



"مقاله پژوهشی"

تأثیر افزودن سطوح مختلف اسانس بذر کتان به سیلاژ یونجه روی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات تخمیر آزمایشگاهی

مقصود بشارتی^۱، معصومه نیازی فر^۲، ذبیح اله نعمتی^۳، امیر کریمی^۴ و محمدرضا شیخلو^۵

۱- دانشیار دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، گروه علوم دامی (نویسنده مسؤول: m_besharati@hotmail.com)

۲- کارشناسی ارشد تغذیه دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، گروه علوم دامی

۳ و ۴- دانشیار و استادیار، دانشگاه تبریز، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، گروه علوم دامی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۲/۱۰

صفحه: ۴۸ تا ۵۵

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات اسانس بذر کتان (صفر، ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم اسانس به ازای هر کیلوگرم) بر ترکیبات شیمیایی، پایداری هوازی و فراسنجه های تولید گاز سیلاژ یونجه انجام گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل یونجه بدون افزودنی (شاهد)، ۲. یونجه به علاوه ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم اسانس بذر کتان، یونجه به علاوه ۱۲۰ میلی گرم در کیلوگرم اسانس بذر کتان بودند که به مدت ۶۰ روز در دمای اتاق سیلو شدند. پس از باز نمودن سیلوه ها اندازه گیری قابلیت تولید گاز با استفاده از روش درون آزمایشگاهی با ۵ تکرار در ساعت های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ انجام گرفت. داده های بدست آمده در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی آنالیز شدند. افزودن اسانس بذر کتان در هر دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به سیلاژ یونجه میزان pH سیلاژ را به طور معنی داری ($p < 0.05$) نسبت به شاهد کاهش داد. افزودن اسانس به سیلاژ یونجه بر میزان ماده خشک تأثیر گذاشت به طوری که در تیمار مکمل شده با سطح ۱۲۰ میلی گرم، ماده خشک (30.02%) نسبت به شاهد (24.43%) افزایش یافت. افزودن اسانس بذر کتان در سطح ۱۲۰ میلی گرم به سیلاژ یونجه میزان پروتئین خام (12.36%) و کربوهیدرات های محلول در آب (4.61%) را افزایش داد ($p < 0.05$). افزودن اسانس بذر کتان در غلظت های ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم به سیلاژ یونجه به طور معنی داری ($p < 0.05$) نیتروژن آمونیاکی را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد. هر دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم اسانس بذر کتان موجب کاهش حجم تولید گاز نسبت به تیمار شاهد شد ($p < 0.05$). در کل داده های به دست آمده نشان دهنده اثر مثبت اسانس بذر کتان بر کیفیت سیلاژ یونجه و خصوصیات تخمیری آن است.

واژه های کلیدی: اسانس گیاهی، بذر کتان، پایداری هوازی، تولید گاز آزمایشگاهی، سیلاژ یونجه

مقدمه

علوفه جزء مهمی از جیره ی نشخوارکنندگان را تشکیل می دهد که در این میان خانواده لگومینوز از اهمیت ویژه ای برخوردار می باشد. از این خانواده یونجه حائز اهمیت بیشتری است. یکی از خصوصیات مهم یونجه، کیفیت بالای تغذیه ای آن برای دام ها است. در بسیاری از مناطق نگهداری علوفه جهت استفاده در درازمدت، زمانی از سال که علوفه تازه برای جیره نشخوارکنندگان در دسترس نمی باشد، ضروری است. در کشورهایی که فصل رشد محدود است علوفه خشک و سیلاژ نقش مهمی در تامین منابع غذایی نشخوارکنندگان دارد. سیلو کردن یک روش برای حفظ محصول براساس تخمیر طبیعی اسیدلاکتیکی تحت شرایط بی هوازی است که می تواند علوفه را در طول سال به عنوان منبع اصلی تغذیه، با ارزش غذایی بالا برای نشخوارکنندگان فراهم کند. یکی از مشکلات اصلی در تهیه یک سیلاژ با کیفیت، به پایین رساندن سریع pH سیلو در مدت زمان کم است (۸). pH علوفه در زمان برداشت بین ۶ تا ۷ است و پس از سیلو شدن، با تخمیر مناسب pH می تواند مساوی یا کمتر از ۴ شود، که این کاهش pH در پی تولید اسیدلاکتیک و دیگر اسیدهای آلی به وسیله باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک در حداقل کردن کاهش ارزش مواد غذایی اهمیت فراوان دارد (۱۷). افزودنی های سیلویی می توانند به محرک تخمیر و بازدارنده فساد مواد غذایی طبقه بندی شوند. به علاوه، بازدارنده های فساد می توانند به زیرگروه های بازدارنده های تخمیری و تقویت کننده پایداری

هوازی تقسیم شوند که اسانس های گیاهی با مهار رشد میکرواورگانیسم های نامطلوب، مواد مغذی سیلاژ را حفظ می کند (۱۶). امروزه دانه های روغنی فرآورده های استراتژیک کشاورزی دنیا محسوب می شود (۳۷). اسانس کتان حاوی اسیدهای چربی به نام اسید آلفالینولنیک و اسیدلینولیک است که غنی ترین منبع اسیدهای چرب امگا-۳ در طبیعت است و حاوی بیشتر از دو برابر امگا-۳ موجود در روغن های ماهی است. در آزمایشی که توسط حجت پناه و همکاران (۱۹) انجام شد با بررسی اسانس های گیاهی مختلف برای تغییر دادن تخمیر سیلاژ نشان دادند برخی از اسانس ها که به عنوان افزودنی سیلاژ استفاده می شوند، اثرات مطلوبی روی ترکیبات شیمیایی سیلاژ ذرت دارد. در خصوص تأثیر بذرکتان و اسانس گیاهی حاصل آن بر ترکیبات و خصوصیات شیمیایی و پایداری هوازی سیلاژ یونجه اطلاعات تقریباً خیلی محدودی وجود دارد. بنابراین این آزمایش با هدف بررسی تأثیر اسانس کتان بر سیلاژ یونجه انجام گرفت.

مواد و روش ها

تهیه اسانس کتان: بذر سبز کتان با آسیاب خرد و الک شد. حدود ۲۰۰ گرم بذرکتان آسیاب شده با روش خیساندن و با استفاده از حلال ان- هگزان اسانس گیری گردید (۳۳).
تهیه سیلو: علوفه یونجه چین چهارم به مدت ۲۴ ساعت رطوبت زدایی و توسط چابر به اندازه های تقریبی ۳-۵ سانتی متر خرد گردید. اسانس بذر کتان در محلول اتانول با سطح ۱۲۰ میلی گرم به ازای هر کیلوگرم وزن تر بر روی

و ثبت میزان گاز تولیدی ناشی از تخمیر موادغذایی به روش فدیوراک (جابجایی آب) در ساعت‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ بعد از عمل انکوباسیون انجام گرفت. برای تخمین قابلیت هضم ماده آلی از حجم گاز تولیدی بر اساس ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک در طول ۲۴ ساعت و رابطه زیر استفاده شد (۲۴).

$OMD = 14.88 + 0.899GP + 0.45CP + 0.065ASH$
 OMD: قابلیت هضم ماده آلی (%), GP: حجم گاز تولیدی تصحیح شده برای ۲۴ ساعت (میلی لیتر بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک), CP: پروتئین خام (بر حسب درصد), ASH: خاکستر خام (گرم بر کیلوگرم ماده خشک).

برآورد ماده آلی قابل هضم در ماده خشک (DOMD) با استفاده از رابطه زیر برآورد شد (۲۴).

$$DOMD = OMD \times \%OM$$

DOMD: ماده آلی قابل هضم در ماده خشک (بر حسب درصد), OMD: قابلیت هضم ماده آلی (بر حسب درصد), OM: ماده آلی نمونه (بر حسب درصد).

برآورد انرژی قابل متابولیسم (ME): این پارامتر بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (۲۴).

$$ME = 2.20 + 0.136 GP + 0.00574 CP$$

ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک), GP: حجم گاز تولیدی در ۲۴ ساعت (میلی لیتر بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک), CP: پروتئین خام (گرم بر کیلوگرم ماده خشک).

برآورد اسیدهای چرب زنجیر کوتاه (SCFA): این پارامتر با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$SCFA = 0.00425 + 0.0222 GP$$

SCFA: اسیدهای چرب کوتاه زنجیر, GP: حجم گازی تولیدی در ۲۴ ساعت (میلی لیتر بر ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک).

پایداری هوازی: میزان پایداری هوازی با استفاده از روش آدوسوگان و همکاران (۱) انجام گرفت. در این روش مقدار ۲۰۰ گرم از هر تکرار را درون ظروف یکبار مصرف بدون درب ریخته و یک دماسنج در مرکز هر توده سیلویی و ۲ دماسنج در ۲ نقطه مختلف اتاق قرار داده شد. زمانی که دمای توده سیلویی به ۲ درجه بالاتر از دمای محیط رسید، سیلاژ فاسد در نظر گرفته شد.

جهت تعیین مؤلفه‌های تولید گاز از معادله $P = b(1 - e^{-ct})$ برای تطبیق داده‌های تولید گاز استفاده شد، که در این معادله P تولید گاز در زمان t، b پتانسیل تولید گاز بخش محلول و غیرمحلول، c نرخ تولید گاز و t زمان تخمیر است. پارامترهای تولید گاز با استفاده از رویه NLIN نرم افزار SAS (۳۲) برآورد شد.

تجزیه آماری

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده از قالب طرح آماری کاملاً تصادفی برنامه آماری SAS (۳۲) با رویه GLM آنالیز شدند و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها (در سطح ۰/۰۵ درصد) به کار برده شد. مدل آماری طرح به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}$$

علوفه اسپری شد و درون سیلوهای آزمایشگاهی با گنجایش وزنی ۲/۵ کیلوگرم که دارای شیر جهت خروج شیرابه‌های سیلویی در پایین هر سیلو می‌باشند، دستی فشرده شدند و به مدت ۶۰ روز در دمای محیط اتاق نگهداری گردیدند.

تعیین مؤلفه‌های شیمیایی: در پایان ۶۰ روز، سیلوها باز و بلافاصله pH، ماده خشک و کربوهیدرات محلول نمونه‌ها اندازه‌گیری شد و باقی‌مانده نمونه‌ها برای اندازه‌گیری پروتئین خام (CP)، الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF)، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)، خاکستر خام (Ash) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت خشک شدند (۱۳). برای اندازه‌گیری خاکستر خام نمونه‌ها با استفاده از آسیاب با توری یک میلی‌متری آسیاب شدند. نمونه‌های آسیاب‌شده در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفتند. ADF و NDF طبق روش ونسوست و همکاران (۳۶) اندازه‌گیری شد. پروتئین خام به وسیله میکروکلدال تعیین گردید (۲). جهت استخراج عصاره سیلاژ مقدار ۲۰ گرم نمونه در داخل یک مخلوط‌کن ریخته و به میزان ۱۸۰ سی سی آب مقطر به آن اضافه شد. مخلوط ایجاد شده از دو لایه صافی، عبور داده شد. عصاره صاف شده برای تعیین اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی مورد استفاده قرار گرفت. برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب از روش فنل سولفوریک استفاده شد (۱۱). به منظور اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل در سیلو از روش تقطیر شرح داده شده توسط مارخام (۲۵) استفاده شد. مقدار یک میلی‌لیتر اسید متافسفریک ۲۵ درصد (حجم/وزن) به ۵ میلی‌لیتر عصاره صاف شده جهت تعیین اسیدهای چرب فرار اضافه شد.

اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز: به منظور اندازه‌گیری تولید گاز از روش فدیوراک و هرودی (۱۲) استفاده شد. در این روش ابتدا مواد خوراکی (همه تیمارهایی آزمایشی) توسط آسیاب با قطر منافذ الک ۱ میلی‌متری به صورت یکنواخت آسیاب می‌شود. مقدار ۳۰۰ میلی گرم از هر تیمار آزمایشی آسیاب شده، با دقت توزین و به داخل شیشه‌های سرم استریل ۵۰ میلی‌لیتری منتقل گردید، برای هر نمونه ماده غذایی ۵ تکرار در نظر گرفته شد. مایع شکمبه ۲ ساعت بعد از وعده خوراک صبحگاهی از ۳ راس گوسفند فیستولا شده تهیه و پس از صاف نمودن توسط پارچه توری چهار لایه در داخل فلاسک در دمای ۳۹ درجه سریعاً به آزمایشگاه منتقل شد. قبل از انتقال مایع شکمبه به داخل شیشه‌های سرم، با بافر تهیه شده به روش مکدوگال (۲۶) به نسبت ۱ به ۲ (یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت بافر) مخلوط شد.

در هر شیشه حاوی ۳۰۰ میلی گرم از هر تیمار آزمایشی، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بافر افزوده شد و بعد از بی‌هوازی نمودن داخل شیشه با تزریق گاز دی‌اکسیدکربن درب شیشه‌ها توسط درپوش لاستیکی و درپوش فلزی، به طور محکم بسته شد. به منظور تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه تعداد ۵ عدد شیشه بدون ماده غذایی (بلانک) و دارای مایع شکمبه در نظر گرفته شد. کل شیشه‌ها جهت اندازه‌گیری گاز تولیدی به داخل دستگاه انکوباتور شیکر با ۱۲۰ دور در دقیقه و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، منتقل شده و عمل قرائت

Y_{ij} : مقدار هر مشاهده، μ : میانگین کل، T_j : اثر تیمار، e_{ij} : خطای آزمایشی.

نتایج و بحث

خصوصیات و ترکیبات شیمیایی یونجه قبل از سیلو کردن در جدول ۱ آمده است. اثر افزودن سطوح مختلف اسانس بذرکتان بر ترکیبات شیمیایی سیلاژ یونجه در جدول ۲ نشان داده شده است. داده‌های بدست آمده نشان می‌دهد که با افزودن اسانس بذرکتان در هر دو سطح ۶۰ و ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم به سیلاژ یونجه میزان pH سیلاژ را به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به شاهد کاهش داد. این کاهش pH به دلیل وجود باکتری‌های اسید لاکتیکی می‌باشد که تولید اسید لاکتیک در سیلاژ را افزایش داده و منجر به کاهش تولید اسید استیک و بوتیریک می‌گردند (۳۱). کاهش pH موجب کاهش عمل پروتئولیزها و آنزیم‌های گیاهی یا آنزیم‌های تنفسی می‌گردد، که از فساد سیلاژ و تبدیل پروتئین به نیتروژن آمونیاکی جلوگیری می‌کند. اثرات اسانس‌های گیاهی بر ماده خشک می‌تواند با توجه به منبع اسانس، اثرات متقابل و یا عادت‌پذیری جمعیت‌های میکروبی به اسانس‌های گیاهی متغیر باشد.

بررسی میزان ماده خشک نشان می‌دهد افزودن اسانس بذر کتان به سیلاژ یونجه بر میزان ماده خشک به طور قابل توجهی تأثیر گذاشت به طوری که در هر دو تیمار تلقیح شده با اسانس بذرکتان ماده خشک نسبت به شاهد افزایش یافته است. بیشترین میزان ماده خشک مربوط به سطح ۱۲۰ می‌باشد. ماده خشک سطح ۶۰ میلی گرم نیز افزایش معنی‌داری ($p < 0.05$) نسبت به شاهد داشت. افزایش در محتوای ماده خشک احتمالاً ناشی از محدود شدن رشد و توسعه گروه خاصی از میکروارگانیسم‌ها در سیلاژ و در نتیجه هدر رفت کمتر مواد مغذی سیلاژ باشد (۳۴).

یک روند افزایش برای پروتئین خام در مقایسه با شاهد وجود دارد. بیشترین افزایش مربوط به سطح ۱۲۰ میلی گرم اسانس می‌باشد که با شاهد تفاوت معنی‌داری دارد ($p < 0.05$). چاوز و همکاران (۷) با افزودن اسانس‌های گیاهی تغییری در پروتئین خام مشاهده نکردند که احتمالاً به دلیل مقدار استفاده و نوع سیلاژ مربوط می‌شود (۱۸). برخی از پژوهش‌های پیشین اثرات بازدارنده‌ی برخی از اسانس‌های گیاهی از جمله پونه را بر رشد کلستریدیها گزارش کردند (۲۰). این امر می‌تواند توجیه کننده افزایش پروتئین خام در سیلاژ حاوی اسانس باشد. حجت‌پناه و همکاران (۲۰۱۹) بیان نمودند که اسانس‌های نعناع و پونه در ۲ سطح ۱۲۰ و ۲۴۰ میلی گرم در هر کیلوگرم سیلاژ یونجه میزان پروتئین خام را نسبت به تیمار شاهد افزایش داد که با یافته‌های این آزمایش مطابقت دارد.

افزودن اسانس بذرکتان به سیلاژ یونجه اثر معنی‌داری ($p < 0.05$) بر نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد داشته است (جدول ۲). به طوری که در تیمار با سطح بالای اسانس

(۱۲۰ میلی گرم) میزان ازت آمونیاکی نسبت به شاهد پایین تر بود. فوسکولوس و همکاران (۱۴) کاهش در غلظت نیتروژن آمونیاکی را با استفاده از دوز بالای اسانس آویشن گزارش کردند. همچنین مکینتاش و همکاران (۲۷) نشان دادند که یک ترکیب تجاری اسانس‌های گیاهی حاوی تیمول در شرایط برون تنی باعث کاهش می‌شود.

نتایج نشان داد که مقدار کربوهیدرات‌های محلول در آب به طور معنی‌داری در تیمار سطح ۱۲۰ میلی گرم نسبت به بقیه تیمارها افزایش یافته است. کربوهیدرات‌های محلول در آب منبع اصلی انرژی برای میکروارگانیسم‌ها طی فرایند تخمیر در سیلاژ می‌باشد. کانکله و همکاران (۲۲) دریافتند که چنانچه مقدار کربوهیدرات‌های محلول در آب کمتر از ۸۰ گرم در کیلوگرم باشد، تهیه سیلاژ پایدار به سختی امکان پذیر است.

اثر سطوح مختلف اسانس بذر کتان روی قابلیت تولید گاز آزمایشگاهی در زمان‌های انکوباسیون سیلاژ یونجه در جدول ۳ آورده شده است. افزودن هر دو سطح اسانس بذر کتان در ساعت‌های مختلف انکوباسیون باعث کاهش گاز تولیدی نسبت به تیمار شاهد گردید. در مطالعه‌ای استفاده از عصاره رازیانه، میخک و سیر (۲۹) و همچنین اسانس دارچین (۱۵) باعث کاهش تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی شد. در یک مطالعه سطوح ۱۵ و ۲۵۰ میکرولیتر اسانس‌های رزماری، رازیانه و زنیان ثابت نرخ تولید گاز را افزایش دادند (۲۳). طالب‌زاده و همکاران (۳۵) با افزودن سطوح مختلف اسانس آویشن شیرازی (۰، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر) در شرایط آزمایشگاهی کاهش حجم گاز را در ساعت‌های مختلف انکوباسیون گزارش کردند. نتایج این آزمایش با نتایج آزمایش حجت‌پناه و همکاران (۱۹) و چاوز و همکاران (۷) موافق بود. اثرات استفاده از اسانس گیاهی آویشن به عنوان افزودنی برای تغییر تخمیر سیلاژ یونجه در نشخوارکنندگان به وسیله روش آزمایشگاهی نشان داد که اسانس آویشن میزان گاز تولیدی را نسبت به تیمار بدون افزودنی کاهش داد (۵). کاهش در تولید گاز می‌تواند به دلیل خاصیت ضد میکروبی برخی اسانس‌های روغنی گیاه مورد مطالعه باشد که با محدود کردن فعالیت میکروارگانیسم‌ها از تولید گاز جلوگیری می‌کند. این کاهش می‌تواند از جهت افزایش کارایی استفاده از خوراک مفید باشد زیرا اگرچه از یک سو نشان‌دهنده کاهش تخمیر مواد آلی است اما از سوی دیگر می‌تواند نشان‌دهنده حرکت مواد به سمت تولید پروتئین میکروبی باشد (۹، ۳۰). همچنین علاوه بر غلظت مصرف اسانس، نوع اسانس و نوع جیره نیز می‌تواند بر عملکرد اسانس بر میزان گاز تولیدی از شکمبه موثر باشد. اندازه‌گیری گاز تولید شده در شرایط برون تنی اطلاعات مفیدی را درباره سرعت و هضم خوراک فراهم می‌کند. منک و استینگاس (۲۸) گزارش کردند که همبستگی قوی بین مقدار انرژی متابولیسمی اندازه‌گیری شده، میزان گاز تولید شده در شرایط برون تنی با زمان‌های انکوباسیون ۴۸ ساعت و ترکیبات شیمیایی خوراک وجود دارد.

جدول ۱- خصوصیات و ترکیبات شیمیایی یونجه قبل از سیلو کردن بر اساس صد در صد ماده خشک

Table 1. Chemical composition of alfalfa before ensiling (%DM)

Item	ADF	NDF	WSC	ASH	CP	pH	DM
Alfalfa	۱۷±۱/۴۰	۳۴/۸±۱/۰۶	۳/۷۴±۰/۰۸۷	۱۱/۶±۰/۰۲۸	۱۹/۶±۰/۴۳۷	۶/۱۴±۰/۰۱۱	۲۲/۲±۰/۹۷۵

DM, dry matter; CP, crude protein; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; WCS: water soluble carbohydrate

جدول ۲- اثر افزودن اسانس بذر کتان روی خصوصیات شیمیایی سیلاژ یونجه پس از ۶۰ روز سیلو کردن (%DM)

Table 2. Effect of flaxseed essential oil on chemical properties of alfalfa silage after 60 d of ensiling (%DM)

Treatments ¹	Chemical composition ²										
	DM	NDF	ADF	WSC	tVFA	NH ₃ -N	CA	CP	LA	pH	EE
control	۲۴/۴۳ ^c	۴۹/۰.۶ ^a	۲۲/۶۶ ^a	۴/۰.۸ ^b	۱۲/۶۳ ^a	۸۴/۹۳ ^a	۱۱/۴. ^b	۱۱/۶۳ ^c	۶۹/۳۷ ^c	۴/۶۵ ^a	۴/۲۷ ^a
FSEO60	۲۶/۸۲ ^b	۴۳/۱.۶ ^b	۱۵/۳۳ ^b	۴/۰.۵ ^b	۱۲/۳۶ ^b	۸۳/۵۳ ^a	۱۰/۸۰. ^c	۱۲/۲۲ ^b	۷۱/۲۱ ^b	۳/۷۳ ^b	۴/۰.۷ ^{ab}
FSEO120	۳۰/۰.۲ ^a	۴۵/۱. ^{ab}	۲۳/۶۶ ^a	۴/۶. ^a	۱۲/۶. ^a	۷۲/۸. ^b	۱۲/۴۱ ^a	۱۲/۳۶ ^a	۷۴/۱۳ ^a	۳/۸۶ ^b	۳/۵۳ ^b
SEM	۰/۲۷۲	۱/۱۴۶۸	۰/۷۴۵۳	۰/۰.۲۳۸	۰/۰.۳۱۹	۰/۴۴۶۷	۰/۱۱۱۳	۰/۰.۴۵۰	۰/۱۷۳۵	۰/۰.۵۴۵	۰/۱۶۳۲
p-value	<۰/۰۰۰۱	۰/۰.۳۹	۰/۰.۱۴۶	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰.۱۳	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	<۰/۰۰۰۱	۰/۰.۴۵۷

Treatment¹-control: alfalfa silage without additives, FSEO60: alfalfa silage with 60 ml flaxseed essential oil/kg DM, FSEO120: alfalfa silage with 120 ml flaxseed essential oil/kg DM.

Chemical composition²: DM, dry matter; CP, crude protein; EE, ether extract; CA, crude ash; NDF, neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; NH₃-N: ammonium nitrogen (% of total nitrogen), tVFA: total volatile fatty acid (mmol/l), LA: Lactic Acid. WSC: water soluble carbohydrate.

Means within same column with different superscripts differ (p<0.05).

جدول ۳- اثر سطوح مختلف اسانس بذر کتان روی قابلیت تولید گاز آزمایشگاهی در زمانهای انکوباسیون سیلاژ یونجه (میلی لیتر بر گرم ماده خشک)

Table 3. The effect of different levels of flaxseed essential oil on *in vitro* gas production of alfalfa silage (ml/g DM)

Treatments ¹	Incubation times (h)											
	2	4	6	8	12	16	24	36	48	72	96	120
control	۱۷/۶۱ ^a	۳۲/۳۹ ^a	۴۰/۰۶ ^a	۵۱/۷۱ ^a	۶۵/۱۷ ^a	۸۲/۲۷ ^a	۱۰۳/۹۸ ^a	۱۱۱/۹۸ ^a	۱۲۳/۱۰ ^a	۱۳۰/۹۰ ^a	۱۳۴/۴۳ ^a	۱۳۶/۵۲ ^a
FSEO60	۱۴/۱۸ ^b	۲۷/۴۹ ^{ab}	۳۵/۰۵ ^b	۴۵/۲۷ ^b	۵۶/۰۱ ^b	۶۹/۱۸ ^b	۸۸/۶۹ ^b	۹۹/۵۵ ^b	۱۱۰/۲۸ ^b	۱۱۷/۷۲ ^b	۱۲۱/۸۰ ^b	۱۲۳/۴۳ ^b
FSEO120	۱۰/۹۹ ^c	۲۲/۸۰ ^b	۳۰/۵۳ ^b	۴۱/۹۲ ^b	۵۳/۰۵ ^b	۶۴/۴۲ ^b	۷۹/۳۳ ^c	۹۲/۵۹ ^c	۱۰۲/۷۸ ^b	۱۰۹/۵۱ ^c	۱۱۳/۷۱ ^c	۱۱۴/۸۰ ^c
SEM	۰/۹۸۹	۱/۶۲۵	۱/۴۶۸	۱/۵۶۰	۱/۵۵۵	۱/۷۴۰	۱/۸۴۹	۱/۹۳۷	۲/۵۷۵	۲/۶۴۸	۲/۴۰۵	۲/۴۰۶

Treatment¹-control: alfalfa silage without additives, FSEO60: alfalfa silage with 60 ml flaxseed essential oil/kg DM, FSEO120: alfalfa silage with 120 ml flaxseed essential oil/kg DM.

Means within same column with different superscripts differ (p<0.05).

جدول ۴- اثر سطوح مختلف اسانس بذر کتان روی فراسنجه‌های تولید گاز سیلاژ یونجه

Table 4. The effect of different levels of cinnamon essential oil on gas production parameters of alfalfa silage

Treatments ¹	Items ²									
	pH	NE _L	SCFA	ME	OMD	DOMD	tVFA	NH ₃ -N	b	c
control	۶/۶۰	۱/۲۷ ^a	۰/۱۵۳ ^a	۳/۲۳ ^a	۲۷/۲۳ ^a	۲۴/۰۱ ^a	۸/۶۳ ^a	۴۱/۲۲ ^b	۱۳۳/۳۶ ^a	۰/۰۵۹۴ ^a
FSEO60	۶/۵۹	۱/۲۱ ^a	۰/۱۳۳ ^a	۳/۱۴ ^a	۲۶/۹۱ ^a	۲۴/۳۵ ^a	۳/۰۰ ^b	۴۷/۹۱ ^b	۱۲۱/۸۰ ^b	۰/۰۵۴۲ ^{ab}
FSEO120	۶/۵۹	۱/۰۷ ^b	۰/۱۰۷ ^b	۲/۹۵ ^b	۲۵/۷۴ ^b	۲۲/۵۸ ^b	۸/۱۰ ^a	۵۰/۶۸ ^a	۱۱۳/۱۰ ^b	۰/۰۵۲۲ ^b
SEM	۰/۰۴۷	۰/۰۳۲	۰/۰۰۷۵	۰/۰۴۶	۰/۰۳۰۵	۰/۲۵۲	۰/۴۵۷	۰/۵۱۳	۲/۵۹۲	۰/۰۰۲
p-value	۰/۹۹۸	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۸	۰/۰۱۱۸	۰/۰۰۰۸	<۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۱	۰/۰۰۵	۰/۰۷۶۳

Treatment¹-control: alfalfa silage without additives, FSEO60: alfalfa silage with 60 ml flaxseed essential oil/kg DM, FSEO120: alfalfa silage with 120 ml flaxseed essential oil/kg DM.

²ME: metabolizable energy (MJ/Kg DM); SCFA: short chain fatty acid (mmol/ 0.2 g DM); DOMD: digestible organic matter in dry matter (%); NE_L: net energy lactation (MJ/Kg DM); tVFA: total volatile fatty acids (mmol/l); NH₃-N: ammonium nitrogen (mg/l); OMD: organic matter digestibility (%); b: Potential gas production (mL/g DM); c: Rate constant of gas production during incubation (mL/h).

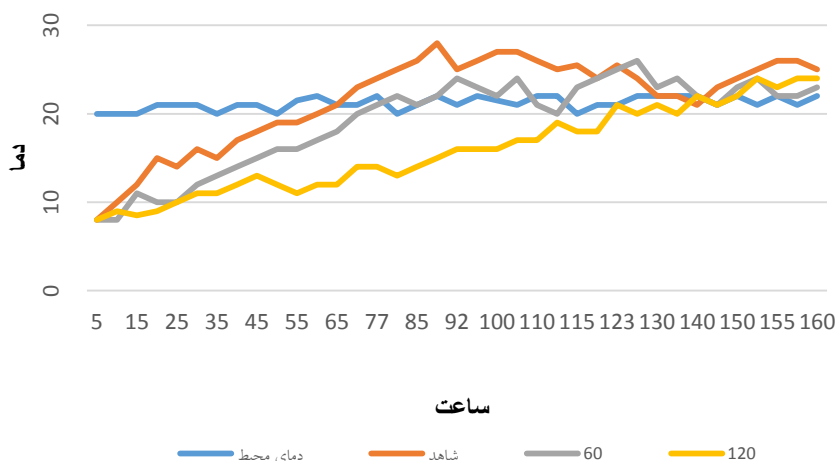
Means within same column with different superscripts differ (p<0.05).

۴۷/۹۱ میلی گرم کاهش پیدا می کند که نسبت به شاهد (۴۱/۲۲) افزایش پیدا کرده است. هارت و همکاران (۱۸) با استفاده از محیط کشت حاوی مجموعه ای از میکروارگانیسم های شکمبه نشان دادند لیمون، تیمول، وانیلین، گویاکول و نیز عصاره پونه کوهی غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه را کاهش دادند. بروچرز (۴) نشان داد که افزودن تیمول به مایع شکمبه منجر به انباشتگی اسیدهای آمینه و کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گشت. وی پیشنهاد کرد که ترکیب فوق مانع از دی آمیناسیون اسیدهای آمینه توسط باکتری های شکمبه می گردد. به نظر می رسد که چون اسانس های گیاهی اثرات ممانعت کننده بر پرتولیز و دی آمیناسیون دارند، احتمالاً اثرات ممانعت کننده آن ها بر

اثر سطوح مختلف اسانس بذر کتان روی فراسنجه های تولید گاز سیلاژ یونجه در جدول ۴ نشان داده شده است. بیشترین و کمترین میزان اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، ماده آلی قابل هضم در ماده خشک در بین تیمارهای دارای اسانس، به ترتیب در سطح ۶۰ و سطح ۱۲۰ میلی گرم مشاهده شد. میزان اسیدهای چرب فرار کل به طور معنی داری در سطح ۱۲۰ نسبت به شاهد افزایش یافته است ولی در سطح ۶۰ میلی گرم در کیلوگرم کاهش پیدا کرده است ($p < 0.05$). میزان نیتروژن آمونیاکی در این آزمایش با افزایش میزان سطح اسانس افزایش یافته است به طوری که در سطح ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن تر یونجه ۵۰/۶۸ میلی گرم به ازای هر لیتر مایع شکمبه می باشد که در سطح ۶۰ میلی گرم به میزان

می‌تواند به دلیل فعالیت ضد میکروبی و اثر مهارکنندگی برخی از اسانس‌ها که با مهار دامیناسیون و پروتئولیز (۱۹) از فساد سیلاژ جلوگیری می‌کند، باشد. در معرض هوا قرار گرفتن سیلاژها ممکن است منجر به فساد سیلاژ شود. افزایش دما، حاصل متابولیسم اسیدهای آلی و مواد مغذی باقیمانده توسط میکروارگانیسم‌های هوازی می‌باشد. تغییرات در دما می‌تواند به عنوان شاخصی از توسعه فساد هوازی سیلاژها باشد. انتظار می‌رود با کاهش سریع pH در طول مراحل اولیه سیلو شدن، از رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب سیلویی مانند انتروباکترها و مخمرها جلوگیری شود. چاوز و همکاران (۷) گزارش کردند که افزودن اسانس‌های گیاهی با سطح ۱۲۰ میلی گرم به ازای کیلوگرم ماده خشک سیلاژ جو، باعث حفظ پایداری هوازی سیلاژ تا دو هفته نسبت به تیمار شاهد شد. در مطالعه‌ای با افزودن ۳ اسانس گیاهی مختلف (برگ دارچین، پونه کوهی و پرتقال شیرین در سطح ۱۲۰ میلی گرم بر کیلوگرم ماده خشک) به سیلاژ جو باعث افزایش ثبات هوازی نسبت به تیمار شاهد گردید که موافق با داده‌های این آزمایش بود (۷). در آزمایش حجت‌پناه و همکاران (۱۹) با افزودن اسانس‌های گیاهی مختلف (پونه، آویشن، زیره و دارچین) به سیلاژ ذرت افزایش میزان ثبات هوازی سیلاژها را مشاهده کردند. در آزمایش دیگری افزودن یک ترکیب از اسانس‌های گیاهی مختلف برای تغییر تخمیر سیلاژ ذرت تأثیری بر روی مخمر، قارچ و انتروباکتری نداشت در نتیجه ثبات هوازی نسبت به تیمار شاهد تغییری پیدا نکرد (۲۱). به طور کلی تأثیر افزودنی اسانس را بر بهبود پایداری هوازی می‌توان توسط مهار رشد مخمر، قارچ و کپک و همچنین کاهش نرخ دامیناسیون توضیح داد.

فعالیت‌های پروتولایتیکی باعث کاهش تجزیه پروتئین سیلاژ شده و در نتیجه باعث کاهش نیتروژن آمونیاکی نیز می‌شود. قابلیت هضم ماده آلی، اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و انرژی قابل متابولیسم به وسیله سطح ۱۲۰ میلی گرم اسانس بذر کتان کاهش پیدا کرده‌اند. میزان pH در طی انکوباسیون با افزایش سطح اسانس کاهش یافته است. فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در مقابل طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان داده شده است که به تعدادی از ترکیبات فنولیک و ترپنوئید (۶) اجزای شیمیایی و گروه‌های ساختاری موجود در اسانس‌های گیاهی، نسبت‌های موجود در آنها و اثرات متقابل بین آنها، مربوط می‌شود (۱۰). اسانس‌های گیاهی، به علت ماهیت هیدروفوبیک‌شان (آبگریزشان)، نزدیکی بالایی به لیپیدهای غشای سلول باکتریایی دارند و ویژگی‌های ضد باکتریایی آنها احتمالاً به ماهیت هیدروفیلیک (چربی دوست) آنها برمی‌گردد. این مکانیسم به ویژگی‌های لیپوفیلیک اجزای تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی و توانایی گروه عاملی آنها بستگی دارد (۱۰). اسانس‌های گیاهی به طور انتخابی از عمل تعدادی از پروتوزوئرها جلوگیری می‌کنند و تولید گاز متان را کاهش می‌دهند، به دلیل اینکه پروتوزوئرها شکمبه محیط مناسبی را برای متانوژن‌هایی که در شکمبه زیست می‌کنند، فراهم می‌کنند (۳). نتایج نشان داده شده در نمودار ۱ نشان می‌دهد تیمارهای تلقیح شده با اسانس بذرکتان در سطح ۱۲۰ با ۱۵۲/۶۶ ساعت به طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد (۷۷ ساعت) زمان طولانی‌تری برای افزایش ۲ درجه سانتی‌گرادی در دمای اولیه سیلاژ داشت. افزایش میزان پایداری هوازی در تیمارهای افزوده شده اسانس گیاهی



شکل ۱- اثر اسانس بذر کتان بر پایداری هوازی سیلاژ یونجه.
Figure 1. Effects of flaxseed essential oil on aerobic stability of alfalfa silage

کربوهیدرات محلول در آب را افزایش داد. افزودن اسانس بذر کتان باعث کاهش تولید گاز گردید. در کل داده‌های به دست آمده از این تحقیق نشان داد که اسانس بذر کتان بر کیفیت سیلاژ و خصوصیات تخمیری آن اثر مثبت دارد.

اسانس بذرکتان تأثیر معنی‌داری بر روی ازت آمونیاکی و پروتئین خام داشت، به طوری که باعث کاهش میزان ازت آمونیاکی و افزایش پروتئین خام نسبت به شاهد می‌شود. سطوح مختلف اسانس میزان pH را به طور قابل توجهی کاهش داد، همچنین میزان اسیدهای چرب فرار را کاهش و

منابع

- Adesogan, A.T., N. Krueger, M.B. Salawu, D.B. Dean and C.R. Staples. 2004. The influence of treatment with dual purpose bacterial inoculants or soluble carbohydrates on the fermentation and aerobic stability of Bermuda grass. *Journal of Dairy Science*, 87: 3407-3416.
- Association of official Analytic chemists (AOAC). 2002. Official method of analytic. 17th ed. AOAC, Arlington, VA, 1: 120-155.
- Benchaar, C., T.A. McAllister and P.Y. Chouinard. 2008. Digestion, ruminal fermentation, ciliate protozoal populations and milk production from dairy cows fed *Cinnamaldehyde*, *Quebracho Condensed Tannin*, or *Yucca schidigera Saponin* Extracts. *Journal of Dairy Science*, 91: 4765-4777.
- Brochers, R. 1965. Proteolytic activity of rumen fluid in vitro. *Journal of Animal Science*, 24: 1033-1038.
- Calsamiglia, S., M. Busquet, P.W. Cardozo, L. Castillejos and A. Ferret. 2007. Invited Review: Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *Journal of Dairy Science*, 90: 2580-2595.
- Chaves, A.V., K. Stanford, E.R. Dugan, L.L. McGibson, T.A. McAllister, F. Van Herk and C. Benchaar. 2008. Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Livestock Production Science*, 117: 215-224.
- Chaves, A.V., J. Baah, Y. Wang, T.A. McAllister and C. Benchaar. 2012. Effects of cinnamon leaf, oregano and sweet orange essential oils on fermentation and aerobic stability of barley silage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92: 906-915.
- Curtis, J.L. 1996. Effect of variety on the forage yield, ensiling characteristics, and nutritive value of alfalfa and effects of cutting, stage of maturity, and silage additives on the preservation and nutritive value of alfalfa silage. a dissertation. Kansas state university. Department of animal Sci and industry collage of agriculture.
- Davidson, P.M. and A.S. Naidu. 2000. Phyto-phenols. In *Natural Food Antimicrobial Systems*. A.S. Naidu, ed. CRC Press, Boca Raton, FL, 265-293.
- Dorman, H.J.D. and S.G. Deans. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 308-316.
- Dubios, A., M.K.A. Giles, J.K. Hamilton, P.A. Ronerts and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Fedorak, P.M. and D.E. Hurdy. 1983. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. *Environmental Technology*, 4: 425-432.
- Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 86: 3575-3581.
- Foskolos, A., S. Cavini, M. Rodriques-Prado, A. Ferret and S. Calsamiglia. 2010. A screening test of the use of essential oils compounds on ryegrass silage for preventing nitrogen losses in sustainable dairy production systems. 3rd EAAP international symposium on energy and protein metabolism and nutrition. Parma, Italy, 451-452.
- Fraser, G.R., A.V. Chaves, Y. Wang, T.A. McAllister, K.A. Beauchemin and C. Benchaar. 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.
- Gershenzon, J. and R. Croteau. 1991. Terpenoids. In *Herbivores: Their interactions with secondary metabolites*. Vol. 1. G. A. Rosenthal, and M. R. Berenbaum, ed. Academic Press, San Diego, CA, 1: 165-219.
- Guler, T. 2001. Silage and use of animal nutrition. Conferences. Firat University Veterinary Faculty Publication. Elazig, TURKEY, 27-36.
- Hart, K.J., D.R. Yanez-Ruiz, S.M. Duval, N.R. McEwan and C.J. Newbold. 2008. Plant extracts to manipulate rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology*, 147: 8-35.
- Hodjatpanah-Montazeri, M., N. Danesh Mesgaran and A. Vakili. 2016. Effect of essential oils of various plants as microbial modifier to alter corn silage fermentation and in vitro methane production. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 6(2): 269-276 (In Persian).

20. Ismaiel, A. and M. D. Pierson. 1990. Inhibition of growth and germination of *C. botulinum* 33A, 40B, and 1623E by essential oil of species. *Journal of Food Science*, 55: 1676-1678.
21. Kung, Jr.L., P. Williams, R.J. Schmidt and W. Hu. 2008. A blend of essential plant oils used as an additive to altern silage fermentation or used as a feed additive for lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 4793-4800.
22. Kunkle, W.E., C.G. Chambliss, A.T. Adesogan and M.B. Adjei. 2006. Silage harvesting, Storing and Feeding. University of Florida Online. Available: <http://edis.lfas.ufl.edu/publication.html>.
23. Maghsoudloo, F., J. Bayatkouhsar, F. Ghanbari and F. Taliea. 2017. Effect of Bacterial Inoculation and Essential Oils of Rosemary, Fennel and Carum Copticum as Additive on Fermentation Process, Microbial Population and Nutritional Value of Corn Silage. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 8(4): 553-568 (In Persian).
24. Makkar, H.P.S. 2004. Recent advances in the in vitro gas method for evaluation of nutritional quality of feed resources. Assessing quality and safety of animal feeds. *FAO Animal Production and Health Series*, 160: 55-88.
25. Markham, R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis. *Biochemistry Journal*, 36: 790.
26. McDougall, E.E.I. 1984. The composition and output of sheep in salvia. *The Biochemical Journal*, 43(1): 99-109.
27. McIntosh, F.M., P. Williams, R. Losa, R.J. Wallace, D.A. Beever and C.J. Newbold. 2003. Effects of essential oils on ruminal microorganisms and their protein metabolism. *Applied Environmental Microbiology*, 69: 5011-5014.
28. Menke, K.H.L. and H.H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Journal of Animal Research and Development*, 28: 7-55.
29. Patra, K., D.N. Kamra and N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology*, 128: 276-291.
30. Reuter, H.D., J.P. Koch and L. Lawson. 1996. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. Pages 135–212 in *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species*. H.P. Koch and L.D. Lawson. Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
31. Rowghani, E.1., M.J.1. Zamiri, M. Khorvash and A.1. Abdollahipanah. 2008. The effects of *Lactobacillus plantarum* and *Propionibacterium acidipropionici* on corn silage fermentation, ruminal degradability and nutrient digestibility in sheep. *Journal of Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 263-267.
32. SAS. 2002. Statistical Analysis Systems. Version 9. SAS Institute, Cary, NC, USA.
33. Sayyah, M., S. Moaied and M. Kamalinejad. 2005. Anticonvulsant activity of *Heracleum persicum* seed, *J. Ethnopharmacol.* Apr 8; 98(1-2): 209-11.
34. Selwet, M. 2009. Effect of propionic and formic acid mixtures on the fermentation, fungi development and aerobic stability of maize silage. *Polish Journal of Agronomy*, 1: 37-42.
35. Talebzadeh, R., D. Alipour, M.J. Saharkhiz, A. Azarfar and M. Malecky. 2012. Effect of essential oils of *Zataria multiflora* on *in vitro* rumen fermentation, protozoal population, growth and enzyme activity of anaerobic fungus isolated from Mehraban sheep. *Animal Feed Science Technology*, 172: 115-124.
36. Van Soest, P.J., J.B. Robertson and B.A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583.
37. Woods, V.B. and A.M. Fearon. 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: a review. *Livestock Science*, 126(1-3): 1-20.

The Effect of Adding Different Levels of Flaxseed Essential Oil to Alfalfa Silage on Chemical Composition and *In Vitro* Fermentation Characteristics

Maghsoud Besharati¹, Maasoumeh Niazi², Zabihollah Nemati³, Amir Karimi⁴
and Mohammadreza Sheikhloo⁴

1- Associate Professor Professor, University of Tabriz, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources,
Department of Animal Science (Corresponding author: m_besharati@hotmail.com)

2- MSc. of Animal Nutrition, University of Tabriz, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Resources, Department
of Animal Science

3 and 4- Associate Professor and Assistant Professor, University of Tabriz, Ahar Faculty of Agriculture and Natural
Resources, Department of Animal Science

Received: October 18, 2019 Accepted: February 29, 2020

Abstract

This experiment was conducted to investigate the effects of flaxseed essential oil (0, 60 or 120 mg/kg) on chemical composition, aerobic stability, and *in vitro* gas production of alfalfa silage. Experimental treatments include: alfalfa treatment without additive (control), alfalfa with 60 mg/kg flaxseed oil and alfalfa with 120 mg/kg flaxseed essential oil, which were kept at room temperature for 60 days. After opening the silos, gas production was measured by *in vitro* method with 5 replications at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 hours. The data were analyzed in a completely randomized design. Addition of flaxseed essential oil at both levels (60 and 120 mg/kg) to alfalfa silage significantly reduced silage pH compared to control ($p < 0.05$). Addition of essential oil to alfalfa silage had a significant effect on the dry matter content, so that in the supplemented treatment with 120 mg/kg, dry matter was increased (30.02%) compared to the control (24.43%). Adding flaxseed essential oil (120 mg/kg) to alfalfa silage increased crude protein (12.36%) and water soluble carbohydrate (4.61%) contents ($p < 0.05$). Addition flaxseed essential oil at 60 and 120 mg concentrations to alfalfa silage significantly reduced ($p < 0.05$) ammonia nitrogen compared to control treatment. Both levels of 60 and 120 mg of flaxseed essential oil reduced gas production volume compared to control ($p < 0.05$). Overall, the data indicate a positive effect of flaxseed essential oil on alfalfa silage quality and its fermentation properties.

Keywords: Aerobic Stability, Alfalfa Silage, Essential Oils, Flaxseed, *In Vitro* Gas Production