده از پارچه ۴ لایه متقال صاف و بر اساس روش Reynal و همکاران (۲۰۰۷)، دو نمونه از آن جهت اندازه گیری اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی با اسید سولفوریک ۵۰ درصد با نسبت ۱ به ۵۰ اسید سولفوریک به مایع شکمبه مخلوط گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد (Ipharraguerre et al., 2007). اندازه گیری اسیدهای چرب فرار مایع شکمبه به روش Ottenstein و Bartley (۱۹۷۱) توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی (Philips PU4410, Cam bridge, UK) با ستون شیشه‌ای (۱/۶۵ متر × ۴/۶ میلی متر) انجام شد. نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه بر اساس روش Smith و Murphy (۱۹۹۳) و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (RC 501, USA) اندازه گیری شد. خون گیری در روز پایانی هر دوره در زمان صفر و ۴ ساعت پس از خوراک دهی نوبت صبح از طریق ورید وداج به عمل آمد. نمونه گرفته شده داخل لوله‌های تحت خلا حاوی سدیم هپارین ریخته شد. پلاسما توسط سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ هزار دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد جدا و و در فریزر نگهداری گردید. اندازه‌گیری متابولیت‌های خونی شامل گلوکز، اوره، پروتئین کل و کراتینین توسط کیت‌های تجاری شرکت پارس آزمون و با استفاده از دستگاه اتوآنالیزر مدل (Alcyon300,USA) انجام شد.

برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های قابلیت هضم ظاهری و کل اسیدهای چرب فرار شکمبه از رویه GLM نرم افزار SAS (۲۰۰۲) استفاده شد. مدل آماری استفاده شده به شکل زیر بود:

$$y_{ij\,k} = \mu + P_i + A_j + T_k + e_{ijk}$$

که y_{ijk} = متغیر وابسته، μ = میانگین، P_i = اثر دوره، A_j = اثر حیوان، T_k = اثر تیمار و e_{ijk} = اثر اشتباه آزمایشی، می‌باشد.

تجزیه و تحلیل داده های مربوط به فرآسنجه‌های شکمبه و خون که به صورت تکرار شده در زمان بودند، بر اساس طرح اندازه‌گیری‌های مکرر و با رویه‌ی MIXED این نرم افزار با استفاده از مدل زیر انجام شد:

$$Y_{ij(k)l} = \mu + P_i + A_j + T_k + Ea_{ij(k)} + t_l + Tt_{kl} + Eb_{ij(k)l}$$

که $Y_{ij(k)l}$= متغیر وابسته، μ = اثر میانگین، P_i= اثر دوره، A_j= اثر حیوان، T_k= اثر تیمار، $Ea_{ij(k)}$= اشتباه اصلی (اثر تصادفی)، t_l= اثر زمان اندازه‌گیری، Tt_{kl}= برهمکنش تیمار و زمان اندازه گیری و $Eb_{ij(k)l}$ = اشتباه فرعی، می‌باشد. همچنین با توجه به کم بودن فاصله وزنی حیوانات اثر حیوان معنی‌دار نشد و لذا از مدل حذف گردید. مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون توکی با سطح احتمال ($P\leq ۰/۰۵$) انجام شد.

نتایج

قابلیت هضم

میانگین قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، دیواره سلولی، دیواره سلولی منهای همی سلولز، پروتئین خام و چربی خام در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. از نظر قابلیت هضم ماده خشک، دیواره سلولی، دیواره سلولی منهای همی سلولز و پروتئین خام بین تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$)، ولی تیمار سوم (۲۰۰ میلی گرم اسانس) از نظر عددی بالاترین مقدار را دارا بود . قابلیت هضم ماده آلی در تیمار سوم بالا تر از تیمار های ۲ و ۴ بود ($P <۰/۰۵$) اما با تیمار شاهد تفاوت معنی داری نداشت ($P>۰/۰۵$). نتایج مربوط به قابلیت هضم چربی نشان داد که در بین تیمارهای آزمایشی تیمار ۲۰۰ میلی گرم اسانس بالاترین میزان عددی را داشت و به شکل معنی داری بالاتر از تیمار ۴۰۰ میلی گرم اسانس بود ($P\leq ۰/۰۵$).

جدول ۲- قابلیت هضم مواد مغذی گوسفندان تغذیه شده با جیره های آزمایشی

قابلیت هضم(٪)	تیمار ۱	۲	۳	۴	SEM	*P*-value
ماده خشک	۶۱/۱۷	۶۰/۰۳	۶۳/۸۸	۶۰/۲۲	۱/۱۹	۰/۱۸
ماده آلی	۶۴/۲۹^{ab}	۶۲/۵۴^{b}	۶۶/۷۷^{a}	۶۳/۰۵^{b}	۰/۷۲	۰/۰۲۴
دیواره سلولی	۵۶/۴۵	۵۵/۰۷	۵۹/۵۰	۵۵/۳۶	۱/۴۲	۰/۲۱
دیواره سلولی بدون همی سلولز	۴۰/۵۶	۴۴/۱۹	۵۱/۶۲	۴۴/۵۱	۲/۵۵	۰/۱۰
پروتئین خام	۵۹/۲۰	۵۷/۳۲	۶۰/۸۹	۵۸/۴۳	۱/۵۹	۰/۴۹
چربی خام	۴۵/۰۶^{ab}	۴۵/۲۳^{ab}	۵۱/۲۹^{a}	۴۳/۸۴^{b}	۱/۵۷	۰/۰۵

تیمارهای ۱ الی ۴ به ترتیب شامل جیره پایه و جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری بودند.

$^{a, b}$ بین میانگین های با حروف غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی دار وجود دارد($P \leq ۰/۰۵$).

PH شکمبه

میانگین pH مایع شکمبه در زمان‌های نمونه برداری، صفر، ۲، ۴ و ۶ ساعت پس از مصرف خوراک در جدول ۳ آورده شده است. در میانگین زمان‌های نمونه برداری، صفر، ۲ و ۶ ساعت پس از مصرف خوراک اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد($P>۰/۰۵$). در ۴ ساعت پس از مصرف خوراک، بین تیمار ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم اسانس رزماری اختلاف معنی داری وجود داشت ($P <۰/۰۵$) به شکلی که دز ۲۰۰ میلی گرم پایین ترین و دز ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس بالاترین pH را دارا بودند.

تولید کل اسیدهای چرب فرار

نتایج مربوط به تولید اسیدهای چرب فرار شکمبه در جدول شماره ۳ آمده است. به نحوی که در جدول مشاهده می شود، دز ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری کمترین میزان اسید های چرب فرار را داشت و با تیمار شاهد و ۲۰۰ میلی گرم اسانس اختلاف معنی دار نشان داد ($P <۰/۰۵$)، با این وجود بین سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی دار مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

نیتروژن آمونیاکی

غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در میانگین زمان‌های نمونه برداری، صفر و ۴ ساعت پس از مصرف خوراک در جدول شماره ۴ آورده شده است. تجزیه واریانس مربوط به این صفت نشان داد که در زمان‌های مختلف نمونه برداری بین تیمارهای آزمایشی مختلف اختلاف معنی دار وجود داشت. در تمامی زمان‌های نمونه برداری تیمار ۲۰۰ میلی گرم اسانس بالاترین مقدار عددی و تیمارهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم اسانس نیز به ترتیب کمترین مقدار عددی را دارا بودند و تیمار ۲۰۰ میلی گرم اسانس با تیمارهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم اسانس اختلاف معنی داری نشان داد ($P <۰/۰۵$). در تمامی زمان‌های نمونه برداری غلظت نیتروژن آمونیاکی تیمار شاهد بالاتر از تیمار ۱۰۰ میلی گرم اسانس رزماری بود ($P <۰/۰۵$).

فراسنجه‌های خونی

مطابق داده‌های حاصل در جدول ۵ سطوح مختلف اسانس رزماری تاثیر معنی داری بر غلظت گلوکز، اوره و پروتئین کل پلاسما نداشتند ($P>۰/۰۵$). غلظت عددی کراتینین پلاسما در ۴ ساعت پس از مصرف خوراک برای تیمار شاهد بالاترین بود و یک روند کاهشی بین تیمارهای آزمایشی مشاهده گردید، به طوری که این روند منجر به ایجاد اختلاف معنی دار بین تیمار شاهد و تیمار چهارم شد ($P <۰/۰۵$). در زمان صفر و میانگین زمان‌های نمونه برداری نیز غلظت کراتینین تیمار شاهد بالاترین مقدار عددی را دارا بود، ولی با سایر تیمارهای آزمایشی اختلاف معنی داری نداشت ($P>۰/۰۵$). در تمامی صفاتی که به صورت تکرار شده در زمان اندازه گیری شدند، اثر متقابل تیمار×زمان معنی‌دار نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳- مقدار pH و اسیدهای چرب فرار کل مایع شکمبه در زمان های مختلف نمونه برداری

صفت	زمان	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	p-value: تیمار	p-value: زمان	p-value: تیمار×زمان
pH	میانگین	۶/۸۴	۶/۸۶	۶/۷۸	۶/۸۳	۰/۰۷	۰/۷۵	۰/۰۱	۰/۶۵
	۰	۷/۰۹	۷/۱۵	۷/۱۱	۷/۱۷	۰/۱۱			
	۲	۶/۶۷	۶/۶۷	۶/۶۵	۶/۶۳	۰/۱۱			
	۴	۶/۷۶^{ab}	۶/۸۹^{a}	۶/۶۴^{b}	۶/۷۷^{ab}	۰/۱۱			
	۶	۶/۸۴	۶/۷۳	۶/۷۰	۶/۷۶	۰/۱۱			
TVFA	4	۶۱/۲۷^{a}	۵۰/۰۵^{b}	۶۳^{a}	۵۸/۵۰^{ab}	۲/۰۸	۰/۰۱۸		

(میلی مول در لیتر)

تیمارهای ۱ الی ۴ به ترتیب شامل جیره پایه و جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری بودند.

$^{a, b}$ بین میانگین های با حروف غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی دار وجود دارد($P<۰/۰۵$).

TVFA: کل اسیدهای چرب فرار شکمبه (میلی مول در لیتر)

جدول ٤- میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه گوسفندان در زمان های مختلف (میلی گرم در دسی لیتر).

زمان	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	p-value: تیمار	p-value: زمان	p-value: تیمار× زمان
میانگین	۷/۷۴^{ac}	۴/۲۵^{b}	۸/۷۵^{a}	۵/۳۵^{bc}	۱	۰/۰۲۷	۰/۰۹	۰/۹۲
۰	۸/۲۲^{ac}	۴/۷۳^{b}	۸/۹۴^{c}	۵/۸۹^{ab}	۱/۲۴			
۴	۷/۲۵^{bc}	۳/۷۷^{a}	۸/۵۶^{c}	۴/۸۲^{ab}	۱/۲۴			

تیمارهای ۱ الی ۴ به ترتیب شامل جیره پایه و جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری بودند.

$^{a, b, c}$ بین میانگین های با حروف غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی دار وجود دارد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۵- فراسنجه های پلاسمای گوسفندان تغذیه شده با جیره های آزمایشی در زمان های مختلف نمونه برداری (میلی گرم در دسی لیتر)

	زمان	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	SEM	p-value: تیمار	p-value: زمان	p-value: تیمار× زمان
گلوکز	میانگین	۶۷/۱۲	۷۲/۲۵	۶۸/۵۰	۶۸/۳۷	۳/۱۱	۰/۴۵	۰/۸۵	۰/۸۵
	۰	۶۸/۲۵	۷۲/۲۵	۶۷/۷۵	۶۷/۲۵	۴/۱۹			
	4	۶۶	۷۲/۲۵	۶۹/۲۵	۶۹/۵۰	۴/۱۹			
اوره	میانگین	۲۹/۸۵	۲۸/۶۲	۲۷/۸۷	۳۰/۱۲	۱/۲۲	۰/۳۰	۰/۰۱	۰/۸۵
	۰	۲۷/۲۵	۲۶	۲۶	۲۷/۲۵	۱/۷۳			

ادامه جدول ۵

	4	۳۲/۵۰	۳۱/۲۵	۲۹/۷۵	۳۳	۱/۷۳		
پروتئین تام	میانگین	۸	۸/۰۶	۷/۹۸	۷/۷۰	۰/۲۴	۰/۵۱	۰/۳۳	۰/۹۴
	۰	۷/۹۷	۸/۰۲	۷/۸۷	۷/۵۷	۰/۳۲			
	4	۸/۰۲	۸/۱۰	۸/۱۰	۷/۸۲	۰/۳۲			
کراتینین	میانگین	۲/۰۶	۱/۹۰	۱/۸۲	۱/۷۲	۰/۱۲	۰/۱۳	۰/۶۵	۰/۸۵
	۰	۲/۰۴	۱/۸۳	۱/۸۵	۱/۷۲	۰/۱۶			
	4	۲/۰۸^{a}	۱/۹۷^{ab}	۱/۸۰^{ab}	۱/۷۳^{b}	۰/۱۶			

تیمارهای ۱ الی ۴ به ترتیب شامل جیره پایه و جیره حاوی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری بودند.

$^{a, b}$ بین میانگین های با حروف غیر مشابه در هر ردیف تفاوت معنی دار وجود دارد($P <$ ۰/۰۵).

بحث

در تمامی زمان‌های نمونه برداری میانگین pH شکمبه در محدوده فیزیولوژیکی مناسب (۰/۵±۶/۷) برای فعالیت میکروارگانیسم‌های سلولولایتیک قرار داشت (Anassori et al., 2011). همان طور که نتایج آزمایش نشان داد دز ۲۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری از نظر قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، دیواره سلولی، دیواره سلولی منهای همی سلولز، پروتئین خام و تولید کل اسیدهای چرب فرار شکمبه بیشترین مقدار عددی را دارا بود و ۴ ساعت پس از مصرف خوراک کمترین pH شکمبه را داشت. در تحقیقی بر روی اسانس رزماری در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که دز ۵ میلی گرم در لیتر اسانس رزماری که با توجه به حجم مایع شکمبه (حدود ۲۰ لیتر) تقریبا برابر غلظت اسانس تیمار دوم می‌باشد تأثیری بر میزان کل اسیدهای چرب فرار شکمبه نداشت (Castillejos et al., 2008)، که با نتیجه تحقیق حاضر مطابقت ندارد. Benchaar و همکاران (۲۰۰۸) بیان نمودند که اثر اسانس‌های گیاهی بر تخمیر شکمبه و تولید اسیدهای چرب فرار ممکن است وابسته به نوع جیره مصرفی، شرایط آزمایش و طول دوره سازگاری باشد. با توجه به اینکه در تحقیق حاضر جیره غذایی بر پایه علوفه ولی جیره آزمایش فوق بر پایه کنسانتره بود، همچنین به علت متفاوت بودن نوع آزمایش (درون تنی در برابر آزمایشگاهی) و طول دوره سازگاری (دو هفته در برابر عدم دوره سازگاری) نتیجه آزمایش اخیر مطابق با نتیجه آزمایش ذکر شده نمی‌باشد. Hikon و همکاران (۱۹۶۷) نشان دادند مونوترپن‌های هیدروکربنه آلفا پینن، بتا پینن و کامفن سبب افزایش تولید گاز و افزایش فعالیت میکروب‌های شکمبه در مقایسه با تیمار شاهد در شرایط آزمایشگاهی می‌شوند. با توجه به اینکه بخش مهمی از ترکیبات فعال اسانس رزماری را مونوترپن‌های هیدروکربنه آلفا پینن، بتا پینن و کامفن تشکیل می‌دهند (ساعی و همکاران، ۱۳۸۸)، احتمالا دز ۲۰۰ میلی گرم اسانس رزماری در این آزمایش سبب افزایش جمعیت باکتری‌های فیبرولایتیک شکمبه شده است که هضم ADF خوراک و تولید VFA را افزایش می‌دهند. همچنین در این تیمار احتمالا افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه سبب کاهش pH شده است. موافق با نتایج آزمایش حاضر Chaves و همکاران (۲۰۰۸) در اثر استفاده از اسانس‌های گیاهی در جیره بره‌ها مشاهده نمودند که اسانس سبب کاهش pH شکمبه و افزایش تولید اسیدهای چرب فرار شد که آنرا به افزایش تخمیر شکمبه نسبت دادند.

با توجه به اینکه در تیمار ۱۰۰ میلی‌گرم اسانس رزماری، میانگین غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه پایین‌تر از سطح ۵ میلی گرم در دسی لیتر، که برای حفظ رشد باکتری‌های شکمبه لازم است (Satter and Slyter,1974,) قرار داشت، احتمالا به این علت سبب کاهش رشد باکتری‌های شکمبه و در نتیجه تخمیر شکمبه‌ای خوراک شده است. Benchaar و همکاران (۲۰۰۸) در رابطه با اسانس‌های گیاهی بیان نمودند که اثر اسانس بر تخمیر میکروبی شکمبه بستگی به دز اسانس مصرفی دارد، که در آزمایش حاضر نیز دزهای مختلف اسانس رزماری اثرات متفاوتی بر تخمیر بر جای گذاشتند.

همچنین مشخص شده که برخی از میکروارگانیسم‌های شکمبه قادر به

عادت پذیری به دزهای بالای اسانس‌های گیاهی هستند (Cardozo et al., 2004; Busquet et al., 2005a; Busquet et al., 2005b; Fraser et al., 2007) که احتمالا میتواند دلیلی بر عدم تاثیر منفی دزهای بالاتر اسانس رزماری بر تخمیر میکروبی شکمبه در آزمایش حاضر باشد. در بین تیمارهای آزمایشی تیمار ۲۰۰ میلی گرم اسانس بیشترین قابلیت هضم چربی را دارا بود و با تیمار ۴۰۰ میلی گرم اسانس اختلاف معنی داری داشت. در نشخوارکنندگان تری گلیسیرید خوراک توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه به اسیدهای چرب آزاد و گلیسرول تبدیل می‌شوند. بخش زیادی از اسیدهای مذکور توسط باکتری-های شکمبه به فرم اشباع در می‌آیند (McDonald et al.,1995).

میزان جذب اسیدهای چرب زنجیر بلند جیره غذایی در روده کوچک وابسته به لیپاز لوزالمعده و ترشحات صفراوی است. درجه غیر اشباع بودن چربی، احتمالا مهم ترین خصوصیتی است که هضم چربی خوراک را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Harfoot and Hazlewood، 1988). با توجه به اینکه اسانس‌های گیاهی خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های مسئول بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب در شکمبه دارند (Benchaar et al.,2006; Chaves et al., 2008)، لذا تصور می‌شود که در این آزمایش اسانس رزماری از طریق خاصیت ضد باکتریایی و تغییر در بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیر اشباع سبب تغییر در قابلیت هضم چربی خوراک شده است. همان طور که نتایج نشان داد تیمارهای آزمایشی ۲۰۰ میلی گرم اسانس رزماری و شاهد در تمامی زمان‌های نمونه برداری بالاترین غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه را داشتند، هرچند با افزایش غلظت اوره پلاسما همراه نبود. افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در صورتی که با افزایش میزان اوره پلاسما همراه نباشد احتمالا سبب افزایش سنتز پروتئین میکروبی در شکمبه می‌شود (خلیل وندی و همکاران، ۱۳۹۰). تیمار دوم و تیمار چهارم سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه در مقایسه با تیمار شاهد شدند که با عدم کاهش میزان اوره پلاسما همراه بود. Mcintosh و همکاران (۲۰۰۳) گزارش نمودند که خاصیت مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی بر فعالیت پروتئولیتیکی میکروارگانیسم‌های شکمبه عمدتا به علت مهار دی آمیناسیون می‌باشد. پروتوزآها به همراه دو گروه از باکتری‌ها (شامل پروتئولیتیک‌ها که به تعداد فراوان اما با فعالیت دی آمیناسیون پایین و گروه دیگر باکتری‌های تولید کننده آمونیاک به میزان فراوان که از اسیدهای آمینه به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند، تشکیل شده‌اند) نقش اصلی را در تولید آمونیاک شکمبه بر عهده دارند (Bach et al.,2005). اثر مهارکنندگی اسانس‌های گیاهی علیه باکتریهای پروتئولیتیک، تولید کننده آمونیاک به میزان فراوان و پروتوزآها (Mcintosh et al.,2003; Tasouka et al., 2008) می‌تواند علت کاهش غلظت آمونیاک شکمبه در تیمارهای ۱۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم اسانس رزماری باشد. همچنین موافق با نتایج آزمایش حاضر Wallace (۲۰۰۴) در اثر مصرف مخلوطی از اسانس های گیاهی به میزان ۱۰۰ میلی گرم در روز در گوسفندانی که با جیره کم پروتئین تغذیه می‌شدند مشاهده نمود که اسانس با کاهش جمعیت باکتری های تولید کننده آمونیاک به میزان فراوان، غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه را کاهش داد. این باکتری‌ها به میزان کم در شکمبه حضور دارند اما فعالیت دی آمیناسیون بالایی دارند (Russell et al., 1988). تغییر در غلظت پروپیونات شکمبه معمولا با تغییر در غلظت گلوکز خون همراه است (دانش مسگران و همکاران،۱۳۸۷). با توجه به نتایج به دست آمده در این آزمایش، عدم وجود اختلاف معنی دار در غلظت گلوکز پلاسما تیمارهای آزمایشی احتمالا به علت عدم تاثیر اسانس رزماری بر تولید پروپیونات در شکمبه است. غلظت کراتینین پلاسما در ۴ ساعت پس از مصرف خوراک توسط تیمار ۴۰۰ میلی گرم در روز اسانس رزماری در مقایسه با تیمار شاهد کاهش یافت. کاهش غلظت کراتینین پلاسما احتمالا نشان دهنده کاهش میزان پروتئین بدن می‌باشد (Polat et al., 2011). Chiofalo و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند عصاره رزماری سبب افزایش غلظت کراتینین، گلوکز و پروتئین کل پلاسما در میش-های شیرده شد. عدم تطابق نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش Chiofalo احتمالا به علت وجود تفاوت در نوع و میزان ترکیبات فعال موجود در عصاره و اسانس رزماری، نوع جیره آزمایش و شرایط فیزیولوژیکی حیوان می باشد.

نتیجه گیری و پیشنهاد:

به طور کلی نتایج آزمایش نشان داد که در بین دزهای اسانس رزماری، دز ۲۰۰ میلی گرم در روز سبب بهبود نسبی هضم خوراک و تخمیر شکمبه در گوسفندان می‌شود اما نمی توان در این مورد اظهار نظر قطعی نمود. برای بررسی بهتر و دقیق‌تر اثر رزماری بر عملکرد گوسفندان آزمایشات بیشتری مورد نیاز است.

پاورقی:

1- World Health Organization
2- National Research Council
3- User Friendly Feed Formulation Done Again

منابع

۱- خلیل وندی- بهروزیار، ح.، رضایزدی، ک. و دهقان بنادکی، م. ۱۳۹۰. تاثیر روش‌های فراوری علوفه اسپرس بر قابلیت هضم، تجزیه پذیری، فراسنجه های خونی و شکمبه ای گاوهای هلشتاین. *مجله پژوهش های علوم دامی*. جلد ۲۱، شماره ۱، ، صفحه ۱۰۳-۹۰.

۲- دانش مسگران، م.، طهماسبی، ع. و وکیلی، ع. ۱۳۸۷. *هضم و سوخت-ساز در نشخوارکنندگان*. انتشارات دانشگاه فردوسی. ۲۶۱ص.

۳- زرگری، ع. ۱۳۶۹. *گیاهان دارویی*. انتشارات دانشگاه تهران. جلد ۴. ۶۴۵ص.

۴- ساعی- دهکردی، س.، تاجیک، ح.، مرادی، م.، جعفری دهکردی، ا. و قاسمی، س. ۱۳۸۸. بررسی ترکیبات شیمیایی و خصوضیات ضد میکروبی روغن فرار گیاه رزماری به تنهایی و در ترکیب با لیزوزیوم، علیه لیستریا مونو سیتوژنز. *مجله ارمغان دانش*، دوره ۱۴، شماره ۳، صفحه ۱۱-۱.

5- Anassori, E., Dalir-Naghadeh, B., Pirmohammadi, R., Taghizadeh, A., Asri-Rezaei, S., Maham, M. et al. (2011). Garlic: A potential alternative for monensin as a rumen modifier. *Journal of livestock science* 142: 276-287.

6- AOAC, (2000). Official Methods of Analysis, 17th ed. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.

Bach, A., Calsamiglia, S. and Stern, M.D. (2005). Nitrogen Metabolism in rumen. *Journal of Dairy Science*. 88: 9-21.

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

8- Benchaar, C., Wang, Y., Chaves, A.V., McAllister, T.A. and Beauchemin, K.A. (2008). Use of plant extracts in ruminant nutrition. In: Acharya, S.N., Thomas, J.E. (Eds.), Advanced in Medicinal Plant.

9- Bicchi, C., Binello, A. and Rubiolo, P. (2000). Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary *(R. officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. *Phyrtochemical Analysis*. 11: 236–242.

10-Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I. and Jovin, E. (2007) .Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* ., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agriculture and Food chemistry*. 55:7879-7885.

11- Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2005a). Screening for the effects of natural plant extracts and secondary plant metabolites on rumen microbial fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 123: 597-613.

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

13- Calsamiglia, S., Busquet, M., Cardozo, P.W., Castillejos, L., Ferret, A. and Fandino, I.(2007). The use of essential oils in ruminants as modifier of rumen microbial fermentation. In: Proc. Penn State Dairy Cattle Nutrition Workshop, Grantville, PA, pp. 87–100.

14-Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A. and Kamel, C. (2004). Efeects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science*, 82: 3230-3236.

15-Castillejos, L., Calsamiglia, S., Martin-Tereso, J. and Ter Wijlen, H. (2008). In vitro evaluation of effects of ten essential oils at three doses on ruminal fermentation of high concentrate feed lot-type diets. *Journal of Animal Feed Science and Technology*. 145: 259-270.

16- Chaves, A.V., Stanford, B. K., Gibsond, L.L., McAllister, T.A. and Benchaar, C. (2008). Effects of Carvacrol and Cinnamaldehyde on intake, rumen fermentation, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*. 145: 396-408.

17- Chiofalo, V., Liotta, L., Fiumano, R., Riolo, E. B. and Chiofalo, B. (2011). Influence of dietary supplementation of *rosmarinus officinalis L*. on performances of dairy ewes organically managed. *Journal of Small Ruminant Research*. 104: 122-128.

18-Conner, D.E.(1993). Naturally occurring compounds. In: Davidson, P.M., Branen, A.L. (Eds.), Antimicrobials in Foods. Dekker, New York, 441–468.

19-Cowan,M. M.(1999). Plant products as antimicrobial agents. *Journal of Microbiological Reviews*. 12: 564-582.

20-Dean, S.G. and Ritchie, G. (1987). Antibacterial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 5: 165– 180.

21-Djenane, D., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J.A. and Roncales, P. (2002). Ability of a-tocopherol, taurine and rosemary, in combination with vitamin C to increase the oxidative stability of beef steaks displayed in modified atomosphere. *Journal of Food Chemistry*. 76: 407-415.

22-Domokos, J., Hethely, E., Palinkas, J., Szirmai, S. and Tulok, M.H.(1997). Essential oil of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) of Hungarian origin. *Journal of Essential Oil Research*. 9: 41–50.

23-Dorman, H.J.D. and Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 308–316.

24- European Commission. (2003). Recommends of European Parliament Council on Additives for Use in Animal Nutrition. *Journal of European Union Law*, 268-29. L, 268-43.

25-FAO/OIE/WHO. (2004). Second join FAO/OIE/WHO expert work shop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: management options. Oslo, Norway, 75-79.

26-Fraser, G.R., Chaves, A.V., Wang,Y., McAlister,T.A., Beauchemin, K.A. and Benchaar, C. (2007). Assessment of the effects of cinnamon leaf oil on rumen microbial fermentation using two continuous culture systems. *Journal of Dairy Science*. 90:2315-2328.

27-Ghazalah, A.A. and Ali, A. M. (2008). Rosemary leaves as a dietary supplement for growth in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 7: 234-239.

28-Greathead, H. (2003). Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Journal of Proceedings of the Nutrition Society*. 62: 279–290.

29- Harfoot, C.G. and Hazlewood, G.P. (1988). Lipid metabolism in the rumen. In: Hobson, P.N. (Ed.), The Rumen Microbial Ecosystem. *Elsevier Applied Science Publishers*, London, UK. 285–322.

30-Hikon, O., Sakai, T., Jones, M. B. and Longhurst. W.M. (1967). Effect of Various Essential Oils Isolated from Douglas Fir Needles upon Sheep and Deer Rumen Microbial Activity. *Applied Microbiology*. 15: 777-784.

31-Ipharraguerre, I. R., Reynal, S. M., Lineiro, M., Broderick, G. A. and Clark, J. H.(2007). A Comparison of Sampling Sites, Digesta and Microbial Markers, and Microbial References for Assessing the Postruminal Supply of Nutrients in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science. 90:1904–1919.*

32- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J. F. D. and Morgan, C. A. *Animal Nutrition* (1995). Fifth Edition. Longman publication.

33-McIntosh, F.M., Newbold, C.J., Losa, R., Williams, P. and Wallace, R.J.(2000). Effects of essential oils on rumen fermentation. *Reproduction Nutrition Development*. 40: 221–222 (abstract).

34- McIntosh, F.M., Williams, P., Losa, R., Wallace, R.J., Beever, D.A and Newbold, C.J. (2003). Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*. 69: 5011–5014.

35- Monino, M.I., Martinez, C., Sotomayor, J.A., Lafuente, A. and Jordan, M.J. (2008). Polyphenolic transmission to segureno lamb meat from ewes dietary supplemented with the distillate from rosemary (*Rosmarinus officinalis*) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:3363-3367.

36- National Research Council, (1985). Nutrient

Requirements of Sheep. National Academic Press, Washington, DC, Sixth reved.

37-Nevel, C.J. and Demeyer, D.I. (1988). Manipulation of rumen fermentation. *Journal of Microbial Ecology*.154: 387–447.

38- Nieto, G., Diaz, P., Banon, S., Garrido, M.D. (2010). Dietary administration of ewe diets with a distillate from rosemary leaves (*Rosmarinus officinalis L.*) Influence on lamb meat quality. *Journal of Meat Science*. 84: 23-29.

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

40- Peter, K.V.(2004). *Handbook of Herbs and Spices*. 2nd ed. CRC Press LLC: USA; 360 .

41- Pintore, G., Usai, M., Bradesi, P., Julino, C., Boatto,T. F., Chessa, M. et al. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of *R. officinalis L*. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*. 17: 9-15.

42- Pokorny, J., Rebolva, Z., Janitz, W. (1998). Extracts from rosemary and sage as natural antioxidants for fats and oils. *Czech Journal of Food Sciences*. 16: 227–234.

43- Polat, U., Yesilbag, D. and Mustafa, E. (2011). Serum Biochemical Profile of Broiler Chickens Fed Diets Containing Rosemary and rosemary volatile oil. *Journal of Biology and Environmental Science*. 5: 23-30.

44- Reynal, S. M., Ipharraguerre, I.R., Liñeiro, M., Brito, A. F., Broderick, G. A and Clark, J.H. (2007). Omasal flow of soluble proteins, peptides, and free amino acids in dairy cows fed diets supplemented with proteins of varying ruminal degaradabilities. *Journal of Dairy Science.* 90:1887-1903.

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

46-SAS Institute. (2002). SAS Users Guide: Statistics. SAS Institute Inc., Cary, NC.

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

48- Smith, F.E. and Murphy, T.A. (1993). Analysis of Rumen Ammonia and Blood urea Nitrogen. www.liferaydemo.unl.edu.

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

50-Ultee, A., Kets, E.P.W. and Smid, E.J. (1999). Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen Bacillus cereus. *Applied and Environmental Microbiology*. 65: 4606–4610.

51- Van Soest, P.J., Robertson, J.B. and Lewis, B.A. (1991). Methods of dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch carbohydrates in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74: 3583–3597.

52- Wallace, R.J.(2004). Antimicrobial properties of plant secondary metabolites. *Journal of Proceedings of the Nutrition Society*. 63: 621–629.