



Research Paper

Evaluating the Potential of Microalgae (*Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus obliquus*) to Mitigate Methane Production and Modulate In Vitro Rumen Fermentation Characteristics

Khadijeh Abyar^{*1}, Seyyed Ehsan Ghiasi², Moslem Bashtani³, Yaser Feizdar Barabadi⁴, Reza Khoatab⁵

1-Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail:

khadijeh.abyar@birjand.ac.ir,  0009-0001-5541-8223

2- Animal Science Department, Environmental stress in Animal Science research group, Animal Science Department, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, I.R. Iran, s.e.ghiasi@birjand.ac.ir,

 0000-0003-3017-0820

3- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. mbashtani@birjand.ac.ir

,  0000-0002-5390-5474

4-Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Khorasan Razavi Province, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran, y.feizdar@areeo.ac.ir,  0000-0002-1312-4825

5-Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran. E-mail:

rezaakhootab@gmail.com,  0009-0009-7180-363x

Article Info

Article type:
Research Article

Article history:
Received: 25 April 2026
Accepted: 17 June 2026
Published online: Spring 2026

Keywords: Degradability,
Methane production,
Microalgae, Rumen
fermentation, Ruminants

ABSTRACT

This study aimed to compare the nutritional value of different microalgae species and to evaluate their inclusion effects in the diet of Saanen goat kids on in vitro rumen fermentation parameters and dry matter degradability. A gas production experiment was conducted in a 3×4 factorial arrangement using three microalgae species (*Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus obliquus*) at four inclusion levels (0, 1, 2, and 3%), resulting in 12 treatments with 15 replicates. Gas production was measured from 2 to 120 h, and pH, ammonia nitrogen (NH₃-N), dry matter degradability (DMD), and methane were determined at 8, 12, and 24 h of incubation. The results showed that *Spirulina* and *Chlorella* had the highest crude protein content, while *Spirulina* exhibited the greatest carotenoid content and antioxidant capacity ($P<0.05$). In contrast, *Scenedesmus* had the highest ether extract and chlorophyll b ($P<0.05$). A significant interaction between microalgae species and inclusion level was observed for gas production parameters ($P<0.05$), with increasing inclusion levels enhancing gas production. Dry matter degradability at 24 h was significantly affected ($P<0.05$), with *Spirulina* showing the highest and *Chlorella* the lowest values; however, DMD decreased with increasing inclusion levels. Ammonia nitrogen concentration at 24 h decreased with increasing microalgae levels ($P<0.05$), which suggests a potential improvement in nitrogen utilization efficiency. The partitioning factor was also affected, whereas methane production was not significantly influenced ($P>0.05$). Overall, rumen fermentation responses were dependent on microalgae species and inclusion level, suggesting their potential as targeted feed additives.

Cite this article: Mohammadian, H., Fathi Nasri, M.H., & Mojtahedi, M. (2026). Evaluating the Potential of Microalgae (*Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Scenedesmus obliquus*) to Mitigate Methane Production and Modulate In Vitro Rumen Fermentation Characteristics. *Journal of Livestock Research*, 8 (1), 51-68. DOI: 10.22077/jlr.2026.11951.1067

DOI: <https://doi.org/10.22077/jlr.2026.11951.1067>

Publisher: The University of Birjand Press.

Extended Abstract**Introduction**

In response to the global reduction in antibiotic use in animal feed, there is growing interest among animal nutritionists in functional feed additives aimed at enhancing animal and human health. The application of bioactive compounds in the diets of livestock, poultry, and aquaculture species is steadily increasing. These additives can promote the development of high-quality, environmentally sustainable feeds in agricultural systems. Algae, as a diverse group of aquatic photosynthetic organisms, are broadly categorized into macroalgae (seaweeds) and microalgae, which include both unicellular and filamentous species. In Iran, various species of microalgae have been identified, among which *Chlorella*, *Spirulina*, and *Scenedesmus* are of particular significance. These microalgae possess considerable potential in enhancing the nutrition of livestock, poultry, and aquaculture species due to their rich content of nutrients such as high-quality proteins, essential fatty acids, vitamins, minerals, and antioxidants. Given that each species exhibits distinct nutritional and functional characteristics, precise identification and comprehensive analysis of their chemical composition are essential for their effective incorporation into animal diets. Moreover, the diverse climatic conditions across Iran provide a favorable basis for the cultivation and industrial utilization of these microalgae, which can contribute to improving animal health, performance, and productivity. The aim of this study was to compare the nutritional value of different microalgae species and to evaluate the effects of their inclusion in the diet on ruminal fermentation parameters and *in vitro* degradability.

Method

After obtaining *Chlorella*, *Spirulina*, and *Scenedesmus* microalgae, their nutritional value was determined using standard methods. The gas production test was conducted in two separate runs with 12 treatments, including: Treatment 1: basal diet + 0% *Spirulina*, Treatment 2: basal diet + 0% *Chlorella*, Treatment 3: basal diet + 0% *Scenedesmus*, Treatment 4: basal diet + 1% *Spirulina*, Treatment 5: basal diet + 1% *Chlorella*, Treatment 6: basal diet + 1% *Scenedesmus*, Treatment 7: basal diet + 2% *Spirulina*, Treatment 8: basal diet + 2% *Chlorella*, Treatment 9: basal diet + 2% *Scenedesmus*, Treatment 10: basal diet + 3% *Spirulina*, Treatment 11: basal diet + 3% *Chlorella*, and Treatment 12: basal diet + 3% *Scenedesmus*. The experiment was conducted in a 4 × 3 factorial design. Rumen fluid was collected from two Holstein cows and mixed with artificial saliva at a ratio of 1 part rumen fluid to 2 parts saliva. Gas production was recorded with five replicates per treatment at incubation times of 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96, and 120 hours. Additionally, for the measurement of pH, ammonia nitrogen (NH₃-N), dry matter degradability (DMD), and methane production, three replicates per treatment were removed from the water bath at 8, 12, and 24 hours. Ammonia nitrogen concentration (mg/dL) was determined using the phenol-hypochlorite reagent. For dry matter determination, samples were dried in an oven at 70°C for 24 hours, and dry matter disappearance was calculated based on the weight difference before and after drying. To measure methane production, 4 mL of 10 M sodium hydroxide was injected into the septum of the vials. Differences among treatment means were analyzed using Tukey-Kramer's test at a 5% significance level.

Results

The results showed that there was a significant difference between different microalgae in terms of crude protein percentage, fiber composition and ash ($P < 0.05$). The results showed significant differences among microalgae species in chemical composition and bioactive compounds ($P < 0.05$). *Spirulina* and *Chlorella* had the highest crude protein content, indicating their superior nutritional value as protein sources. In addition, *Spirulina* exhibited the highest carotenoid content and antioxidant capacity, highlighting its stronger functional and antioxidative properties. In contrast, *Scenedesmus* showed the highest ether extract and chlorophyll *b* content, reflecting higher lipid fraction and differences in pigment composition compared with the other species. A significant interaction between the type and level of microalgae on gas production, gas production potential at $T_{0.5}$ and time to reach half the gas production potential was observed ($P < 0.05$); so that increasing the level of microalgae increased gas production. The degradability of total dry matter at level 1% was higher than that of 3% microalgae ($P < 0.05$). Also, increasing the level of microalgae caused a decrease in the concentration of ammonia nitrogen ($P < 0.05$) and a decreasing trend in methane production.

Conclusions

Overall, microalgae can be considered as potential feed supplements with favorable nutritional value in ruminant diets; however, their varying chemical composition may influence rumen fermentation processes.

Author Contributions

Khadijeh Abyar: Sample preparation, conducting experiments, data collection, statistical analysis, interpretation of data and results, drafting the manuscript. Seyed Ehsan Ghiasi: Study design, supervision of the research process, reviewing and validating the results, editing, revising, and finalizing the manuscript. Moslem Bashtani: Contribution to study design, statistical data analysis, research supervision, manuscript review and revision. Yaser Feizdar Barabadi: Contribution to study design, statistical data analysis, research supervision, manuscript review and revision. Reza khoatab: Contribution to study design

Data Availability Statement

Data available on request from the authors.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the support and collaboration of Parsian Microalgae Knowledge-Based Company and the Environmental Stress Research Group in Animal Science at the University of Birjand. Their valuable scientific and technical assistance significantly contributed to the completion of this research. The authors also extend their gratitude to all individuals who participated in this study.

AI Tools

The authors would like to acknowledge the use of AI tools for language editing and proofreading or data analysing, chatgpt in this manuscript.

مقاله پژوهشی

اثرات سطوح مکمل سازی اسپیرولینا (*Spirulina platensis*)، کلرلا (*Chlorella vulgaris*) و سندسموس اُبلیکوئوس (*Scenedesmus Obliquus*) بر تخمیر برون تنی شکمبه

خدیدجه آبیاری^{۱*}، سید احسان غیائی^۲، مسلم باشتنی^۳، یاسر فیض دار برآبادی^۴، رضا خوطبع^۵

۱- دانشجوی دکترای تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. نویسنده مسئول رایانامه: khadijeh.abyar@birjand.ac.ir

۲- دانشیار تغذیه دام، گروه علوم دامی تنش های محیطی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

۳- استاد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: mbashtani@birjand.ac.ir

۴- مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. رایانامه:

y.feizdar@areeo.ac.ir

۵- دانشجوی کارشناسی علوم دام، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران. رایانامه: Rezaakhootab@gmail.com

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقاله پژوهشی

این مطالعه با هدف مقایسه ارزش غذایی گونه های مختلف ریز جلبک و بررسی اثر گنجاندن آن ها در جیره بزغاله های سانن بر فراسنجه های تخمیر شکمبه ای و تجزیه پذیری برون تنی انجام شد. آزمایش تولید گاز به صورت فاکتوریل 4×3 با سه گونه ریز جلبکی (اسپیرولینا پلاتنسیس، کلرلا ولگاریس و سندسموس اُبلیکوئوس) و چهار سطح (۰، ۱، ۲ و ۳ درصد) در قالب 12×15 تکرار اجرا گردید. گاز تولیدی در زمان های ۲ تا ۱۲۰ ساعت اندازه گیری شد و pH ، نیتروژن آمونیاکی، تجزیه پذیری ماده خشک و متان در ساعات ۸، ۱۲ و ۲۴ تعیین شدند. نتایج نشان داد که اسپیرولینا و کلرلا دارای بیشترین پروتئین خام بوده و اسپیرولینا بالاترین میزان کاروتنوئید و ظرفیت آنتی اکسیدانی را داشت ($P < 0.05$)، در حالی که سندسموس بیشترین چربی خام و کلروفیل b را نشان داد ($P < 0.05$) اثر متقابل گونه و سطح ریز جلبک بر پارامترهای تولید گاز معنی دار بود ($P < 0.05$) و افزایش سطح مصرف موجب افزایش تولید گاز شد. تجزیه پذیری ماده خشک در ۲۴ ساعت تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P < 0.05$)، به طوری که اسپیرولینا بیشترین و کلرلا کمترین مقدار را داشت، اما با افزایش سطح مصرف کاهش یافت. غلظت نیتروژن آمونیاکی در ۲۴ ساعت با افزایش سطح ریز جلبک کاهش یافت ($P < 0.05$) که نشان دهنده بهبود بالقوه کارایی مصرف نیتروژن باشد. فاکتور تسهیم نیز تحت تأثیر قرار گرفت، در حالی که تولید متان تغییر معنی داری نداشت ($P > 0.05$) در مجموع، پاسخ های تخمیر شکمبه ای وابسته به نوع و سطح ریز جلبک بود و هر گونه می تواند به عنوان افزودنی خوراکی هدفمند مورد استفاده قرار گیرد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۲/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۳/۲۷

تاریخ انتشار: بهار ۱۴۰۵

واژگان کلیدی:

تخمیر شکمبه، تولید متان،

ریز جلبک ها، میزان تجزیه پذیری،

نشخوارکنندگان

استناد: آبیاری، خدیده؛ غیائی، سید احسان، باشتنی، مسلم، فیض دار برآبادی، یاسر و خوطبع، رضا (۱۴۰۵). اثرات سطوح مکمل سازی اسپیرولینا (*Spirulina platensis*)، کلرلا (*Chlorella vulgaris*) و سندسموس اُبلیکوئوس (*Scenedesmus Obliquus*) بر تخمیر برون تنی شکمبه. *مجله تحقیقات دام و طیور*، دوره ۸، شماره ۱، ۶۸-۵۱.

DOI: 10.22077/jlr.2026.11951.1067

DOI: <https://doi.org/10.22077/jlr.2026.11951.1067>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه بیرجند

مقدمه

باتوجه به نگرش چندین کشور مبنی بر کاهش افزودن آنتی‌بیوتیک در خوراک دام، تمایل متخصصین علم تغذیه نسبت به افزودنی‌های خوراکی با هدف بهبود سطح سلامت حیوانات و متعاقباً انسان افزایش یافته است. استفاده از افزودنی‌های فعال زیستی در تغذیه دام، طیور و آبزیان در حال گسترش است. این مکمل‌ها می‌توانند در حوزه کشاورزی، به دستیابی خوراک‌های باکیفیت بالا و سازگار با محیط‌زیست کمک کنند (Buryakov et al., 2023). جلبک‌ها به‌عنوان یکی از منابع خوراکی جدید مطرح می‌شوند. جلبک‌ها از دسته گیاهان ناهمگنی بوده که دارای طبقه‌بندی پیچیده و بحث‌برانگیز هستند (Nasehi et al., 2019). بهبود تخمیر شکمبه‌ای یکی از مهم‌ترین اهداف استفاده از افزودنی‌های خوراکی در تغذیه نشخوارکنندگان است؛ زیرا کارایی این فرآیند تأثیر مستقیمی بر هضم مواد مغذی، تأمین انرژی و عملکرد تولیدی حیوان دارد. در این زمینه، ریزجلبک‌ها به‌عنوان منابع نوین خوراکی، به دلیل برخورداری از ترکیبات زیست‌فعال مانند اسیدهای چرب چندغیراشباع، پروتئین‌های باکیفیت، پلی‌ساکاریدها و مواد آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت بالایی برای تعدیل فرآیند تخمیر شکمبه‌ای دارند (Rabee et al., 2022). ریزجلبک‌هایی مانند *Spirulina* و *Chlorella* می‌توانند حاوی حدود ۵۰ تا ۷۰ درصد پروتئین (بر اساس ماده خشک) باشند. علاوه بر پروتئین، این جلبک‌ها منبعی غنی از اسیدهای چرب ضروری امگا-۳ (ALA, EPA و DHA)، طیف گسترده‌ای از ویتامین‌ها (A, B, C, D, E و K) و ترکیبات زیست‌فعال ارزشمند مانند آستاگزانتین، فوکوئیدان و فیکوسیانین هستند که نقش مهمی در بهبود عملکرد فیزیولوژیک و سلامت حیوانات ایفا می‌کنند (Kazemi, 2025).

مطالعات گزارش کرده‌اند که زیست‌توده جلبک‌ها به‌عنوان یک منبع بالقوه در تغذیه دام می‌تواند نقش‌های تغذیه‌ای متعددی از جمله تأمین پروتئین (Becker, 2007; Lamminen et al., 2019)، انرژی (Van Emon et al., 2015)، چربی (Till et al., 2019) و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی ایفا کند. با توجه به اینکه انجام آزمایش‌های درون‌تنی (*in vivo*) هزینه‌بر و وقت‌گیر است، مطالعات برون‌تنی (*in vitro*) به‌عنوان یک روش کاربردی برای بررسی اولیه گونه‌های مختلف ریزجلبک، سطوح مختلف مصرف و همچنین برهم‌کنش آن‌ها با جیره پایه مورد استفاده قرار می‌گیرند. با وجود پتانسیل تغذیه‌ای بالای ریزجلبک‌ها، یافته‌های مطالعات مختلف در خصوص اثرات آن‌ها بر پارامترهای تخمیر برون‌تنی همسو نبوده و شامل افزایش، کاهش یا عدم تغییر در این شاخص‌ها گزارش شده است (Kiani et al., 2020; Sucu, 2020). به‌گونه‌ای که برخی گونه‌ها، مانند *Tetracystis sp.* کاهش بیشتری در تولید متان ایجاد کردند، در حالی که گونه‌ای مانند *Micractinium reisseri* با افزایش تولید گاز همراه بود (Anele et al., 2016). در مطالعه‌ای دیگر، اثر سه ریزجلبک شامل *Nannochloropsis*، *Phaeodactylum tricornutum* و *Schizochytrium sp.* در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که این منابع ریزجلبکی می‌توانند برخی شاخص‌های تخمیر مانند تولید اسیدهای چرب فرار و فراوانی پروتوزوآها را تحت تأثیر قرار دهند؛ با این حال، اثر معنی‌دار بر تولید متان مشاهده نشد (Kiani et al., 2020). در مطالعه‌ای با *Isochrysis galbana*، این ریزجلبک در سطوح مختلف (۰ تا ۵ درصد ماده خشک جیره) به محیط تخمیر افزوده شد. نتایج نشان داد که با افزایش سطح مصرف، به‌ویژه در ۴ و ۵ درصد، تولید متان به‌طور قابل‌توجهی کاهش یافت (۱۸/۴ و ۲۳/۲ درصد). علاوه بر این، در سطوح بالاتر، کاهش در تولید گاز کل و جمعیت میکروارگانیسم‌های مرتبط با متانوژن، مانند آرک‌های متانوژن و پروتوزوآها نیز مشاهده شد (Salehian et al., 2024). Lobo et al. (2024) گزارش کردند جایگزینی کنجاله سویا با ریزجلبک کلرلا موجب افزایش حدود ۲۲ درصدی تولید اسید پروپیونیک و هم‌زمان کاهش تجمع اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیر و غلظت NH_3-N شده است. تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که ریزجلبک‌ها به‌عنوان منابع جدید و زیست‌فعال قابلیت استفاده در تغذیه نشخوارکنندگان را دارند؛ به‌طوری‌که نشخوارکنندگان به دلیل توانایی تخمیر کربوهیدرات‌های پیچیده و استفاده از نیتروژن غیرپروتئینی، مناسب‌ترین گروه دام برای بهره‌برداری از این منابع محسوب

می شوند. با این حال، اثر ریز جلبک ها بر فراسنجه های تخمیر شکمبه ای از جمله تولید گاز، تولید متان و قابلیت هضم، متغیر گزارش شده و به عواملی مانند گونه ریز جلبک، سطح مصرف و نوع جیره پایه وابسته است (Meehan et al., 2021). شناخت دقیق ارزش غذایی این منابع می تواند زمینه ساز توسعه پایدار صنعت دامپروری کشور با بهره گیری از ظرفیت های داخلی در شرایط بحرانی باشد. باتوجه به اینکه سویه های مختلف ریز جلبک می تواند تخمیر شکمبه و فراسنجه های تولید گاز را تحت تأثیر قرار دهد، هدف از پژوهش حاضر، بررسی ارزش تغذیه ای و برخی فراسنجه های تخمیر شکمبه ای گونه های مختلف ریز جلبک در شرایط برون تنی بود.

روش شناسی پژوهش

پودر ریز جلبک مورد استفاده (*Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*) در این پژوهش از شرکت دانش بنیان ریز جلبکی پارسیان واقع در رشت تهیه گردید. ترکیب شیمیایی ریز جلبک ها با استفاده از روش (2005) AOAC، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی مطابق Van Soest et al. (1991) تعیین شد. رنگدانه ها از ۰/۲ گرم نمونه خشک با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰ درصد استخراج و پس از سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، جذب نوری سوپرناتانت در طول موج های ۶۶۳، ۶۴۵ و ۴۷۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. مقادیر کلروفیل *a*، کلروفیل *b*، کلروفیل کل و کاروتنوئید بر اساس روابط Arnon (1949) و Lichtenthaler (1983) محاسبه و به صورت میلی گرم بر گرم وزن خشک گزارش شدند. برای تعیین محتوای فنول کل، از روش فولین-سیوکالتو مطابق با Makkar (2003) استفاده شد. به طور خلاصه، ۰/۰۱ میلی لیتر از عصاره با ۰/۴۹ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد، سپس ۰/۲۵ میلی لیتر معرف فولین سیوکالتو و ۱/۲۵ میلی لیتر محلول کربنات سدیم به آن اضافه گردید. مخلوط حاصل همگن شده و به مدت ۴۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نوری در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. برای محاسبه غلظت فنول کل، از منحنی استاندارد اسید تانیک استفاده شد و نتایج به صورت میلی گرم معادل اسید تانیک در هر گرم ماده خشک (mg/g) (DM) گزارش گردید. محتوای تانن با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. بدین منظور، تانن ها ابتدا با محلول استون استخراج و پس از سانتریفیوژ، سوپرناتانت حاصل با معرف رنگزا واکنش داده شد. سپس جذب نوری در طول موج ۷۶۰ نانومتر اندازه گیری گردید. برای کمی سازی تانن ها از اسید تانیک به عنوان استاندارد استفاده شد و نتایج به صورت معادل اسید تانیک (mg/g ماده خشک) گزارش شد (Chen et al., 2022). فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش DPPH طبق روش Brand-Williams et al. (1995) تعیین شد. به طور خلاصه، ۴ میلی گرم DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول حل شده و به مدت ۳ ساعت در تاریکی و دمای اتاق نگهداری شد. سپس رقت های مختلفی از هر عصاره تهیه گردید و ۱ میلی لیتر از محلول DPPH به آن ها افزوده شد. مخلوط ها پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی، در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شدند (Cuendet et al., 1997). ترکیب شیمیایی گونه های مختلف ریز جلبک در جدول (۱) نشان داده شده است (برای هر تیمار، سه تکرار کاملاً مستقل از هر نمونه تهیه شد و آنالیز ترکیب شیمیایی بر روی هر یک از آن ها انجام پذیرفت). با استفاده از نرم افزار جیره نویسی (SRNS، نسخه ۱،۱۲)، یک جیره پایه برای بزغاله سانن (جدول ۱) تنظیم گردید.

به منظور انجام آزمون تولید گاز شکمبه ای، در دو اجرا مجزا مایع شکمبه از دو رأس گاو هلشتاین موجود در واحد دامپروری دانشکده کشاورزی بیرجند به وسیله پمپ خلاء از طریق فستولای شکمبه ای جمع آوری شد. سپس مایع شکمبه صاف شده به وسیله پارچه چهار لایه متقال، بلافاصله به صورت بی هوازی داخل فلاسک عایق حاوی آب گرم ۳۹ درجه به آزمایشگاه منتقل شد. جهت اطمینان از بی هوازی بودن مایع شکمبه صاف شده، گاز CO_2 به طور مداوم به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم قرار گرفت. استفاده از مایع شکمبه گاوی در مطالعات تخمیر برون تنی

یک رویکرد رایج است، زیرا این منبع به دلیل پایداری جمعیت میکروبی و امکان تهیه حجم کافی، شرایط استانداردتری را برای ارزیابی تخمیر جیره‌های مختلف نشخوارکنندگان فراهم می‌کند. سپس بر اساس روش اصلاح شده *Blümmel et al.* (1999) ۵۰۰ میلی گرم نمونه ماده خشک و ۵۰ میلی لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به نسبت یک قسمت مایع شکمبه و دو قسمت بزاق مصنوعی در شیشه‌های ۱۲۰ میلی لیتری بی‌هوازی ترکیب شد و در دستگاه بن‌ماری (۳۹ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت. به‌ازای هر تیمار، ۵ تکرار برای تعیین گاز تولیدی توسط دستگاه فشارسنج دیجیتال (لوترن *PM-9100*) در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از آغاز انکوباسیون براساس کیلوپاسکال اندازه‌گیری شده و معادل حجمی در فشار و دمای استاندارد (۲۴ درجه سانتی‌گراد و ۱ اتمسفر) تبدیل شد (*Feizdar Barabadi et al.*, 2023). در زمان‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون از هر تیمار ۳ تکرار برای اندازه‌گیری *pH*، نیتروژن آمونیاکی، میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک، خارج شد. همچنین ۵ ویال به‌عنوان بلانک (فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. *pH* نمونه‌ها با استفاده از دستگاه *pH* متر دیجیتال (*lab Metrohm 727 pH*) اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن نمونه با استفاده از پارچه متقال، ۵ میلی لیتر مایع شکمبه برای تعیین نیتروژن آمونیاکی به ظرف حاوی ۳۳۳ میکرولیتر اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال منتقل گردید تا فعالیت تخمیر متوقف شود و در فریزر -۲۰ نگهداری شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در دسی لیتر) با معرف فنول هیپوکلریت و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۳۰ نانومتر مشخص شد (*Broderick and Kang, 1980*). برای تعیین میزان تجزیه‌پذیری برون‌تنی ماده خشک (درصد ماده خشک)، هرکدام از ویال‌ها به صورت جداگانه برداشته شد و پس از انتقال بر روی پارچه متقال، با استفاده از پمپ خلأ صاف گردید. سپس نمونه سه بار با آب مقطر شستشو داده شد. نمونه باقیمانده بر روی پارچه صافی به مدت ۲۴ ساعت در آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. از تفاوت بین مقدار ماده خشک قبل و بعد آون، مقدار ناپدیدشدن ماده خشک محاسبه گردید (*Antonius et al. 2023*). همچنین ۳ ویال برای هر تیمار در ساعت‌های ۸، ۱۲ و ۲۴ جدا شد تا متان تولیدی اندازه‌گیری شود. برای اندازه‌گیری متان، به انتهای درپوش پلاستیکی ویال‌ها به میزان ۴ میلی لیتر سود ۱۰ مولار تزریق شد تا دی‌اکسید کربن حاصله حذف شود و گاز باقیمانده برابر با میزان متان تولیدی تخمین می‌شود (*Afshar Hamidi et al., 2015*). برای ارزیابی داده‌های تولید گاز از مدل نمایی (رابطه ۱) *Schofield et al. (1994)* با رویه *Nlin* نرم‌افزار آماری *SAS* پارامترهای مدل بررسی شد.

$$P=v(1-\exp(-k(t))) \quad \text{رابطه ۱}$$

در این مدل، *P* (گاز تولیدی)، *V* (گاز مرتبط با سوسترای دارای پتانسیل تخمیر)، *K* (نرخ تولید گاز در زمان) است. متغیرهای *t* (زمان متناظر با نصف بیشینه تولید گاز)، *G* (گاز تولیدی در زمان *t* با معادله *Blümmel et al., (1999)* ارزیابی شد. فاکتور تسهیم ظاهری (*PF*) به صورت نسبت مقدار ماده خشک تجزیه شده ظاهری (میلی گرم) به حجم گاز تولیدی (میلی لیتر) در زمان، بیان می‌شود (*Blümmel et al., 1997*). داده‌های بدست آمده در قالب طرح فاکتوریل ۳×۴ (۳ گونه ریزجلبک/اسپیرولینا، کلرلا و سندسموس در ۴ سطح مختلف صفر، ۱، ۲ و ۳ درصد) با ۱۲ تیمار و ۱۵ تکرار برای هر تیمار با استفاده از رویه *GLM* و برنامه آماری *SAS (2009)* تجزیه و تحلیل شدند. اختلاف بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی کرامر و در سطح احتمال پنج درصد مورد بررسی قرار گرفت. مدل آماری (رابطه ۲) طرح به شرح زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + (A \times B)_{ij} + e_{ijk}$$

که در این رابطه، Y_{ijk} مقدار هر مشاهده؛ μ میانگین کل؛ A_i اثر نوع جلبک؛ B_j اثر سطح جلبک؛ $(A \times B)_{ij}$ اثر متقابل سطح و نوع جلبک و e_{ijk} اثر خطای آزمایشی است. برای بررسی داده‌های تکراردار در زمان از روش *Repeated measure* رویه آماری *GLM* استفاده شد.

جدول ۱- ترکیبات خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره پایه آزمایشی
Table 1. Ingredients and chemical composition of experimental basal diet

جیره آزمایش برون تنی (In vitro diet) (% on DM basis)	اقلام خوراکی (Ingredient feed)
15.14	یونجه (Alfalfa)
15.3	سیلاژ ذرت (Corn silage)
35.38	دانه جو (Barley)
17.69	دانه ذرت (Corn)
6.02	کنجاله سویا (Soybean Meal)
6.79	سوس گندم (Wheat bran)
0.050	نمک (Salt)
0.710	جوش شیرین (Sodium bicarbonate)
1.42	کربنات کلسیم (Calcium carbonate)
1.5	مکمل ویتامینی - معدنی ^۱ (Minerals and vitamins)
ترکیبات شیمیایی (Chemical composition)	
2.541	انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری در کیلوگرم) ME (Mcal/kg)
14.1	پروتئین خام (درصد ماده خشک) CP, % of DM
2.9	عصاره اتری (درصد ماده خشک) EE, % of DM
31.2	فیبر نامحلول در شوینده خنثی (درصد ماده خشک) NDF, % of DM
-	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (درصد ماده خشک) ADF, % of DM
45.1	کربوهیدرات‌های غیر فیبری (درصد ماده خشک) NFC, % of DM

^۱ هر کیلوگرم مکمل ویتامینه - معدنی: ۵۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D3، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۱۵۰ گرم کلسیم، ۶۰ گرم سدیم، ۴۰ میلی‌گرم منیزیم، ۳۵۰۰ میلی‌گرم آهن، ۴۵۰۰ میلی‌گرم روی، ۳۵۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۱۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۴۰ میلی‌گرم ید، ۴۰ میلی‌گرم کبالت، ۲۵ میلی‌گرم سلنیوم.

Supplied 500000 IU vitamin A, 100000 IU vitamin D3, 2000 IU vitamin E, 150 g Ca, 3500 mg Fe, 4500 mg Zn, 3500 mg Mn, 1000 mg Cu, 40 mg I, 40 mg/kg Co and 25 mg Se.

یافته‌های پژوهشی و بحث

نتایج مقایسه ترکیب شیمیایی و ترکیبات زیست‌فعال گونه‌های مختلف ریزجلبک در (جدول ۲) ارائه شده است. از نظر ماده خشک، تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان ندادند ($P > 0.05$). اسپیرولینا و کلرلا بیشترین محتوای پروتئین خام را به خود اختصاص دادند ($P < 0.05$) در حالی که سندسموس نسبت به دو گونه دیگر کمترین مقدار پروتئین خام را داشت ($P < 0.05$). این یافته با گزارش Sucu (2023) که پروتئین خام اسپیرولینا و کلرلا را به ترتیب ۶۱/۹۷ و ۵۱/۷۷ درصد ثبت کرده، و همچنین با نتایج Lamminen et al. (2019) که ارزش پروتئینی این دو گونه را به ترتیب ۶۹۳ و ۵۸۶ گرم بر کیلوگرم ماده خشک گزارش کرده‌اند، هم‌راستاست. مقدار پروتئین خام به دست آمده برای ریزجلبک سندسموس در این مطالعه با نتایج برخی مطالعات مطابقت دارد (Dinpazhooh et al., 2022; Molino et al., 2018).

جدول ۲. مقایسه ترکیب شیمیایی و ترکیبات زیست فعال گونه های مختلف ریز جلبک (درصد ماده خشک)

Table 2. Comparison of the chemical composition and bioactive compounds of different microalgae species (percentage of dry matter)

سطح معنی داری P-value	خطای استاندارد میانگین SEM	سندسموس Scenedesmus	کلرلا Chlorella	اسپیرولینا Spirulina	پارامتر Parameter
0.298	1.360	98.638	96.343	95.414	ماده خشک Dry Matter
<0.0001	1.230	12.601 ^c	64.954 ^b	72.59 ^a	پروتئین خام Crude Protein
0.003	0.076	1.206 ^a	0.636 ^b	0.683 ^b	چربی خام Ether Extract
0.063	0.108	10.197	10.147	11.862	کلروفیل a (میلی گرم بر گرم وزن خشک) Chlorophyll a (mg/g dry Weight)
0.011	0.036	4.995 ^a	2.549 ^b	1.039 ^c	کلروفیل b (میلی گرم بر گرم وزن خشک) Chlorophyll b (mg/g dry Weight)
0.724	0.935	15.193	15.201	13.939	کلروفیل کل (میلی گرم بر گرم وزن خشک) Total Chlorophyll (mg/g dry Weight)
0.017	0.009	0.135 ^b	0.213 ^b	0.719 ^a	کاروتنوئید (میلی گرم بر گرم وزن خشک) Carotenoid (mg/g dry Weight)
0.500	0.707	2.000	3.000	1.500	فنول کل (میلی گرم در هر گرم ماده خشک) Total Phenolic Content (mg/g DM)
0.856	0.036	1.411	1.454	1.427	تانن کل (میلی گرم در هر گرم ماده خشک) Total Tannin (mg/g DM)
0.018	0.245	52.662 ^b	58.564 ^b	68.576 ^a	آنتی اکسیدان (درصد) Percent antioxidant capacity

* میانگین های با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0.05$).Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$)

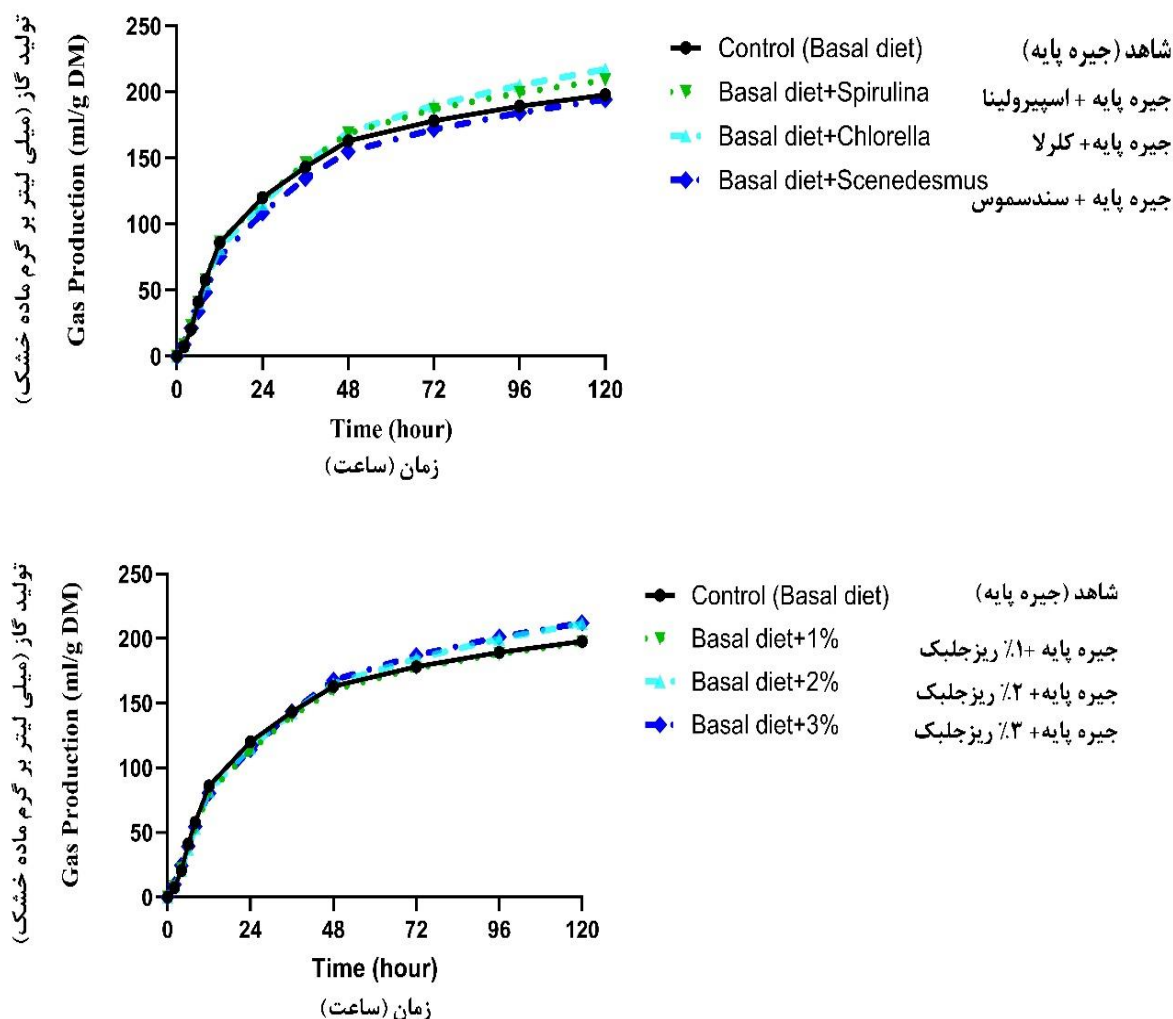
SEM: خطای استاندارد میانگین

Standard Error of the Mean

مقدار چربی خام نیز بین تیمارها اختلاف معنی داری نشان داد ($P < 0.05$)، به گونه ای که بیشترین مقدار آن در سند سموس و کمترین مقدار در کلرلا مشاهده شد، در حالی که اسپیرولینا در سطحی مشابه کلرلا قرار داشت. مقادیر چربی خام ریز جلبک ها در محدوده ۰/۶ تا ۱/۲ درصد ماده خشک قرار داشت که با مقالات گزارش شده همخوانی دارد (Al-Yahyaey et al., 2023; Khodadadianzaghmari et al., 2024). در حالی که در بسیاری از مطالعات پیشین، مقادیر به مراتب بالاتری برای چربی خام گزارش شده است (Sucu, 2023). بر روی رنگیزه های فتو سنتزی نشان داد که میزان کلروفیل a بین گونه های ریز جلبک اختلاف معنی داری نداشت ($P > 0.05$). در مقابل، کلروفیل b در سند سموس به طور معنی داری از کلرلا و اسپیرولینا بیشتر بود ($P < 0.05$)؛ این الگو با ویژگی های زیستی این گونه ها هم خوانی دارد، چرا که کلروفیل b عمدتاً مشخصه جلبک های سبز نظیر کلرلا و سند سموس است (Richmond, 2004). با وجود این تفاوت در کلروفیل b، مقدار کلروفیل کل بین گونه ها اختلاف معنی داری نشان نداد ($P > 0.05$). از نظر کاروتنوئید، اسپیرولینا به طور معنی داری بالاتر از سند سموس و کلرلا بود ($P < 0.05$)؛ این برتری با گزارش های پیشین مبنی بر غنای اسپیرولینا از رنگدانه های زیستی سازگار است (Del Campo et al., 2007). در نهایت، فنول کل و تانن کل بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری نشان ندادند ($P > 0.05$). ظرفیت آنتی اکسیدانی نیز تحت تأثیر گونه ریز جلبک قرار گرفت، به طوری که

اسپیرولینا به طور معنی داری از کلرلا و سند سموس برتر بود ($P < 0.05$). این یافته تا حد زیادی با مطالعات پیشین در این زمینه همراستا است؛ El-Chaghaby et al. (2019)، برتری نسبی اسپیرولینا را در شاخص های فنولی و آنتی اکسیدانی گزارش کرده اند. با این حال، Čmíková et al. (2025) در مقایسه ای مستقل بین کلرلا و اسپیرولینا نشان دادند که با وجود برتری آنتی اکسیدانی اسپیرولینا، کلرلا از نظر برخی ترکیبات فنولیک اختصاصی مانند اسید پارا-هیدروکسی بنزوئیک برتری داشت؛ این یافته نشان می دهد که برتری در ظرفیت آنتی اکسیدانی همواره با برتری در سایر شاخص های زیست فعال همجهت نیست. در مجموع تفاوت های قابل توجه گونه های مختلف ریز جلبک از نظر ترکیب شیمیایی و ترکیبات زیست فعال است که می تواند در انتخاب و کاربرد تغذیه ای آن ها اهمیت داشته باشد.

نتایج مربوط به تولید گاز در شرایط برون تنی برای منابع و سطوح مختلف ریز جلبک در (جدول ۳) و (شکل ۱) ارائه شده است. بین گاز تولید شده به ازای سوبسترای قابل تخمیر (۷)، پتانسیل تولید گاز در زمان $t_{0.5}$ ($G_{0.5}$) زمان لازم برای رسیدن به نیمی از پتانسیل تولید گاز ($t_{0.5}$) رابطه معنی داری برقرار بود ($P < 0.05$)، به طوری که با افزایش سطح ریز جلبک در جیره، حجم گاز تولیدی نیز روند صعودی داشت. بالاترین و پایین ترین حجم گاز تولیدی و پتانسیل تولید گاز در زمان $t_{0.5}$ به ترتیب در تیمار حاوی ۳ در صد کلرلا (تیمار ۱۱) و ۱ در صد سند سموس (تیمار ۶) ثبت شد ($P < 0.05$). این الگو با یافته های Sucu (2023) همسو است، هرچند با نتایج Kholif et al. (2023) مغایرت دارد. از سوی دیگر، Sucu (2020) در مطالعه ای مقایسه ای روی سیلاژ گندم و ذرت گزارش کرد که افزودن کلرلا باعث کاهش محسوس تولید گاز و غلظت اسیدهای چرب فرار می شود و در مقایسه با سایر منابع جیره، کلرلا را قوی ترین بازدارنده تولید گاز معرفی کرد. Meteeb et al. (2025) رابطه خطی مثبتی بین سطح اسپیرولینا و حجم گاز تولید شده پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون برون تنی گزارش کردند. Anele et al. (2016) در ارزیابی برون تنی ریز جلبک ها، گاز تولیدی بالاتری برای *Chlorella vulgaris* گزارش کردند که با نتایج این مطالعه همراستا است. همچنین، این الگو با نتایج Han and McCormick (2014) که بخش سریع التخمیر کلرلا را به طور معنی داری بزرگ تر از *Scenedesmus dimorphus* یافته بودند، مطابقت دارد. Dębowski et al. (2022) اشاره کردند که دیواره سلولی سند سموس حاوی اسپوروپولین (پلیمری با مقاومت بالا در برابر تجزیه) است. این تناقضات را می توان به تفاوت در ترکیب شیمیایی، طراحی آزمایش، مقاومت دیواره سلولی ریز جلبک ها در برابر تجزیه میکروبی، و عدم سازگاری میکروفلور شکمبه با جیره های حاوی ریز جلبک نسبت داد. همان طور که در (جدول ۳) مشاهده می شود، با افزایش سطح ریز جلبک، نرخ تولید گاز (K) کاهش یافت ($P < 0.05$)؛ بدین معنا که هرچند ظرفیت نهایی تخمیر افزایش می یابد، سرعت دسترسی میکروبی به سوبسترا کند شده و منحنی تولید گاز شیب ملایم تری به خود می گیرد. این الگو در مطالعات پیشین نیز مشاهده شده است؛ برای نمونه، Yadeghari et al. (2015) در بررسی روغن اسانس اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*) نشان دادند که با افزایش سطح افزودنی، پتانسیل نهایی تولید گاز افزایش می یابد، اما نرخ تولید گاز کاهشی می باشد؛ یعنی رابطه ای معکوس میان ظرفیت و سرعت تخمیر برقرار است. در مطالعه حاضر، الگوی مشابه در سطوح بالاتر ریز جلبک نیز دیده می شود و می توان آن را به چند سازوکار احتمالی نسبت داد. نخست، ساختار نسبتاً مقاوم دیواره سلولی ریز جلبک ها که غنی از پلی ساکاریدهای ساختاری است، ممکن است کلونیزاسیون میکروبی را به تأخیر انداخته و نرخ اولیه تخمیر را کاهش دهد (Kotrbaček et al., 2015). دوم، افزایش سطح ریز جلبک می تواند غلظت ترکیبات زیست فعالی مانند اسیدهای چرب غیرا شباع را گسترش دهد که در غلظت های بالا اثر بازدارنده روی برخی جمعیت های میکروبی دارند (Maia et al., 2007). کاهش نرخ تولید گاز بیانگر کندتر شدن تجزیه اولیه سوبسترا و افزایش زمان لازم برای دسترسی میکروبی به بخش های قابل تخمیر است؛ با این حال، ثابت ماندن یا افزایش پتانسیل نهایی تولید گاز نشان می دهد که اثر بازدارنده احتمالی این ترکیبات عمدتاً به مراحل ابتدایی تخمیر محدود بوده و با گذشت زمان، جمعیت میکروبی به تدریج با حضور ریز جلبک سازگار شده و از بخش های قابل تخمیر زیست توده بهره می گیرد.



شکل ۱- مقایسه میزان گاز تولیدی از جیره پایه با افزودن سطوح (صفر، ۱، ۲ و ۳ درصد) و منابع مختلف ریزجلبکی (اسپیرولینا، کلرلا و سندسموس) در شرایط برون تنی (میلی لیتر بر گرم ماده خشک)

Figure 1. Comparison of gas production from the basal diet supplemented with different levels (0, 1, 2, and 3%) and sources of microalgae (Spirulina, Chlorella and Scenedesmus) under in vitro conditions (mL per g of dry matter).

همان طور که در (شکل ۲) مشاهده می شود، سطح ۳ درصد ریزجلبک کلرلا موجب افزایش پتانسیل تولید گاز در زمان $T_{0/5}$ شده است. از سوی دیگر، روند تغییرات $T_{0/5}$ نشان می دهد که با افزایش سطح ریزجلبک ها، زمان رسیدن به نصف پتانسیل تولید گاز در اغلب تیمارها افزایش یافته است. این افزایش به ویژه در سطح ۲ تا ۳ درصد در کلرلا و سندسموس مشهودتر بوده است. این یافته با گزارش هایی که اثر ترکیبات زیست فعال بر تخمیر شکمبه ای را وابسته به نوع ترکیب، غلظت، و ویژگی های سوبسترا می دانند، همخوانی دارد (Getachew et al., 2008).

جدول ۳. اثرات اصلی و متقابل سطوح و منابع ریز جلبکی بر فراسنجه‌های تولید گاز شکمبه‌ای تحت شرایط برون تنی (میلی لیتر در ۵۰۰ میلی گرم ماده خشک)

Table 3. Main and interactive effects of different microalgae sources and inclusion levels on rumen gas production parameters under in vitro conditions (mL/500 mg DM)

سطح معنی داری P-value		سطح (درصد) (%) Level				سطح معنی داری P-value		ریز جلبک Microalgae			پارامتر
گونه × سطح Species × Level	سطح Level	3	2	1	0	گونه Species		سندسموس Scenedesmus	کلرلا Chlorella	اسپیروولینا Spirulina	Parameter
<0.0001	<0.0001	213.730 ^a	211.125 ^a	195.712 ^b	191.721 ^b	<0.0001		193.998 ^c	211.675 ^a	203.544 ^b	V ^۱
0.393	<0.0001	0.036 ^c	0.035 ^c	0.039 ^b	0.057 ^a	0.508		0.042	0.041	0.043	K ^۲
<0.0001	<0.0001	106.865 ^a	105.562 ^a	97.856 ^b	95.860 ^b	<0.0001		96.999 ^c	105.837 ^a	101.771 ^b	G _{haf} ^۳
0.0009	<0.0001	20.666 ^a	20.883 ^a	18.532 ^b	15.474 ^c	0.0021		19.080 ^a	19.425 ^a	18.162 ^b	T _{haf} ^۴

*میانگین‌های با حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

^۱ گاز مربوط به سوبسترای دارای پتانسیل تخمیر بر حسب میلی لیتر

^۲ نرخ تولید گاز در زمان

^۳ پتانسیل تولید گاز در زمان $T_{0.5}$

^۴ زمان رسیدن به نصف پتانسیل تولید گاز بر حسب ساعت

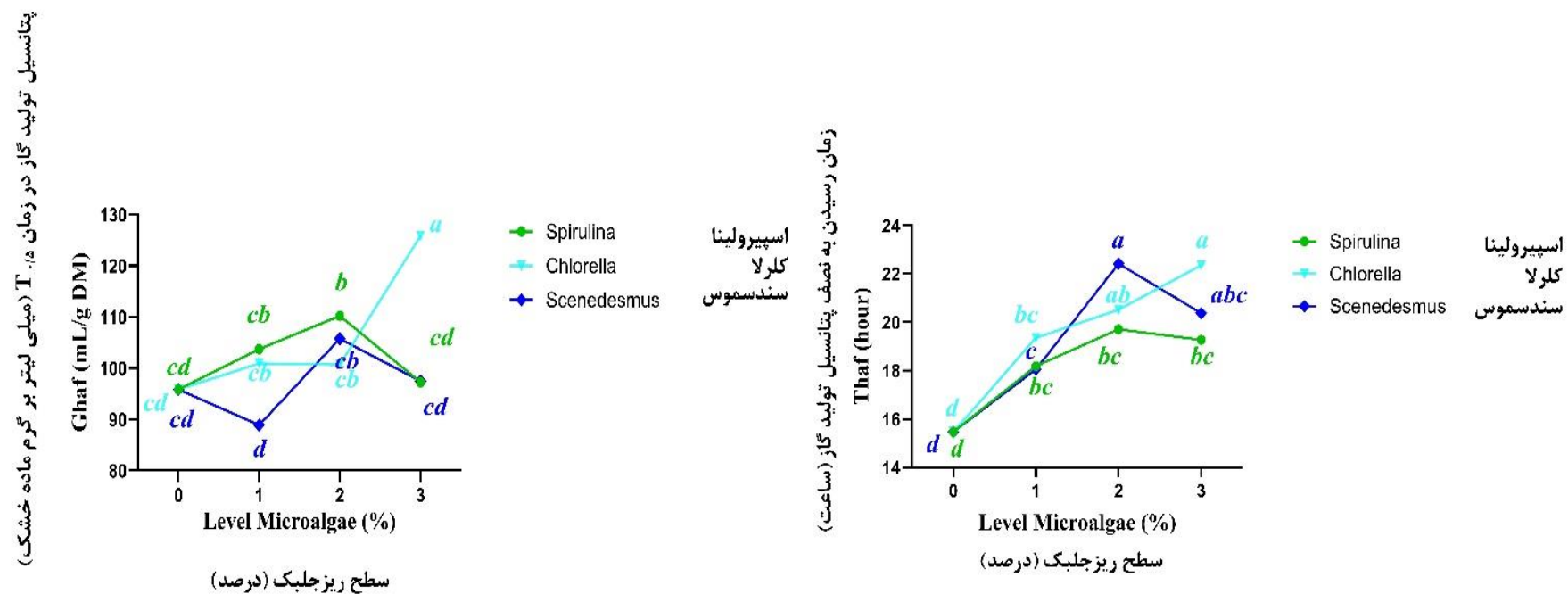
Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$)

Gas from the fermentable substrate fraction (mL)

Rate of gas production over time

Gas production potential at $T_{0.5}$

Time to reach half of the maximum gas production potential (h)



شکل ۲. تأثیر نوع و سطح ریز جلبک بر پارامترهای کینتیک تولید گاز شکمبه‌ای. پتانسیل تولید گاز در زمان $t_{0.5}$ ($G_{0.5}$) و زمان رسیدن به نیمی از پتانسیل تولید گاز ($t_{0.5}$). نقاط دارای حروف غیرمشابه در هر نمودار دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0.05$).

Figure 2. Effect of microalgae type and inclusion level on ruminal gas production kinetics parameters: gas production potential at half-time ($G_{0.5}$) and time to reach half of the maximum gas production potential ($t_{0.5}$). Bars with different letters within each panel differ significantly ($P < 0.05$).

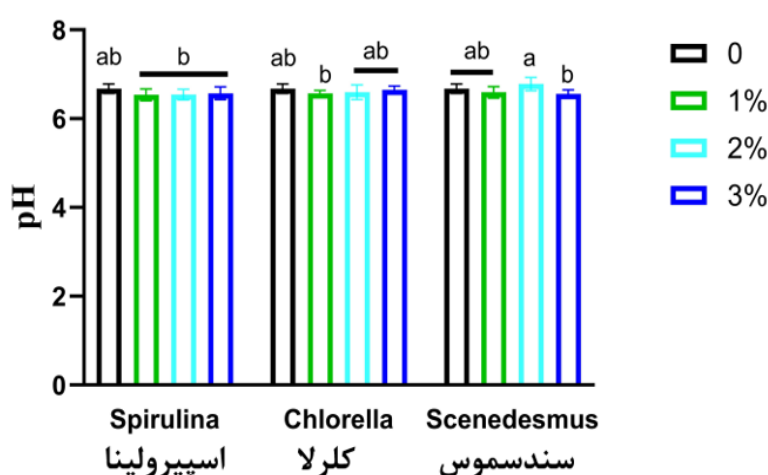
در (جدول ۴)، اثر تیمارهای مختلف بر pH مایع شکمبه نشان داده شده است. نتایج بیانگر وجود اثر متقابل بین نوع و سطح ریز جلبک در ساعت ۸ انکوباسیون بود ($P < 0.05$)، در حالی که در زمان‌های بعدی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P > 0.05$). در (شکل ۳) اثر متقابل گونه و سطح ریز جلبک بر pH مایع شکمبه در ساعت ۸ تخمیر برون‌تنی نشان داده شده است. در تیمارهای *اسپیروولینا* و *کلرلا*، کاهش pH در تمام سطوح مصرفی در ساعت ۸ مشاهده شد که احتمالاً ناشی از دسترسی سریع میکروارگانیسم‌ها به ترکیبات قابل تخمیر این ریز جلبک‌ها است. با این حال، شدت این تغییرات برای ایجاد اختلاف آماری پایدار کافی نبود. در مقابل، الگوی سند سموس متفاوت بود؛ به‌طوری‌که در سطح ۲ در صد، افزایش و در سطح ۳ در صد کاهش pH مشاهده شد، که می‌تواند به ترتیب نشان‌دهنده محدودیت موقت در تخمیر و افزایش سوپ‌سترای قابل تخمیر باشد. این نتایج با گزارش مطالعات پیشین مبنی بر وابستگی پاسخ تخمیری ریز جلبک‌ها به گونه و ویژگی‌های ساختاری آن‌ها همخوانی دارد (Meehan et al., 2021).

با افزایش سطح ریز جلبک از صفر تا ۳ درصد (جدول ۴)، غلظت نیتروژن آمونیاکی در ساعت ۲۴ انکوباسیون به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($P < 0.05$). این یافته نشان می‌دهد که به‌رغم محتوای بالای نیتروژن در زیست‌توده ریز جلبکی، افزودن آن به محیط تخمیر منجر به افزایش تجمع آمونیاک نشد، بلکه احتمالاً کارایی استفاده از نیتروژن توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه بهبود یافته و آمونیاک بیشتری در مسیر سنتز پروتئین میکروبی مصرف شده است. چنین تفسیری با گزارش‌هایی که کاهش NH_3-N را همراه با افزایش نیتروژن غیر آمونیاکی و کارایی استفاده از نیتروژن نشان داده‌اند، هم‌راستا است (Lobo et al., 2024). یکی از سازوکارهای اصلی این پاسخ می‌تواند به ویژگی‌های تجزیه‌پذیری پروتئین ریز جلبک‌ها مرتبط باشد. مطالعات نشان داده‌اند که جایگزینی کنجاله سویا با زیست‌توده جلبکی، به‌ویژه *کلرلا*، موجب کاهش غلظت NH_3-N و کاهش شاخص‌های تجزیه پروتئین (مانند اسیدهای چرب فرار شاخه‌دار و ایزواسیدها) می‌شود که بیانگر مقاومت بیشتر پروتئین جلبکی در برابر تجزیه شکمبه‌ای و در نتیجه افزایش کارایی استفاده از نیتروژن است (Lobo et al., 2024). علاوه بر این، وجود ساختارهای دیواره سلولی پیچیده و ترکیبات زیستی خاص در ریز جلبک‌ها می‌تواند سرعت آزادسازی نیتروژن را محدود کرده و از آزادسازی سریع آمونیاک جلوگیری کند (Mota et al., 2024). از سوی دیگر، هم‌زمانی بین تأمین نیتروژن و انرژی قابل تخمیر نقش کلیدی در تعیین غلظت- NH_3 دارد. در صورتی که این دو منبع به صورت هماهنگ در اختیار میکروارگانیسم‌ها قرار گیرند، جذب آمونیاک برای رشد میکروبی افزایش یافته و تجمع آن کاهش می‌یابد. در این راستا، گزارش شده است که اثر ریز جلبک‌ها بر تخمیر شکمبه‌ای به‌شدت وابسته به نوع سوپ‌سترا و دسترسی به کربوهیدرات‌های قابل تخمیر است و بهبود هم‌زمانی انرژی-نیتروژن می‌تواند کارایی تخمیر را افزایش دهد (Meehan et al., 2021). با این حال، پاسخ NH_3-N به ریز جلبک‌ها در مطالعات مختلف یکنواخت نیست و افزایش، کاهش یا عدم تغییر آن گزارش شده است (Salehian et al., 2025; Panjaitan et al., 2015; Lamminen et al., 2019). این تناقض‌ها عمدتاً ناشی از تفاوت در گونه ریز جلبک، سطح مصرف، ترکیب شیمیایی، شرایط فرآوری و نوع جیره پایه است. برای مثال، در شرایطی که آزادسازی نیتروژن سریع‌تر از تأمین انرژی باشد، افزایش موقتی آمونیاک رخ می‌دهد؛ در شرایطی با تجزیه‌پذیری کمتر پروتئین یا هم‌زمانی بهتر انرژی و نیتروژن، کاهش NH_3-N مشاهده می‌شود. در مجموع، کاهش غلظت- NH_3 در ساعت ۲۴ در این مطالعه نشان‌دهنده بهبود کارایی استفاده از نیتروژن در سیستم برون‌تنی است. این اثر احتمالاً حاصل تعامل بین کاهش تجزیه‌پذیری پروتئین جلبکی، ویژگی‌های ساختاری زیست‌توده و بهبود هم‌زمانی بین تأمین انرژی و نیتروژن برای میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌باشد.

نتایج (جدول ۴) نشان داد که نوع ریز جلبک اثر معنی‌داری بر تجزیه‌پذیری ماده خشک در ساعت ۲۴ انکوباسیون داشت ($P < 0.05$)، به‌طوری‌که *اسپیروولینا* بیشترین و *کلرلا* کمترین میزان تجزیه‌پذیری را نشان دادند. این یافته با مطالعات اخیر که تفاوت معنی‌دار بین گونه‌های مختلف ریز جلبک در قابلیت هضم و تخمیر شکمبه‌ای گزارش کرده‌اند هم‌راستا است. در این مطالعات، تفاوت پاسخ‌ها عمدتاً به ترکیب شیمیایی، نسبت پروتئین به لیپید، و ساختار دیواره سلولی گونه‌ها نسبت داده شده است (Zelee et al., 2026). بر اساس مطالعات موجود، *اسپیروولینا* به دلیل دارا بودن پروتئین بالا (حدود ۶۰-۷۰ درصد ماده خشک)، اسیدهای آمینه ضروری، اسیدهای چرب غیراشباع، و ترکیبات زیست‌فعال مانند فیکوسیائین و کاروتنوئیدها، می‌تواند فعالیت میکروبی شکمبه را تقویت کرده و موجب افزایش تجزیه‌پذیری ماده آلی شود. علاوه بر این، فراهمی بهتر نیتروژن و انرژی قابل تخمیر در این گونه،

شرایط مناسب‌تری برای رشد میکروبی و تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده ایجاد می‌کند، که در نهایت به افزایش قابلیت هضم منجر می‌شود (Zhao et al., 2026). در مقابل، کلرلا معمولاً دارای ساختار سلولی مقاوم‌تر و پروفایل متفاوتی از ترکیبات دیواره سلولی و پلی‌ساکاریدها است که می‌تواند سرعت تجزیه‌پذیری آن را کاهش دهد. مطالعات برون‌تنی اخیر نیز نشان داده‌اند که کلرلا نسبت به اسپیرولینا پروتئین مقاوم‌تری به قابلیت تجزیه‌پذیری دارد (Lobo et al., 2024). این ویژگی می‌تواند بخشی از اختلاف مشاهده شده در قابلیت هضم ماده خشک بین گونه‌ها را توضیح دهد. همچنین، اثر متقابل نوع و سطح ریز جلبک بر فاکتور تسهیم ظاهری در ساعت ۲۴ تمایل به معنی‌داری نشان داد ($P=0/05$)؛ این روند عمدتاً ناشی از کاهش محسوس‌تر فاکتور تسهیم ظاهری در کلرلا با افزایش سطح مصرف در مقایسه با اسپیرولینا و سندسموس بود.

در نتایج مطالعه حاضر (جدول ۴)، اثرات اصلی نوع و سطح ریز جلبک بر تولید متان معنی‌دار نبود ($P>0/05$). با این حال، مطالعات نشان می‌دهند اثر ریز جلبک‌ها بر متان‌ژنر وابسته به سطح مصرف، گونه و ترکیب جیره پایه است (Meehan et al., 2021; Li et al., 2025). مطالعات نشان داده‌اند که برخی گونه‌های ریز جلبک قادر به کاهش تولید متان در شرایط برون‌تنی هستند، به‌طوری‌که کاهش ۱۰ تا ۱۷ درصدی متان در اثر استفاده از برخی گونه‌های ریز جلبکی گزارش شده است. این اثر عمدتاً به محتوای بالای اسیدهای چرب غیراشباع، ترکیبات سولفوری و اثرات بازدارنده بر آرکی‌های متان‌ژنر نسبت داده می‌شود (Li et al., 2025). از سوی دیگر، مطالعات نشان داده‌اند که اسیدهای چرب غیراشباع موجود در ریز جلبک‌ها می‌تواند از طریق مهار مستقیم رشد آرکی‌های متان‌ژنر و کاهش تولید هیدروژن آزاد از طریق تغییر مسیر تخمیر به سمت تولید پروپیونات، متان‌ژنر را کاهش دهد. در نتیجه، کاهش تولید متان اغلب همراه با تغییرات همزمان در پروفایل اسیدهای چرب فرار مشاهده می‌شود (Lobo et al., 2024). با این حال، در بسیاری از مطالعات اخیر، اثرات ریز جلبک‌ها بر متان وابسته به گونه و سطح مصرف گزارش شده است. برای مثال، در برخی شرایط *Chlorella vulgaris* می‌تواند اثر خنثی یا افزایشی بر متان داشته باشد (Meehan et al., 2021). این موضوع نشان می‌دهد که پاسخ میکروبی در محیط تخمیر به ریز جلبک‌ها یک پاسخ چندعاملی است که به ترکیب جیره، ساختار دیواره سلولی و سرعت قابلیت تخمیر بستگی دارد. مطالعات اخیر تأکید کرده‌اند که کاهش معنی‌دار متان معمولاً در سطوح بالاتر مصرف یا در حضور گونه‌های بسیار غنی از اسیدهای چرب غیراشباع مانند *Nannochloropsis* یا برخی ریز جلبک‌های دریایی مشاهده می‌شود (Li et al., 2025). در مجموع، اگرچه در این مطالعه اثر معنی‌داری بر تولید متان مشاهده نشد، روند کاهشی در سطوح پایین‌تر (تا سطح ۲ درصد) نشان‌دهنده پتانسیل نسبی ریز جلبک‌ها در تعدیل تولید متان است. با این حال، به نظر می‌رسد برای دستیابی به اثرات قابل توجه، انتخاب گونه مناسب، سطح بهینه و در نظر گرفتن نوع جیره پایه ضروری باشد.



شکل ۳. اثر متقابل گونه و سطح ریز جلبک (گونه × سطح) بر pH مایع شکمبه در ساعت ۸ تخمیر برون‌تنی

Figure 3. Interactive effect of microalgae species and inclusion level (species × level) on rumen fluid pH at 8 h of in vitro fermentation

جدول ۴. مقایسه pH، نیتروژن آمونیاکی، تجزیه پذیری ماده خشک، تولید متان و فاکتور تسهیم ظاهری در ساعت های ۸، ۱۲ و ۲۴ تخمیر برون تنی شکمبه برای منابع و سطوح مختلف ریز جلبک

Table 4. Comparison of pH, ammonia nitrogen, dry matter degradability, methane production, and apparent partitioning factor at 8, 12, and 24 h of in vitro rumen fermentation for different microalgae sources and inclusion levels

سطح معنی داری P-value		سطح (درصد) (%) Level				سطح معنی داری P-value	ریز جلبک Microalgae			زمان Time (h)	پارامتر Parameter
گونه × سطح Species × Level	سطح Level	3	2	1	0	گونه Species	سندسموس Scenedesmus	کلرلا Chlorella	اسپیروولینا Spirulina		
0.013	0.006	6.593 ^{ab}	6.640 ^{ab}	6.566 ^b	6.675 ^a	0.049	6.652 ^a	6.662 ^a	6.581 ^b	8	pH
0.467	0.664	6.615	6.621	6.646	6.585	0.863	6.629	6.606	6.615	12	
0.922	0.570	6.611	6.532	6.565	6.571	0.879	6.556	6.579	6.575	24	
0.615	0.163	4.778	4.836	4.538	5.863	0.921	4.916	4.970	5.126	8	نیتروژن آمونیاکی ammonia-N, mg/dL
0.947	0.355	2.763	2.168	2.667	3.784	0.534	2.966	3.218	2.353	12	
0.736	0.048	2.376 ^b	2.731 ^{ab}	3.367 ^{ab}	4.496 ^a	0.266	3.878	3.033	2.816	24	
0.204	0.055	47.311	43.944	49.911	45.366	0.859	46.558	46.141	47.200	8	تجزیه پذیری ماده خشک IVDMD, % of DM
0.404	0.326	52.244	56.111	55.755	51.716	0.255	56.287	52.004	53.579	12	
0.131	0.0001<	63.155 ^c	67.127 ^{bc}	73.000 ^{ab}	74.200 ^a	0.029	69.325 ^{ab}	66.550 ^b	72.237 ^a	24	
0.05	0.002	2.806 ^b	2.876 ^b	3.235 ^a	3.082 ^{ab}	0.015	3.123 ^a	2.824 ^b	3.052 ^{ab}	24	فاکتور تسهیم ظاهری Apparent partitioning factor
0.381	0.395	9.726	9.550	8.501	10.958	0.092	8.153	10.073	10.826	8	
0.253	0.523	14.919	15.631	18.030	17.538	0.580	16.762	17.494	15.332	12	
0.338	0.974	19.152	17.523	18.660	19.034	0.759	20.052	17.973	17.753	24	متان CH ₄ , mL/500 mg DM

*میانگین های با حروف غیرمشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی دار هستند ($P < 0.05$).

Mean with different alphabets are statistically different ($P < 0.05$)

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که گونه‌های مختلف ریزجلبک (*اسپیرولینا*، *کلرلا* و *سندسموس*) از نظر ترکیب شیمیایی، ترکیبات زیست‌فعال و فراسنجه‌های تخمیری تفاوت معنی‌داری دارند. *اسپیرولینا* با بیشترین پروتئین خام و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، ارزش تغذیه‌ای بالاتری نشان داد، در حالی که *سندسموس* دارای بیشترین چربی خام و کلروفیل *b* بود. افزایش سطح ریزجلبک موجب افزایش حجم و پتانسیل تولید گاز و کاهش نرخ تولید آن شد. تجزیه‌پذیری ماده خشک در ۲۴ ساعت تحت تأثیر گونه و سطح قرار گرفت، به‌طوری‌که *اسپیرولینا* بیشترین و *کلرلا* کمترین مقدار را داشت. همچنین، افزایش سطح مصرف ریزجلبک باعث کاهش معنی‌دار تجزیه‌پذیری و نیتروژن آمونیاکی شد که می‌تواند نشان‌دهنده بهبود بالقوه کارایی استفاده از نیتروژن باشد. با این حال، اثر معنی‌داری بر تولید متان مشاهده نشد. در مجموع، پاسخ فراسنجه‌های تخمیری به ریزجلبک‌ها وابسته به گونه و سطح مصرف بوده و انجام مطالعات درون‌تنی برای تأیید این نتایج ضروری است.

منابع

- A El-Chaghaby, G., Rashad, S., F Abdel-Kader, S., A Rawash, E. S., & Abdul Moneem, M. (2019). Assessment of phytochemical components, proximate composition and antioxidant properties of *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* and *Spirulina platensis* algae extracts. *Egyptian Journal of Aquatic Biology and Fisheries*, 23(4), 521-526. <https://doi.org/10.21608/ejabf.2019.57884>
- AH, B. (2015). The effects of thymus plant on digestibility parameters and fermentable methane and CO₂ production of some feed by in vitro method. *Animal Science Research*, 24(4), 163-175. (In Persian)
- Anele, U. Y., Yang, W. Z., McGinn, P. J., Tibbetts, S. M., & McAllister, T. A. (2016). Ruminant in vitro gas production, dry matter digestibility, methane abatement potential, and fatty acid biohydrogenation of six species of microalgae. *Canadian Journal of Animal Science*, 96(3), 354-363. <https://doi.org/10.1139/cjas-2015-0141>.
- Antonius, A., Pazla, R., Putri, E. M., Negara, W., Laia, N., Ridla, M., & Marta, Y. (2023). Effectiveness of herbal plants on rumen fermentation, methane gas emissions, in vitro nutrient digestibility, and population of protozoa. *Veterinary World*, 16(7), 1477. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1477-1488>
- AOAC International. (2005). Official Methods of Analysis, 18th edition Official methods of analysis of AOAC international, Arlington, Virginia, US. Applications: A Brief Review. *Annals of the Entomological Society of America*, 112(6), 2019, 544-551
- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Becker, E. W. (2007). Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology advances*, 25(2), 207-210. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2006.11.002>.
- Blümmel, M., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 77(1-5), 24-34. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.1997.tb00734.x>
- Blümmel, M., Mgonezulu, R., Chen, X. B., Makkar, H. P. S., Becker, K., & Ørskov, E. R. (1999). The modification of an in vitro gas production test to detect roughage related differences in in vivo microbial protein synthesis as estimated by the excretion of purine derivatives. *The Journal of Agricultural Science*, 133(3), 335-340. <https://doi.org/10.1017/s0021859699006991>.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30. [https://doi.org/10.1016/s0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/s0023-6438(95)80008-5)
- 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).
- Buryakov, N. P., Sycheva, L. V., Trukhachev, V. I., Zaikina, A. S., Buryakova, M. A., Nikonov, I. N., & Aleshin, D. E. (2023). Role of Dietary Inclusion of Phytobiotics and Mineral Adsorbent Combination on Dairy Cows' Milk Production, Nutrient Digestibility, Nitrogen Utilization, and Biochemical Parameters. *Veterinary Sciences*, 10(3), 238. <https://doi.org/10.3390/vetsci1003023>.
- Chen, F., Qian, J., He, Y., Leng, Y., & Zhou, W. (2022). Could *Chlorella pyrenoidosa* be exploited as an alternative nutrition source in aquaculture feed? A study on the nutritional values and anti-nutritional factors. *Frontiers in Nutrition*, 9, 1069760. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.1069760>
- Čmíková, N., Kowalczewski, P. Ł., Kmiecik, D., Klimowicz, P., Drożdżyńska, A., Ślachciński, M., & Kačániová, M. (2025). Comparative analysis of nutritional composition and bioactive properties of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*: Implications for functional foods and dietary supplements. *Open Chemistry*, 23(1), 20250150. <https://doi.org/10.1515/chem-2025-0150>
- Cuendet, M., Hostettmann, K., Potterat, O., & Dyatmiko, W. (1997). Iridoid glucosides with free radical scavenging

- properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta*, 80(4), 1144-1152. <https://doi.org/10.1002/hlca.19970800411>
- Dębowski, M., Kazimierowicz, J., Świca, I., & Zieliński, M. (2022). Ultrasonic Disintegration to Improve Anaerobic Digestion of Microalgae with Hard Cell Walls—*Scenedesmus* sp. and *Pinnularia* sp. *Plants*, 12(1), 53. <https://doi.org/10.3390/plants12010053>
- Del Campo, J. A., García-González, M., & Guerrero, M. G. (2007). Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 74(6), 1163-1174.
- Dinpazhooh, Z., Niknezhad, S. V., Fadaei, F., Shaker, S., Najafpour, G., Ghasemi, Y., & Morowvat, M. H. (2022). North by southwest: Screening the naturally isolated microalgal strains from different habitats of Iran for various pharmaceutical and biotechnology applications. *International Journal of Microbiology*, 2022(1), 4386268. <https://doi.org/10.1155/2022/4386268>
- Feizdar Barabady, Y., Ghiasi, S. E., & Montazer Torbati, M. B. (2023). Effect of anionic Supplements and dietary anion-cation balance of dry cows on invitro Ruminal Fermentation properties. *Journal of Animal Science Research*, 33(1), 23-41. (In Persian) <https://doi.org/10.22034/AS.2021.43104.1595>.
- Getachew, G., Pittroff, W., Putnam, D. H., Dandekar, A., Goyal, S., & DePeters, E. J. (2008). The influence of addition of gallic acid, tannic acid, or quebracho tannins to alfalfa hay on in vitro rumen fermentation and microbial protein synthesis. *Animal feed science and technology*, 140(3-4), 444-461. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2007.03.011>
- Han, K. J., & McCormick, M. E. (2014). Evaluation of nutritive value and in vitro rumen fermentation gas accumulation of de-oiled algal residues. *Journal of animal science and biotechnology*, 5(1), 31. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-31>
- Kazemi, M. (2025). Algae as a sustainable feed resource: revolutionizing animal nutrition. *Aquaculture International*, 33(6), 535. <https://doi.org/10.1007/s10499-025-02195-2>
- Khodadadianzaghmari, F., Jahadi, M., & Goli, M. (2024). Biochemical profile of *Scenedesmus* isolates , with a main focus on the fatty acid profile. *May*, 5922–5931. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4254>
- Kholif, A. E., Gouda, G. A., Morsy, T. A., Matloup, O. H., Sallam, S. M., & Patra, A. K. (2023). Associative effects between *Chlorella vulgaris* microalgae and *Moringa oleifera* leaf silage used at different levels decreased in vitro ruminal greenhouse gas production and altered ruminal fermentation. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(3), 6001-6020. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-22559-y>.
- Kiani, A., Wolf, C., Giller, K., Eggerschwiler, L., Kreuzer, M., & Schwarm, A. (2020). In vitro ruminal fermentation and methane inhibitory effect of three species of microalgae. *Canadian Journal of Animal Science*, 100(3), 485-493. <https://doi.org/10.1139/cjas-2019-0187>
- Kotrbaček, V., Doubek, J., & Doucha, J. (2015). The chlorococcalean alga *Chlorella* in animal nutrition: a review. *Journal of Applied Phycology*, 27(6), 2173-2180. <https://doi.org/10.1007/s10811-014-0516-y>
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Jaakkola, S., & Vanhatalo, A. (2019). Different microalgae species as a substitutive protein feed for soya bean meal in grass silage based dairy cow diets. *Animal Feed Science and Technology*, 247, 112-126. <https://doi.org/10.1016/j.anifeeds.2018.11.005>.
- Lamminen, M., Halmemies-Beauchet-Filleau, A., Kokkonen, T., Vanhatalo, A., & Jaakkola, S. (2019). The effect of partial substitution of rapeseed meal and faba beans by *Spirulina platensis* microalgae on milk production, nitrogen utilization, and amino acid metabolism of lactating dairy cows. *Journal of dairy science*, 102(8), 7102-7117. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-16213>
- Li, Y., Bagnoud-Velasquez, M., Zhang, Y., Wang, K., Punčochářová, L., Kunz, C., ... & Niu, M. (2025). Effect of 10 freshwater microalgae on in vitro methane mitigation and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, 108(4), 3673-3689. <https://doi.org/10.3168/jds.2024-25749>
- Lichtenthaler, H. K., & Wellburn, A. R. (1983). Determinations of total carotenoids and chlorophylls a and b of leaf extracts in different solvents. <https://doi.org/10.1042/bst0110591>
- Lobo RR, Siregar MU, da Silva SS, Monteiro AR, Salas-Solis G, Vicente ACS, et al. Partial replacement of soybean meal with microalgae biomass on in vitro ruminal fermentation may reduce ruminal protein degradation. *J Dairy Sci* 2024;107:1460–71. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24016>.
- Lobo, R. R., Almeida, E., Monteiro, A., da Silva, S. S., Salas-Solis, G., Coronella, C. J., & Faciola, A. P. (2024). Replacing soybean meal with microalgae biomass in diets with contrasting carbohydrate profiles can reduce in vitro methane production and improve short-chain fatty acid production. *Journal of Dairy Science*, 107(8), 5542-5555. <https://doi.org/10.3168/jds.2023-24025>.
- I-Yahyaey, F., Al-Marzooqi, W., Shaat, I., Smith, M. A., Al-Sabahi, J., Melak, S., & Bush, R. D. (2023). Effect of *Spirulina platensis* Supplementation on Carcass Characteristics, Fatty Acid Profile, and Meat Quality of Omani Goats. In *Animals* (Vol. 13, Issue 18). <https://doi.org/10.3390/ani13182976>
- Maia, M. R., Chaudhary, L. C., Figueres, L., & Wallace, R. J. (2007). Metabolism of polyunsaturated fatty acids and their toxicity to the microflora of the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(4), 303-314.

- <https://doi.org/10.1007/s10482-006-9118-2>
- Makkar, H. P. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small ruminant research*, 49(3), 241-256. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(03\)00142-1](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(03)00142-1)
- Meehan, D. J., Cabrita, A. R., Silva, J. L., Fonseca, A. J., & Maia, M. R. (2021). Effects of *Chlorella vulgaris*, *Nannochloropsis oceanica* and *Tetraselmis* sp. supplementation levels on in vitro rumen fermentation. *Algal Research*, 56, 102284. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2021.102284>.
- Meteab, M. I., Khorshed, M. M., El-Essawy, A. M., Nassar, M. S., & El-Bordeny, N. E. (2025). In vitro gas production and rumen fermentation for diets containing increasing levels of *Panicum maximum* cv. Mombasa with or without spirulina. *Tropical Animal Health and Production*, 57(1), 25. <https://doi.org/10.1007/s11250-024-04262-x>.
- Molino, A., Iovine, A., Casella, P., Mehariya, S., Chianese, S., Cerbone, A., & Musmarra, D. (2018). Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. *International journal of environmental research and public health*, 15(11), 2436. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>
- Mota, C. S., Maia, M. R., Valente, I. M., Cabrita, A. R., & Fonseca, A. J. (2024). Ruminal inocula with distinct fermentation profiles differentially affect the in vitro fermentation pattern of a commercial algal blend. *Frontiers in Veterinary Science*, 11, 1346683. <https://doi.org/10.3389/fvets.2024.1346683>
- Nasehi, M., Entesarian, M., & Pourjamshidian, R. (2019). Comparison nutritive value of *Spirulina platensis* algae with some protein meals used in ruminant nutrition. *Research On Animal Production*, 10(24), 27-36. (In Persian) <https://doi.org/10.29252/rap.10.24.27>.
- Panjaitan, T., Quigley, S. P., McLennan, S. R., Swain, A. J., & Poppi, D. P. (2015). *Spirulina* (*Spirulina platensis*) algae supplementation increases microbial protein production and feed intake and decreases retention time of digesta in the rumen of cattle. *Animal Production Science*, 55(4), 535-543. <https://doi.org/10.1071/an13146>
- Rabee, A. E., Younan, B. R., Kewan, K. Z., Sabra, E. A., & Lamara, M. (2022). Modulation of rumen bacterial community and feed utilization in camel and sheep using combined supplementation of live yeast and microalgae. *Scientific reports*, 12(1), 12990. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16988-5>
- Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology* (Vol. 577): Wiley Online Library. <https://doi.org/10.1002/9780470995280>
- Salehian, Z., Khalilvandi-Behroozyar, H., Pirmohammadi, R., Ahmadifard, N., Almasi, H., Rodríguez, G. B., & Salem, A. Z. (2025). The effect of supplementing *Nannochloropsis oculata* microalgae on ruminal fermentation, methane production and microbial population. *Journal of Agriculture and Food Research*, 19, 101663. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2025.101663>
- Salehian, Z., Khalilvandi-Behroozyar, H., Pirmohammadi, R., Ahmadifard, N., Almasi, H., & Ramin, M. (2024). Investigating the effect of supplementing different levels of *Isochrysis galbana* on in vitro rumen fermentation parameters. *Animal Science Journal*, 95(1), e13929. <https://doi.org/10.1111/asj.13929>
- Schofield, P., Pitt, R. E., & Pell, A. N. (1994). Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of animal science*, 72(11), 2980-2991. <https://doi.org/10.2527/1994.72112980x>.
- Sucu, E. (2020). Effects of microalgae species on in vitro rumen fermentation pattern and methane production. *Annals of Animal Science*, 20(1), 207-218. <https://doi.org/10.2478/aoas-2019-0061>.
- Sucu, E. (2023). In vitro studies on rumen fermentation and methanogenesis of different microalgae and their effects on acidosis in dairy cows. *Fermentation*, 9(3), 229. <https://doi.org/10.3390/fermentation9030229>.
- Till, B. E., Huntington, J. A., Posri, W., Early, R., Taylor-Pickard, J., & Sinclair, L. A. (2019). Influence of rate of inclusion of microalgae on the sensory characteristics and fatty acid composition of cheese and performance of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10934-10946. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16391>.
- Van Emon, M. L., Loy, D. D., & Hansen, S. L. (2015). Determining the preference, in vitro digestibility, in situ disappearance, and grower period performance of steers fed a novel algae meal derived from heterotrophic microalgae. *Journal of Animal Science*, 93(6), 3121-3129. <https://doi.org/10.2527/jas.2014-8654>.
- Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of dairy science*, 74(10), 3583-3597. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(91\)78551-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(91)78551-2).
- Yadeghari, S., Malecky, M., Banadaky, M. D., & Navidshad, B. (2015, December). Evaluating in vitro dose-response effects of *Lavandula officinalis* essential oil on rumen fermentation characteristics, methane production and ruminal acidosis. In *Veterinary Research Forum* (Vol. 6, No. 4, p. 285).
- Zelege, A. W., Moorby, J., Ferris, C., & Huws, S. A. (2026). Effects of substituting soyabean meal and rapeseed meal with various microalgae species on in vitro rumen fermentation kinetics and methane production. *Algal Research*, 104653. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2026.104653>
- Zhao, J., Guo, Y., Zhang, P., Zeng, W., Fan, J., Chen, C., & Zhang, W. (2025). Recent research progress on the effects of microalgae on lipid metabolism in ruminants: A review of the gastrointestinal tract-brain axis. *Animal Nutrition*. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2025.09.002>