اثر عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر جمعیت کل باکتری‌ها، متانوژن‌ها و پروتوزوآ در شرایط برون تنی

فرشته علی‌پور[1]، علیرضا وکیلی[2]، محسن دانش‌مسگران [3]و هادی ابراهیمی[4]
۱.دانش آموخته دکتری تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۲-عضوهیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- عضوهیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
۴- عضوهیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
*ایمیل نویسنده مسئول: alipourf_63@yahoo.com

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر جمعیت کل باکتری‌ها، متانوژن‌ها و پروتوزوآ در شرایط برون‌تنی انجام شد. تیمارها شامل: تیمار ۱-جیره آزمایشی بدون افزودنی (شاهد)، تیمار ۲- جیره آزمایشی+ ۹ درصد ماده خشک از عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران و تیمار ۳- جیره آزمایشی + ۱۸ درصد ماده خشک از عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بودند که با مایع شکمبه انکوبه گردیدند. آزمایش تولید گاز تا ۲۴ ساعت در نظر گرفته شد و در پایان انکوباسیون جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه اعم از کل باکتری‌ها، متانوژن‌ها و پروتوزوآبا روش Real time -PCR تعیین گردید. تجزیه تحلیل کل داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی و با نرم افزار SAS ۹/۱ انجام گرفت. عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران در هر دو غلظت موجب افزایش معنی‌داری در کل جمعیت باکتری‌ها و کاهش معنی دار وابسته به غلظت در جمعیت پروتوزوآ و متانوژن‌ها شد. در مجموع، نتیجه‌ی این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران در بهبود تخمیر شکمبه از طریق کاهش جمعیت متانوزن تولید کننده متان و کاهش جمعیت پرتوزوآ در شرایط برون تنی نقش داشته است.

کلید واژه‌ها: تولید گاز، عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران، متانوژن‌ها

مقدمه

کشور ما از لحاظ جغرافیایی در منطقه خشک و نیمه خشک واقع شده است. به علت کمبود منابع آبی و نزولات جوی و کاهش ذخایر آب‌های زیر زمینی بویژه در سال‌های اخیر، تولید علوفه از لحاظ کمی و داشتن مراتع غنی جهت چرای دام کافی نمی‌باشد. در ایران همچون سایر کشورهای در حال توسعه، تغذیه بر پایه علوفه می‌باشد و استفاده از این علوفه‌ها با کیفیت پایین موجب کاهش بازده مصرف خوراک و اتلاف انرژی می‌شود. حدود ۲ تا ۱۵ درصد از انرژی مصرفی نشخوارکنندگان به صورت تولید متان اتلاف می‌شود که با کنترل و کاهش دادن این گاز می‌توان از اتلاف انرژی مصرفی جلوگیری کرد (الیس [1]و همکاران، ۲۰۰۷). از طرفی متان آزاد شده از نشخوارکنندگان به عنوان آلاینده زیست محیطی با تشکیل ۳۸ درصد گازهای گلخانه‌ای، یکی از مهمترین دلایل گرم شدن جهان است (الیس و همکاران، ۲۰۰۷). تغییرات جیره‌ای می‌تواند سبب کاهش دفع متان در دام‌ها شود(بنچار وگریدیا[2]، ۲۰۱۱). استفاده از گیاهان دارویی، اسانس و عصاره آن‌ها در جایگزینی آنتی‌بیوتیک‌ها و بهبود عملکرد شکمبه پیشنهاد شده است(سیروهی[3] و همکاران، ۲۰۱۲). برخی متابولیت‌های ثانویه در این گیاهان به عنوان ممانعت‌کننده‌های انتخابی از تولید متان جلوگیری می‌کنند(کامرا[4] و همکاران، ۲۰۰۸). گلبرگ زعفران یکی از محصولات فرعی زعفران می‌باشد که با تولید سالانه‌ی بیش از ۱۰هزار تن (کافی[5] و همکاران، ۲۰۰۶) به دلیل عدم شناخت کافی از آن دور ریخته‌می‌شود. گلبرگ یک منبع گیاهی غنی از مواد پلی فنلی، از جمله ترکیبات فلاونوئیدی و آنتوسیانین‌ها می‌باشند که مهمترین خصوصیات این ترکیبات خواص آنتی اکسیدانی آن‌ها می‌باشد(حسین زاده و یونسی[6]، ۲۰۰۲) .علیرغم اینکه گلبرگ یک منبع گیاهی غنی از مواد پلی فنلی است، نظر به اینکه کشت و تولید زعفران به ایران و چند کشور دیگر محدود است تاکنون مورد توجه قرار نگرفته است و تحقیقات بسیار اندکی روی آن انجام گرفته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران در جیره دام جهت بهبود شرایط تخمیر و عملکرد میکروارگانیسم‌های شکمبه در جهت کاهش تولید متان و آمونیاک می‌باشد.

1 Ellis
2 Benchaar and Greathea
3 Sirohi
4 Kamra
Kafi 5
6 Hosseinzadeh and Younesi

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران: نمونه‌های گلبرگ زعفران تازه از منطقه باخرز در استان خراسان رضوی برداشت شدند. پس از خشک کردن آن‌ها در سایه، با آسیاب با قطر الک ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. برای استخراج عصاره ۵۰ گرم پودر گلبرگ زعفران خشک شده در ۱۰۰۰ میلی لیتر الکل اتیلیک ۸۰ درصد ریخته شد و بر روی دستگاه همزن (GFL Orbital Shaker 3005) به مدت ۷۲ ساعت قرار گرفت. سپس محلول بدست آمده با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ فیلتر شد. محلول فیلتر شده به وسیله دستگاه روتاری اواپوراتور (Rotary evaporators LABOROTA 4000) تغلیظ و درنهایت، به وسیله دستگاه فریز درایر (ساخت کمپانی Martin Christ آلمان، مدل Beta2-8 LDplus) پودر لیوفلیزه به دست آمد و تا زمان انجام آزمایش‌ها در بطری‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تعیین کل ترکیبات فنولیک و فلاونوئید عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران: میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین سیوکالتو اندازه‌گیری شد(اسلینکارد و سینگلتون[1]، ۱۹۷۷) و محتوای کل فلاونوئیدها به روش رنگ سنجی آلومینیوم کلراید تعیین شد (چنگ[2] و همکاران،۲۰۰۲).

جیره آزمایشی و تیمارها: جیره آزمایشی با نسبت کنسانتره به علوفه ۶۰ به ۴۰ و از درصد اقلام جو ۳۳/۰۸، ذرت ۱۳/۳۳، کنجاله سویا ۱۲/۷۵، نمک ۰/۴۲، مکمل ویتامینی معدنی ۰/۲۱، سنگ آهک ۰/۲۱، یونجه ۲۷/۵۰، کاه گندم ۱۲/۵۰تشکیل شده است. تیمارها شامل: تیمار ۱– جیره آزمایشی بدون افزودنی (شاهد)، تیمار۲– جیره آزمایشی + ۹ درصد ماده خشک از عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران (۱۸ میلی‌گرم عصاره) و تیمار ۳– جیره آزمایشی + ۱۸ درصد ماده خشک ازعصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران (۳۶ میلی‌گرم عصاره) بودند.

روش تولید گاز: ابتدا ۲۰۰ میلی‌گرم از جیره آزمایشی در داخل ویال‌های ۱۲۵ میلی‌لیتری قرار داده شد و به تیمارهای حاوی عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران، غلظت‌های در نظر گرفته شده افزوده شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. مایع شکمبه قبل از تغذیه صبحگاهی از ۳ راس گوسفند فیستولا گذاری شده که در سطح نگهداری تغذیه می‌شدند (۷۰ به ۳۰ علوفه به کنسانتره) جمع آوری و صاف گردید. مایع شکمبه صاف شده و بزاق مصنوعی به نسبت ۱ مایع شکمبه به ۲ بزاق مصنوعی مطابق با روش منک و استینگاس[3] (۱۹۸۸) آزمایش گاز تولیدی تا ۲۴ در نظر گرفته شد.

تعیین جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه: تعیین کمی و شمارش میکروارگانیسم‌های شکمبه به صورت نسبی با دستگاه Real time PCR به وسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green با استفاده از دستگاه ABI ۷۳۰۰ (Applied Biosystems, Sequence Detection Systems. Foster City, CA) انجام شد.

آنالیز آماری: داده‌های مربوط به تمام آزمایش‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی تجزیه شدند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن با سطح احتمال خطای ۰/۰۵ انجام شد. از نرم افزار آماری SAS ویرایش ۹/۱ برای تجزیه تحلیل داده‌ها استفاده گردید.

نتایج و بحث

کل فنولیک و فلاونوئیدها: کل محتوای فنولی و فلاونوئیدی عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران اندازه گیری و تعیین شد. بر اساس این نتایج میزان کل فنولیک ۴/۲۹(میلی‌گرم اکی‌والان گالیک اسید در گرم پودر خشک عصاره) و کل فلاونوئیدها ۲/۷۵(میلی‌گرم اکی‌والان کوئرستین در گرم پودر خشک عصاره) گزارش شده است. در مطالعه گلی۴ و همکاران (۲۰۱۲) میزان کل فنولیک در گلبرگ زعفران ایرانی ۳/۴۲ میلی‌گرم اسید گالیک در گرم وزن خشک و در تحقیق تیرمنتزی و کوکالوا ۵ (۲۰۰۸) این میزان برای گلبرگ زعفران یونانی ۱/۳۸ میلی گرم کافئیک اسید در گرم وزن خشک گزارش شد. اما در اختلافی بزرگ با نتایج این مطالعه میزان کل فنولیک و فلاونوئید گلبرگ زعفران ۶۵/۳۴ و ۶۰/۶۴ گزارش شد (جادوعلی[6] و همکاران،۲۰۱۷) تفاوت در مقادیر کمی ترکیبات فیتوشیمیایی از جمله ترکیب‌های فنلی و فلاونوئیدی در بین توده‌های مناطق مختلف می‌تواند ناشی از تنوع ژنتیکی یا شرایط اکولوژیکی حاکم بر رویشگاه‌ها (دودارو[7] و همکاران،۲۰۰۴) و یا تفاوت در روش استخراج و شرایط نگهداری عصاره باشد.

اثر عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه

نتایج این مطالعه نشان داد که هر دو غلظت عصاره موجب افزایش معنی داری در کل جمعیت باکتری‌ها در مقایسه با تیمار شاهد شده‌اند (P<۰/۰۵). از سویی دیگر جمعیت پروتوزوآ و کل متانوژن‌ها در شکل وابسته به غلظت به طور معنی داری در تیمارهای عصاره گلبرگ در مقایسه با تیمار شاهد کاهش پیدا کردند (P <۰/۰۵). احتمالا یک دلیل افزایش جمعیت باکتریایی در حضور عصاره در این مطالعه می‌تواند مربوط به کاهش جمعیت پروتوزوآ به عنوان عامل باکترولیتیک باشد (راموس– مولارس و همکاران، ۲۰۱۸). به نظر می‌رسد که گیاهان دارویی و عصاره‌ی آن‌ها تاثیر انتخابی بر

1 Slinkard and Singleton
2 Change
3 Menke and Steingass
4 Goli
5| Termentzi and Kokkalou
6 Jadouali
7 Dudareva

باکتری‌های شکمبه داشته‌اند به گونه‌ای که به صورت انتخابی موجب جلوگیری از عملکرد میکروب‌های مضر می‌شوند (کامرا[1] و همکاران،۲۰۰۸). نتایج حاضر، نتایج کیم[2] و همکاران (۲۰۱۵) و هریستو[3] و همکاران (۲۰۰۴) را تایید می‌نماید. آن‌ها گزارش کردند که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در

جدول۱- اثر غلظت‌های مختلف عصاره هیدروالکلی گلبرگ زعفران بر جمعیت میکروارگانیسم‌ها پس از ۲۴ ساعت کشت در شرایط برون تنی

میکروارگانیسم‌ها	شاهد	شاهد+۱۸ میلی‌گرم عصاره	شاهد+ ۳۶ میلی‌گرم عصاره	SEM	P- value
کل باکتری‌ها	۱/۷۱^{b}	۲/۵۲^{b}	۴/۸۶^{a}	۰/۱۵	۰/۰۰۰۱
متانوژن‌ها	۷/۵۸^{a}	۴/۵۳^{b}	۳/۱۱^{c}	۰/۱۹	۰/۰۰۰۱
پروتوزوآ	۹/۳۸^{a}	۴/۲۲^{b}	۰/۷۸^{c}	۰/۲۰	۰/۰۰۰۱

حروف غیر مشابه در هر ردیف بیانگر تفاوت معنی دار بین میانگین تیمارهای آزمایشی می‌باشد (P<۰/۰۵). SEM: میانگین خطای استاندارد، P-value: سطح معنی داری (P<۰/۰۵).

شرایط برون‌تنی موجب افزایش معنی‌دار در جمعیت کل باکتری‌ها شده است. جمعیت پروتوزوآ شکمبه تحت تاثیر عوامل مختلفی چون pH، ترکیب جیره، مقدار خوراک، دفعات خوراک دهی، نرخ باز چرخ و عوامل افزودنی مانند گیاهان دارویی یا اسانس و عصاره‌ی آن‌ها قرار می‌گیرند (فرانزولین و دهوریتی[4]، ۱۹۹۶). اثر گیاهان یا عصاره و اسانس آن‌ها به نوع و میزان متابولیت‌های ثانویه موجود در آن‌ها بستگی دارد. در توجیه کاهش جمعیت پروتوزوآ در مطالعه حاضر می‌توان به فعالیت ضد پروتوزوآیی متابولیت‌های ثانویه موجود در عصاره اشاره کرد(مک آلیستر ونیوبولد[5]، ۲۰۰۸). احتمالا برخی ترکیبات موثر از بین متابولیت‌های ثانویه از طریق ایجاد پیوند با استرول غشای سلول‌های پروتوزوآ سبب نفوذ پذیری و در نهایت تجزیه آن‌ها می‌شوند (نیوبولد و همکاران، ۱۹۹۵). همچنین ساختارهای فنولی موجود در عصاره این گیاه می‌توانند از طریق غیر فعال کردن آنزیم‌ها، کاهش بستره و یون‌های فلزی لازم برای ساخت سلول یا از طریق پاره کردن غشای سلول کاهش جمعیت پروتوزوآ را موجب شده باشند (ابرقویی و روزبهان،۱۳۹۲). در مطالعه‌ی گسترده از کامرا و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی ۹۲ عصاره از ۳۱ گیاه بر جمعیت میکروارگانیسم‌های شکمبه در شرایط برون تنی، نشان داده شد که عصاره‌های ۱۴ گیاه دارای اثرات ضد پروتوزوآیی بودند. این گیاهان غنی از تانن و ترکیبات فنولیک، روغن‌های ضروری و ساپونین گزارش شدند. اثر متابولیت‌های ثانویه بر فعالیت متانوژن‌ها می‌تواند مستقیم و یا غیر مستقیم باشد. در ارتباط با کاهش جمعیت متانوژن‌ها در این مطالعه یک علت را می‌توان مربوط به اثرات مخالف مستقیم ترکیبات طبیعی حاوی فلاونوئیدها بر خود متانوژن‌ها (پاترا وساکسنا،[6] ۲۰۱۰)[7] با جلوگیری از عملکرد غشای سیتوپلاسمی، جلوگیری از سنتزدیواره سلولی آنها و یا جلوگیری از سنتز اسیدنوکلئیک دانست(کوشین ولام، ۲۰۰۵). علت دیگر را می‌توان مربوط به اثرات ضد پروتوزوآیی ترکیبات فنولیک دانست، چرا که در شکمبه یک بخش از متانوژن‌ها با پروتوزوآ در ارتباط هستند و نوعی رابطه همزیست بین پروتوزوآ و متانوژن‌ها گزارش شده است (استوم[8] و همکاران،۱۹۸۹).

منابع

ابرقویی، م. ج. و روزبهان، ی. ۱۳۹۲. تاثیر عصاره‌ی تفاله‌ی انگور بر پارامترهای تولید گاز و جمعیت تک یاخته‌های شکمبه با استفاده از شیرابه شکمبه گوسفند. نشریه علوم دامی ایران، ص. ۴۴ (۴): ۳۷۵-۳۸۴.

Benchaar, C. and Greathead, H. 2011. Essential oils and opportunities to mitigate enteric methane emissions from ruminants. Animal Feed Science and Technology, 166: 338-355.

Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M. and Chern, J.-C. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10: 178-182.

Cushnie, T.T. and Lamb, A.J. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents, 26: 343-356.

Dudareva, N., Pichersky, E. and Gershenzon, J. 2004. Biochemistry of plant volatiles. Plant physiology, 135(4): 1893-1902.

1 Kamra
2 Kim
3 Hristov
4 Franzolin and Dihority
5 McAllister and Newbold
6 Patra and Saxena
7 Stumm

Ellis, J. L., Kebreab, E., Odongo, N. E., McBride, B. W., Okine, E. K. and France, J. 2007. Prediction of methane production from dairy and beef cattle. Journal of Dairy Science, 90(7): 3456-3466.

Franzolin, R. and Dihority, B. A. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. Journal of Animal Science, 74: 2803-2809.

Goli, S.A.H., Mokhtari, F. and Rahimmalek, M. 2012. Phenolic compounds and antioxidant activity from saffron (Crocus sativus L.) petal. Journal of Agricultural Science, 4: 175.

Hosseinzadeh, H. and Younesi, H. M. 2002. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Crocus sativus L. stigma and petal extracts in mice. BMC pharmacology, 2(1): 7.

Hristov, N., Ivan, M. and McAllister, TA. 2004. In vitro effects of individual fatty acids on protozoan numbers and on fermentation products in ruminal fluid from cattle fed a high-concentrate, barely-based diet. Journal of Animal Science, 82: 2693–2704.

Jadouali, S., Atifi, H., Bouzoubaa, Z., Majourhat, K., Gharby, S., Achemchem, F., Elmoslih, A., Laknifli, A. and Mamouni, R. 2017. Chemical characterization, antioxidant and antibacterial activity of Moroccan Crocus sativus L petals and leaves. Journal of Materials and Environmental Sciences, 9: 113-118.

Kafi, M., Koocheki, A. and Rashed, M. H. (Eds.). 2006. Saffron (Crocus sativus): production and processing. Science Publishers. 39-57.

Kamra, D. N., Patra, A. K., Chatterjee, P. N., Kumar, R., Agarwal, N. and Chaudhary, L. C. 2008. Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48(2): 175-178.

Kim, E.T., Le Luo Guan, S.J.L., Lee, S.M., Lee, S.S., Lee, I.D., Lee, S.K. and Lee, S.S. 2015. Effects of flavonoid-rich plant extracts on in vitro ruminal methanogenesis, microbial populations and fermentation characteristics. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 28: 530-537.

McAllister, T. A. and Newbold, C. J. 2008. Redirecting rumen fermentation to reduce methanogenesis. Australian Journal of Experimental Agriculture, 48(2): 7-13.

Menke, K. H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysesand gas production using rumen fluid. Animal Research and Development, 28: 7-55.

Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E., and McEwan, N. R. 2015. The role of ciliate protozoa in the rumen. Frontiers in microbiology, 6:1313.

Patra, A.K. and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Phytochemistry, 71: 1198-1222.

Ramos-Morales, E., Rossi, G., Cattin, M., Jones, E., Braganca, R. and Newbold, C. J. 2018. The effect of an isoflavonid-rich liquorice extract on fermentation, methanogenesis and the microbiome in the rumen simulation technique. FEMS microbiology ecology,94(3): fiy009.

Sirohi, S. K., Goel, N.and Pandey, P. 2012. Efficacy of different methanolic plant extracts on anti-methanogenesis, rumen fermentation and gas production kinetics in vitro.Open Veterinary Journal. 2(1): 72-77.

Slinkard, K. and Singleton, V.L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture, 28: 49-55.

Stumm, CK., Gijzen, H J. and Vogels, GD.1989. Association of methanogenic bacteria with ovine rumen ciliates. British Journal of Nutrition, 47:95–99.

Termentzi, A. and Kokkalou, E. 2008. LC-DAD-MS (ESI+) analysis and antioxidant capacity of Crocus sativus petal extracts. Planta Medica, 74: 57

Effect of hydroalcoholic extract of saffron petal on total bacteria, methanogens and protozoa population in *in vitro*

F. Alipour[1], A.R. Vakili[2], M. Danesh Mesgaran[3] and H. Ebrahimi[4]
Fereshteh. Alipour[1], Alireza. Vakili[2], M. Danesh Mesgaran [3]and Hadi. Ebrahimi[4]

[1]Graduated of Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

[2]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[3]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[4]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Abstract
This experiment was conducted to evaluate the effect of various concentrations of saffron petals hydroalcoholic extract on microorganism's population in *in vitro*. The treatments consisted of: Treatment 1-experimental diet without additive (control), Treatment 2-experimental diet + 9% dry matter of SPE and Treatment 3- experimental diet + 18% dry matter of SPE, which was incubated with rumen fluid. Used of gas production test of 24h for measured of the population of ruminal microorganisms, including methanogens, protozoa and total bacteria total. Data analysis was performed in a completely randomized design with SAS 9.1. Saffron petal extract in both concentrations caused a significant increase in total bacterial population and a significant decrease in the dose-dependent form in protozoa and total methanogens. In conclusion, the results of this study showed that saffron petals hydroalcoholi extract had a desirable effect on rumen fermentation via reduce of the methanogens and protozoa population in *in vitro*.
Keyword; Gas production, Saffron petal hydroalcoholic extract Methanogens