نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۸ شماره ۱/ سال۱۳۹۷/ صفحات ۹۳ تا ۱۰۸

تأثیر انواع بنتونیت‌های سدیمی، کلسیمی، فرآوری شده و طبیعی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در شرایط برون‌تنی

مرتضی خباز سیرجانی[۱]، عبدالمنصور طهماسبی[۲*]، عباسعلی ناصریان[۲]، حسن کرمانشاهی[۲]، محسن کاظمی[۳]، آمنه اسکندری تربقان[۴] و الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی[۳]

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۲/۳ تاریخ پذیرش: ۹۶/۳/۲۸

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

[۲] استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

[۳] استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

[۴] مربی گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده علوم پزشکی تربت‌جام

[*] مسئول مکاتبه: Email: a.tahmasbi@lycos.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: بنتونیت یک ترکیب آلومینوسیلیکاته بوده که در تغذیه نشخوارکنندگان کاربرد فراوان دارد. **هدف:** آزمایشاتی با هدف بررسی اثر انواع بنتونیت‌های سدیمی، کلسیمی، فرآوری شده و طبیعی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در شرایط برون‌تنی انجام شد. **روش کار:** در آزمایش اول، غلظت نیتروژن آمونیاکی در یک محیط کشت حاوی بنتونیت‌های فرآوری شده (درصد جرمی اسید سولفوریک به بنتونیت ۱۰، ۱۵ و ۲۰) و طبیعی در زمان‌های ٤ و ٢٤ ساعت انکوباسیون مورد مقایسه قرار گرفت و در آزمایش دوم، اثر اضافه کردن سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا کلسیم در زمان‌های مختلف انکوباسیون بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در یک محیط کشت حاوی جیره‌های غذایی با پروتئین تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای متفاوت، مورد بررسی قرار گرفت. **نتایج:** غلظت نیتروژن آمونیاکی پس از ٤ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<۰/۰۵$) به‌طوری‌که کمترین غلظت در تیمار ۱۵ درصد و بیشترین مقدار در تیمار ۲۰ درصد مشاهده گردید. در آزمایش دوم غلظت نیتروژن آمونیاکی برای جیره‌های با پروتئین تجزیه‌پذیر بالا در زمان‌های ۲ و ٤ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر تیمارها قرار گرفت ($P<۰/۰۵$) به‌طوری‌که کمترین مقدار در جیره‌های حاوی ۲ درصد بنتونیت سدیم و بیشترین نیز در تیمار شاهد مشاهده گردید. همچنین غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره‌های با پروتئین تجزیه‌پذیر کم، تنها در زمان ٤ ساعت پس از انکوباسیون تحت تأثیر نوع تیمارها قرار گرفت ($P<۰/۰۵$). **نتیجه‌گیری نهایی:** نتایج نشان داد غلظت نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر فرآوری بنتونیت و یا نوع بنتونیت سدیمی یا کلسیمی قرار گرفته و بیشترین جذب نیتروژن آمونیاکی در ساعات اولیه انکوباسیون (۲ و ٤ ساعت) مشاهده گردید.

واژگان کلیدی: نیتروژن آمونیاکی، بنتونیت، برون‌تنی، انکوباسیون

مقدمه

امروزه با توجه به روند رو به رشد جمعیت در دنیا، نیاز به تهیه و مصرف فرآورده‌های دامی، روز به روز در حال افزایش می‌باشد. با توجه به اینکه هنوز هم بخشی از فرآورده‌های دامی از سایر کشورها به ایران وارد می‌شود، بنابراین استفاده از علم و بکار بستن آن در جهت تولید بیشتر این محصولات جهت خودکفایی کشور، یک امر ضروری به‌نظر می‌رسد. یکی از دلایل ضعف کشور ما در تولید فرآورده‌های دامی به‌ویژه گوشت قرمز، عدم استفاده صحیح از مواد خوراکی و مصرف جیره‌های غذایی نامتوازن می‌باشد. در حال حاضر یکی از راه‌حل‌های افزایش تولید، استفاده بیشتر از مواد متراکم در جیره دام‌ها می‌باشد. انجام این امر در صورتی موفقیت آمیز خواهد بود که با استفاده از مواد قابل دسترس، عوارض سوء ناشی از مصرف زیاد مواد متراکم در جیره دام‌ها را به حداقل رسانده و بازده استفاده از خوراک را افزایش داد. یکی از مواد متراکم پرکاربرد در تغذیه دام‌ها، پروتئین می‌باشد که استفاده بهینه از آن مخصوصاً NPN، می‌تواند هم از نظر اقتصادی و هم از نظر عملکرد دام حائز اهمیت باشد (آقاشاهی و همکاران ۱۳۸٤). با توجه به اینکه پروتئین، گران‌ترین بخش خوراکی در جیره‌های نشخوارکنندگان محسوب می‌شود، این موضوع باعث شده تا تحقیقات زیادی در جهت بهبود استفاده از منابع پروتئینی در تغذیه نشخوارکنندگان صورت پذیرد (سینکلیر و همکاران ۲۰۱٤). در مجموع بازدهی تبدیل نیتروژن خوراک به پروتئین‌های حیوانی مثل شیر و گوشت در نشخوارکنندگان پایین بوده به‌طوری‌که در گاوهای شیری تنها ۲۵ تا ۳۰ درصد از نیتروژن برای سنتز پروتئین شیر مورد استفاده قرار می‌گیرد و ۷۰ تا ۷۵ درصد آن از طریق ادرار و مدفوع دفع می‌گردد (بکوئیتی و همکاران ۱۹۹۸). همچنین بازدهی استفاده از نیتروژن در گاوهای گوشتی بسیار پایین بوده و تنها در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از نیتروژن مصرفی در بافت‌ها ابقا می‌گردد (بیرمن و همکاران ۱۹۹۹). نرخ بهره‌وری پایین و همچنین دفع مواد نیتروژنی از طریق ادرار و مدفوع باعث ایجاد ضررهای گسترده‌ای به محیط زیست می‌شود (گالین ۱۹۹٦)، همچنین منشأ نیتروژن دفعی از طریق مدفوع عمدتاً شامل خوراک غیر قابل هضم، پروتئین میکروبی و نیتروژن با منشا آندوژنوس می‌باشد. در صورتی‌که منشأ نیتروژن دفعی از طریق ادرار، عمدتاً ناشی از هدر رفت نیتروژن از شکمبه در نتیجه تجزیه بیش از اندازه پروتئین بوده که جزو یکی از مشکلات اساسی در رابطه با ناکارآمدی استفاده از نیتروژن در نشخوارکنندگان محسوب می‌گردد که این نیتروژن دفعی ممکن است به آب‌های زیرزمینی نفوذ کرده و باعث آلودگی محیط زیست گردد (ون هورن و همکاران ۱۹۹٦). نرخ و میزان پروتئولیز در شکمبه نه تنها سنتز پروتئین میکروبی، بلکه کمیت و کیفیت اسیدهای آمینه جیره‌ای رسیده به دوازده را نیز تحت تأثیر قرار می‌دهد (استرن و همکاران ۱۹۹٤). یکی از ترکیبات مهم مورد مصرف باکتری‌های شکمبه جهت سنتز پروتئین میکروبی، نیتروژن آمونیاکی شکمبه می‌باشد. نیتروژن آمونیاکی عمدتاً در نتیجه تجزیه پروتئین‌ها، اسیدهای آمینه و اوره در شکمبه حاصل می‌شود (برودریک و همکاران ۲۰۰۹ و سئو و همکاران ۲۰۱۰ و سینکلیر و همکاران ۲۰۱٤). به‌طور کلی مقداری از این منبع نیتروژنی به مصرف باکتری‌ها رسیده و مازاد آن از طریق دیواره شکمبه وارد خون شده و در کبد تبدیل به اوره می‌گردد و وقتی مقدار آمونیاک رسیده به کبد بیش از ظرفیت کبد در تبدیل آن به اوره باشد سبب تجمع آمونیاک و اتلاف منابع پروتئین می‌شود (ویکرشام و همکاران ۲۰۰۸). یکی از مواد قابل دسترس در کشور ما که می‌تواند باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه و استفاده مؤثرتر از آن جهت سنتز پروتئین میکروبی شود بنتونیت است. بنتونیت با توجه به ساختار فیزیکی و شیمیایی خود از یک سو به‌واسطه جذب سطحی

پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه تا حدی آنها را از تخمیر میکروبی محافظت کرده که این باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه می‌شود و از طرف دیگر به‌خاطر خاصیت تبادل یونی، سبب می‌شود یون آمونیوم با کاتیون‌های موجود در ساختمان آن مبادله گردد و سپس با آزادسازی آهسته یون آمونیوم موجب استفاده مؤثرتر میکروارگانیسم‌های شکمبه از این مواد برای سنتز پروتئین میکروبی گردد (نیکخواه و همکاران ۲۰۰۱). بهینه‌سازی موازنه‌ی میان سنتز پروتئین میکروبی و تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه‌ی نشخوارکنندگان، به‌طور بالقوه می‌تواند موجب بهینه شدن کارآیی تولید و کاهش دفع نیتروژن به محیط و در نهایت آلودگی محیط زیست گردد. همچنین استفاده از بنتونیت می‌تواند باعث جذب پروتئین گردد (انسمینگر و جیسکینگ ۱۹٤۱). همچنین اضافه کردن بنتونیت باعث تجزیه آهسته‌تر پروتئین توسط میکروارگانیسم‌های خاک می‌گردد (پینک و همکاران ۱۹٥٤). در مطالعه‌ای تولید شیر در میش‌های بلوچی در اثر افزودن بنتونیت به جیره آن‌ها، افزایش یافت (کاظمی و همکاران ۲۰۱۷). فعال‌سازی عبارتست از جایگزینی یون هیدروژن موجود در برخی از مواد شیمیایی مثل اسید سولفوریک با کاتیون‌های بین لایه‌ای در ساختار بنتونیت که این پدیده سبب بوجود آمدن یا تقویت مکان‌های فعال در سطح بنتونیت شده که در نتیجه میزان تجمع یون هیدروژن در سطح آن‌را افزایش می‌دهد و از آنجا که عمل جذب نیز بر روی این مکان‌ها صورت می‌گیرد، بنابراین هر چقدر این مکان‌ها بیشتر، فعال‌تر و در دسترس‌تر باشند عمل جذب با راندمان بالاتری صورت گرفته و در حقیقت فعال‌سازی بنتونیت منجر به بهبود ویژگی‌های جذبی بنتونیت می‌گردد (کاشانی مطلق و همکاران ۲۰۱۱ و امیری ریگی ۱۳۸٦). بنابراین این آزمایش با هدف بررسی کارآیی انواع مختلفی از بنتونیت‌های طبیعی، فرآوری شده، سدیمی و یا کلسیمی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی در شرایط برون‌تنی با هدف بهبود کارآیی جذب و آزادسازی آن در شرایط برون‌تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

تهیه و فرآوری بنتونیت

نمونه‌هایی از ترکیبات آلومینوسیلیکاته بنتونیتی (ترکیب بنتونیت سدیم: ٦۹٪SiO2، ۱۱/۷۱٪Al2O3، ۰/۰٤٪BaO، ۱/٥٦٪CaO، ۱/۹۹٪Fe2O3، ۱/۱۳٪K2O، ۱/۸۲٪MgO، ۰/۰٤٪MnO، ۳/۰۸٪Na2O، ۰/۰۸٪P2O5، ۱/۱۷٪SO3، ۰/۱٦٪TiO2، ۰/۰۱>٪Cr2O3، ۸/۲۲٪LOI و ترکیب بنتونیت کلسیم: ٦٤/٦۳٪SiO2، ۱۰/۰۲٪Al2O3، ۰/۰٦٪BaO، ٤/٦۸٪CaO، ۲/۲۱٪Fe2O3، ۰/٤٪K2O، ۱/٥٪MgO، ۰/۰٥٪MnO، ۲/۱٪Na2O، ۰/۰۸٪P2O5، ۲/۳۱٪SO3، ۰/۳٪TiO2، ۰/۰۱>٪Cr2O3، ۱۱/٦٦٪LOI) از گروه ویوان به‌صورت پودری تهیه گردید. برای تهیه نمونه شماره ۱ (شاهد)، محلول سوسپانسیونی از ٥۰ گرم بنتونیت سدیم همراه با ٤۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. سپس با استفاده از فیلتراسیون خلأ قسمت جامد سوسپانسیون از مایع جدا گردید و نمونه حاصله به مدت ۲٤ ساعت در آون با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در مرحله آخر آسیاب (غربال یک میلی‌متری) گردید. در تهیه نمونه شماره ۲ نیز سوسپانسیونی از ٥۰ گرم بنتونیت سدیم همراه با ۳٥۰ میلی‌لیتر آب مقطر تهیه گردید. در این نمونه با توجه به اینکه درصد جرمی اسید به بنتونیت سدیم ۱۰ در نظر گرفته شده بود (به ازای هر ۱۰ گرم بنتونیت، یک گرم اسیدسولفوریک اضافه شد)، مقدار ٥ گرم از اسید سولفوریک مرک با خلوص بالا (۹٥-۹۷ درصد) همراه با ٥۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق گردید. سپس قبل از افزودن اسید به بنتونیت به علت اینکه دمای فعال‌سازی ۹۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شده بود دمای سوسپانسیون اولیه به ۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و در طول مدت فعال‌سازی (۲ ساعت) نیز این دما حفظ گردید، همچنین در این مدت به‌منظور همگن

نگهداشتن محیط واکنش از همزن مغناطیسی استفاده گردید. سپس با استفاده از فیلتراسیون خلأ قسمت جامد سوسپانسیون از مایع جدا گردید در ادامه نمونه حاصله به مدت ٢٤ ساعت در آون با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و در مرحله آخر نمونه فعال‌شده، آسیاب گردید. روش کار مربوط به تهیه نمونه‌های ۳ (مدت فعال‌سازی ٤ ساعت و درصد جرمی اسید به بنتونیت ۱۰)، ٤ (مدت فعال‌سازی ۲ ساعت و درصد جرمی اسید به بنتونیت ۱۵:)، ٥ (مدت فعال‌سازی، ٤ ساعت و درصد جرمی اسید به بنتونیت ۱۵: به ازای هر ۷/٥ گرم بنتونیت، یک گرم اسید سولفوریک اضافه شد)، ٦ (مدت فعال‌سازی، ۲ ساعت و درصد جرمی اسید به بنتونیت ۲۰) و ۷ (مدت فعال‌سازی، ٤ ساعت و درصد جرمی اسید به بنتونیت ۲۰: به ازای هر ٥ گرم بنتونیت یک گرم اسید سولفوریک اضافه شد) مشابه نمونه ۲ بود با این تفاوت که مدت زمان فعال‌سازی و درصد جرمی اسید به بنتونیت، برای آن‌ها متفاوت در نظر گرفته شد.

مواد خوراکی و محیط کشت آزمایش اول

مواد خوراکی استفاده شده در این مرحله شامل جو آسیاب شده (۲ میلی‌متری) به‌عنوان منبع انرژی، اوره به‌عنوان منبع نیتروژن و نمونه بنتونیت فرآوری شده بر اساس دستورالعمل گفته شده در بخش مواد و روش‌ها بود و ترکیب آن شامل ۵۰ درصد جو، ٤۰ درصد اوره و ۱۰ درصد بنتونیت فرآوری شده بود. سطح بنتونیت به این جهت بالا در نظر گرفته شد تا اثر آن بر غلظت نیتروژن آمونیاکی برای ما پررنگ‌تر گردد. مایع شکمبه از سه رأس گوسفند نر بلوچی دارای فیستولای شکمبه‌ای (با میانگین وزن ٢/٥±٤٩/٥) گرفته شد. گوسفندان با یک جیره حاوی ۰/٦ کیلوگرم یونجه خشک و ۰/٤ کیلوگرم کنسانتره تغذیه می‌شدند (کنسانتره حاوی ٢٤ درصد ذرت آسیاب شده، ۲۰/٤ درصد جو آسیاب شده، ۲۷ درصد کنجاله سویا، ۱۳/۸ درصد کنجاله کانولا، ۱۳/۸ درصد سبوس گندم، ۰/۳ درصد کربنات کلسیم، ۰/۲ درصد نمک و ۰/٥ درصد مکمل مینرالی-ویتامینی بود). نمونه‌ی مایع شکمبه گرفته شده از گوسفندان با یکدیگر مخلوط و با پارچه تنزیب چهار لایه صاف و بلافاصله در داخل بن‌ماری ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های آزمایشی به‌همراه ۳۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه مخلوط شده با بزاق مصنوعی (مک دوگال ۱۹٤۸) با نسبت ۱ به ۲، در داخل شیشه‌های ۱۲٥ میلی‌لیتری ریخته شد (منک و استینگاس ۱۹۸۸) و بلافاصله سر شیشه‌ها با استفاده از رابر پلاستیکی و کپ آلومینیومی به‌وسیله دستگاه کریمپر پلمپ شد و در داخل حمام آب گرم ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شدند (تئودورو و همکاران ۱۹۹٤). برای کنترل و تصحیح داده‌ها، شش نمونه شاهد (فاقد ماده خوراکی و بنتونیت) در حمام بن‌ماری قرار داده شد و در زمان‌های مختلف انکوباسیون (برای نمونه‌گیری و تعیین نیتروژن آمونیاکی در آزمایش اول، درب شیشه‌ها در زمان‌های ٤ و ٢٤ ساعت پس از انکوباسیون باز شد و برای آزمایش دوم درب شیشه‌ها در زمان‌های ۲، ٤، ۸، ۱۲ و ٢٤ ساعت باز شد) شیشه‌های مورد نظر برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی از بن ماری خارج گردید. به فاصله زمانی هر دو ساعت یک‌بار، گاز انباشته شده در داخل شیشه‌های آزمایشی از طریق سوزن خارج می‌گردید تا غلظت نیتروژن آمونیاکی، تحت تأثیر تجمع گاز در محیط کشت قرار نگیرد. برای هر تیمار شش تکرار در نظر گرفته شد.

مواد خوراکی و محیط کشت آزمایش دوم

ترکیب (درصد ماده خشک) مواد خوراکی آزمایش دوم در جدول ۱ آورده شده است. محیط کشت آزمایش دوم مشابه آزمایش اول بود و تنها ترکیب اجزاء خوراکی بکار رفته در این آزمایش (جدول ۲) متفاوت بود.

جدول ۱- ترکیب (درصد ماده خشک) مواد خوراکی آزمایش دوم

Table 1- Feed ingredients (% of DM) of the second experiment

اجزا (درصد جیره) Ingredients (% of diet)	شماره جیره Diet number							
	1	2	3	4	5	6	7	8
جو Barley	34	34	34	34	29	29	29	29
ذرت Corn	34	33	31.5	30.5	29	28	27	26
کنجاله سویا Soybean meal	0	0	0	0	8	8	8	8
پودر ماهی Fish meal	0	0	0.5	0.5	4	4	4	4
اوره Urea	2	2	2	2	0	0	0	0
سبوس گندم Wheat bran	10	10	10	10	10	10	10	10
یونجه Alfalfa	20	20	20	20	20	20	20	20
بنتونیت سدیم یا کلسیم[1] Sodium or calcium bentonite	0	1	2	3	0	1	2	3
ترکیب جیره (درصد ماده خشک) Chemical composition (% of DM)								
پروتئین خام Crude Protein	19.2	19.1	19.3	19.2	18.8	18.7	18.6	18.4
پروتئین قابل تجزیه در شکمبه (درصدی از پروتئین خام) Rumen Degradable Protein (% of CP)	15.2	15.1	15.2	15.1	12.1	12.1	12	11.9
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral Detergent Fiber	22.9	22.8	22.6	22.5	22.6	22.5	22.4	22.2
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid Detergent Fiber	11.7	11.7	11.6	11.6	12	12	11.9	11.9
چربی خام Crude fat	3.1	3	3	3	3.1	3	3	3
انرژی متابولیسمی (مگاکالری در کیلوگرم ماده خشک) Metabolism Energy (Mcal/KgDM)	2.38	2.37	2.38	2.37	2.44	2.44	2.44	2.44

[1] در این جدول دو جیره با تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای متفاوت (کم: میانگین ۱۲/۰۲ ٪ و زیاد: میانگین ۱۵/۱۵ ٪) در نظر گرفته شده است. برای هر جیره با تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای متفاوت، چهار سطح بنتونیت سدیمی (۰، ۱، ۲ و ۳ درصد) و چهار سطح بنتونیت کلسیم (۰، ۱، ۲ و ۳ درصد) نیز در نظر گرفته شده است.

[1] In this table, two diets with different rumen degradability (low: mean of 12.22 % and high: mean of 15.15 %) are considered. For each diet with different ruminal degradability, four levels of sodium bentonite (0, 1, 2 and 3 %) and four levels of calcium bentonite (0, 1, 2 and 3%) is also considered.

به‌طوری‌که از جیره‌های با قابلیت هضم شکمبه‌ای متفاوت استفاده شد. نهایت دقت صورت پذیرفت تا جیره‌ها از لحاظ درصد پروتئینی تقریباً یکسان باشند ولی از لحاظ پروتئین قابل تجزیه در شکمبه متفاوت باشند که هدف از آن، مقایسه میزان جذب نیتروژن آمونیاکی آزاد شده از جیره‌های با درصد پروتئین قابل تجزیه شکمبه‌ای پایین (۱۲/۰۲) و جیره‌های با درصد پروتئین قابل تجزیه شکمبه‌ای زیاد (۱۵/۱۵) توسط سطوح مختلف بنتونیت در محیط کشت بود. همچنین بنتونیت سدیم و یا کلسیمی مطابق جدول ۱، هر کدام در چهار سطح ۰، ۱، ۲ و ۳ درصد برای جیره‌های با تجزیه‌پذیری پایین (میانگین ۱۲/۰۲) و تجزیه‌پذیری بالا (میانگین ۱۵/۱۵) در محیط کشت در نظر گرفته شد.

تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی

برای تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های ۱۰ میلی‌لیتری از محیط کشت در زمان‌های مختلف انکوباسیون تهیه و در داخل لوله‌های آزمایشگاهی حاوی ۱۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال ریخته و تا زمان آنالیز آن‌ها، در سردخانه با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید و در نهایت غلظت نیتروژن آمونیاکی به‌روش تقطیر (Kjeltec Auto Analizer, Model 1030, Tecator Co., Sweden) اندازه‌گیری شد (مجتهدی و دانش مسگران ۲۰۱۱).

معادلات و تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌های مربوط به آزمایش یک و دو به روش تکرار داده در زمان و با استفاده از رویه Mixed نرم افزار SAS (۲۰۰۹) و بر اساس مدل آماری $Y_{ijk} = \mu + A_i + C_k + (AC)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$ انجام شد که در این مدل Y_{ijk} برابر با مقدار هر مشاهده، μ برابر میانگین کل مشاهدات، A_i برابر اثر تیمار، C_k برابر اثر زمان، $(AC)_{ik}$ برابر اثر متقابل تیمار و زمان و ε_{ijk} برابر خطای آزمایشی می‌باشد. همچنین مقایسه بین میانگین‌ها بر اساس آزمون تفاوت میانگین حداقل مربعات (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث آزمایش اول

داده‌های مربوط به غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) محیط کشت حاوی بنتونیت فعال در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ۲ نمایش داده شده است. در این آزمایش غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت بعد از ٤ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر نوع تیمار قرار گرفت ($P<۰/۰۵$) به‌طوری‌که کمترین مقدار نیتروژن آمونیاکی مربوط به نمونه شماره ٥ (۱۵ درصد جرمی اسید و ٤ ساعت واکنش) و بیشترین مقدار مربوط به نمونه شماره یک (شاهد) بود. غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت بعد از گذشت ٢٤ ساعت انکوباسیون، تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت. در بین اثرات اصلی تیمارها، بیشترین جذب نیتروژن آمونیاکی در بنتونیت فرآوری شده با درصد جرمی اسید به بنتونیت ۱۵ مشاهده گردید. هیچکدام از تیمارهای آزمایشی، تحت تأثیر زمان واکنش قرار نگرفتند. با توجه به نتایج جدول ۲، استفاده از نمونه‌های ٦ و ۷ در محیط کشت با اینکه درصد جرمی اسید به بنتونیت نسبت به بقیه تیمارها بالاتر بود اما نتیجه معکوس در جذب نیتروژن آمونیاکی داشت. در فرآیند فعال‌سازی بنتونیت، یون پروتون با کاتیون‌های بین لایه‌ای و بعضاً اتم‌های مرکزی ساختار هشت وجهی مونت‌موریلونت جایگزین می‌گردد که این پدیده سبب به وجود آمدن یا تقویت مکان‌های فعال بر روی سطح بنتونیت می‌شود (کاشانی مطلق و همکاران ۲۰۱۱ و امیری ریگی ١٣٨٦). براساس برخی از گزارشات، حجم حفرات نیز در این زمینه مؤثر بوده تا جایی‌که بازه معینی نیز به‌عنوان محدوده قابل قبول برای جذب مولکول‌های مختلف پیشنهاد شده است که در این رابطه نظرات متفاوتی وجود دارد (موکویا و همکاران ١٩٩٤) و هر عاملی که باعث کاهش سطح ویژه و یا خروج اندازه حفرات از محدوده قابل قبول بشود باعث کاهش قدرت جذبی بنتونیت می‌گردد. با توجه به نتایج آزمایش اخیر، فعال‌سازی بنتونیت با اسید منجر به افزایش قدرت جذب

آن برای نیتروژن آمونیاکی در زمان ٤ ساعت انکوباسیون گردید و این نکته نشان دهنده ایجاد تغییرات در ساختار یونی بنتونیت و متعاقباً جذب بیشتر نیتروژن آمونیاکی توسط آن می‌باشد، و به‌نظر می‌رسد در ساعت بالاتر انکوباسیون (٢٤ ساعت) با توجه به نیاز میکروارگانیسم‌ها به مصرف نیتروژن، بنتونیت قادر بوده نیتروژن آمونیاکی جذب شده را دوباره به محیط کشت برای در دست قرار دادن میکروارگانیسم‌ها رها سازد.

جدول ۲- غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) محیط کشت حاوی بنتونیت فعال در زمان‌های مختلف انکوباسیون

Table 2- Ammonia nitrogen concentration (mg/dl) in the culture media containing activated bentonite at different incubation time

اثرات اصلی Main effects		زمان انکوباسیون[1] Incubation time	
		٤ ساعت 4 hour	٢٤ ساعت 24 hour
درصد جرمی اسید به بنتونیت Mass percentage of acid to bentonite	0	6.70[b]	7.06
	10	6.88[b]	6.70
	15	6.09[a]	6.83
	20	7.15[b]	6.66
سطح معنی‌داری P-Value		<0.0001	0.64
اثر زمان واکنش Reaction time effect	0	6.70	7.06
	2	6.78	6.65
	4	6.62	6.81
سطح معنی‌داری P-Value		0.37	0.30

اثرات فرعی
Side effects

شماره نمونه Sample number	درصد جرمی اسید به بنتونیت Mass percentage of acid to bentonite	زمان واکنش[2] Reaction time	٤ ساعت 4 hour	٢٤ ساعت 24 hour
1	0	0	7.60[ab]	7.06
2	10	2	6.95[ab]	6.74
3	10	4	6.82[ab]	6.75
4	15	2	6.27[bc]	6.53
5	15	4	5.86[c]	7.02
6	20	2	7.13[a]	6.56
7	20	4	7.17[a]	6.75
سطح معنی‌داری P-Value			0.003	0.51
خطای استاندارد میانگین SEM			0.22	0.2

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Means with different letters in each column are significantly different (P<0.05).

[1]زمان‌های ٤ و ٢٤ ساعت، بیانگر زمان نمونه‌گیری از محیط کشت پس از شروع انکوباسیون می‌باشد.

[2]زمان واکنش، مؤید مدت زمان فعال‌سازی نمونه‌های بنتونیت بوده که در بخش مواد و روش‌ها توضیح داده شده است.

[1]Time sampling (4 and 24 h) after incubation in the medium.

[2]The reaction time indicates the activation time of the bentonite samples which has been explained in the materials and methods section.

جدول ۳- غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره‌های با پروتئین تجزیه‌پذیر بالا در شکمبه (۱۵/۱۵ درصد ماده خشک)

Table 3- Ammonia nitrogen concentration (mg/dl) of diet with high rumen degradability protein at different incubation time (15.15% of DM)

سطح افزودنی (٪) Additive level (%)		زمان (ساعت)[1] Time (hour)				
		2	4	8	12	24
۰ 0	شاهد Control	5.33[a]	5.80[a]	5.95	6.34	6.35
۱ 1	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.93[a]	5.23[ab]	5.99	6.28	6.55
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	5.01[ab]	5.52[ab]	5.70	5.82	6.44
۲ 2	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.57[b]	5.01[b]	5.29	6.11	6.43
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	5.03[ab]	5.53[ab]	5.74	5.83	6.48
۳ 3	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.60[b]	5.14[b]	5.76	6.04	6.39
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	4.93[ab]	5.48[ab]	5.87	6.23	6.50
سطح معنی‌داری P-Value		0.23	0.12	0.43	0.64	0.83
خطای استاندارد میانگین SEM		0.20	0.19	0.23	0.24	0.08

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

Means with different letters in each column are significantly different (P<0.05).

[1]زمان‌های ۲، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت، بیانگر زمان نمونه‌گیری از محیط کشت پس از شروع انکوباسیون می‌باشد.

[1]Time sampling (2, 4, 8, 12 and 24 h) after incubation in the medium.

اگرچه ادامه فرآیند فعال‌سازی در مدت زمان‌های بالاتر تخریب بیشتر این ساختارها را در پی دارد ولی خروج کاتیون‌ها از ساختار بنتونیت و آمورف شدن جزئی کانی‌های رسی موجود در آن، مساحت سطح ویژه آن را به میزان ۷ برابر افزایش می‌دهد که در نتیجه آن ظرفیت جذب سطحی بنتونیت افزایش می‌یابد. در آزمایشی دیگر تأثیر عواملی چون غلظت اسید، زمان و نسبت محلول به جامد (V/W) بر فعال‌سازی نمونه بنتونیت مورد مطالعه قرار گرفت که بر طبق نتایج بدست آمده (یوزباش و همکاران ۱۳۸۲)، با افزایش غلظت اسید تا ۳ نرمال مقدار خروج اکثر کاتیون‌ها افزایش یافت که در این بین کاتیون‌های تعویض‌پذیر کلسیم و سدیم راحت‌تر و بیشتر از کاتیون‌های لایه اکتاهدرال (آهن، منیزیم و آلومینیوم) تحت انحلال قرار گرفتند. همچنین نتایج آن‌ها نشان داد قدرت رنگبری بنتونیت با افزایش غلظت اسید به بیش از ۵ مولار، کاهش یافت و نتایج مطالعات تا غلظت ۵ مولار متعادل بود. بنتونیت عمدتاً از مونت‌موریلونیت یا کانی‌های گروه اسمکتیت تشکیل شده است و واحد ساختاری مونت‌موریلونیت یک لایه هشت وجهی آلومینیومی در وسط و چهار یون Si^{4+} است که در میان دو لایه چهاروجهی سیلیسی محبوس شده است و این ساختار

باعث شده که بنتونیت خاصیت تبادل یونی ویژه‌ای داشته باشد (گریم ۱۹٦۸). لذا با توجه به خاصیت تبادل یونی مونت موریلونیت یون‌های Mg^{+2} و Fe^{+2} قادر به جانشینی به‌جای Al^{+3} هستند و به‌دلیل جانشینی‌های مذکور، بار الکتریکی منفی در شبکه پدید می‌آید که برای خنثی شدن آن واحد بارالکتریکی مثبت به صورت یک کاتیون قلیایی یا قلیایی خاکی آبدار می‌تواند در فضای بین لایه‌ها جایگزین شود و پیوند میان لایه‌های سه واحدی مونت‌موریلونیت توسط این کاتیون‌ها برقرار شود که به دلیل پیوند ضعیف واندروالسی قادر به جذب مقادیر زیادی آب می‌باشد (بریندلی و برون ۱۹۸۰).

آزمایش دوم

داده‌های مربوط به غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره‌های با پروتئین تجزیه‌پذیر بالا در شکمبه (۱۵/۱۵ درصد ماده خشک) در جدول ۳ آورده شده است. در این آزمایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان‌های ۲ و ٤ (به استثنای زمان‌های ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت) ساعت انکوباسیون تحت تأثیر نوع تیمار قرار گرفت به‌طوری‌که کمترین میزان نیتروژن آمونیاکی در تیمار حاوی ۲ درصد بنتونیت سدیمی در زمان ۲ ساعت انکوباسیون مشاهده گردید، علاوه بر این غلظت نیتروژن آمونیاکی در تمامی تیمارها تا پایان زمان انکوباسیون ۲٤ ساعته، روند صعودی داشت. در پژوهشی به منظور مطالعه اثرات بنتونیت فرآوری شده و نشده و کلینوپتیلولیت بر میزان نیتروژن آمونیاکی درون شیشه‌ای، سه سطح (۰، ۲ یا ٤ درصد) از هر یک از افزودنی‌های معدنی ذکر شده در بالا به جیره‌هایی که از نظر انرژی و پروتئین خام مشابه ولی از نظر پروتئین قابل تجزیه در شکمبه متفاوت بودند، اضافه و در ساعت‌های مختلف پس از انکوباسیون غلظت نیتروژن آمونیاکی اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج، استفاده از ۲ درصد بنتونیت فرآوری شده و نشده و یا کلینوپتیلولیت، تأثیری بر غلظت نیتروژنی در شرایط درون شیشه‌ای نداشت، زمانی‌که نسبت پروتئین قابل تجزیه در شکمبه پایین بود، بنتونیت فرآوری نشده تأثیر بیشتری نسبت به کلینوپتیلولیت بر جذب نیتروژن آمونیاکی داشت ولی در سطوح بالاتر پروتئین قابل تجزیه، تفاوتی بین این دو افزودنی مشاهده نشد و در مجموع استفاده از ٤ درصد از این مواد معدنی به‌طور مؤثری غلظت نیتروژن آمونیاکی را خصوصاً در ٤ ساعت پس از انکوباسیون (در مقایسه با شاهد) کاهش داده و این اثر با بالاتر رفتن میزان تجزیه‌پذیری پروتئین، افزایش یافت (آقاشاهی و همکاران ۱۳۸۵). نتایج تحقیقی برای بررسی اثر بنتونیت در جذب یون آمونیوم و آزادسازی آن در شرایط برون‌تنی نشان داد هنگامی‌که مقدار بنتونیت افزایش می‌یابد، غلظت یون آمونیوم در محیط کشت کاهش یافته و همچنین با کاهش غلظت یون آمونیوم در طی زمان‌های پس از کشت، یون آمونیوم جذب شده توسط بنتونیت آزاد می‌گردد (مارتین و همکاران ۱۹٦۹). ترکیب کردن بنتونیت با سویا، کازئین و اوره در شرایط برون‌تنی باعث شد غلظت نیتروژن آمونیاکی در ٤ ساعت پس از انکوباسیون نسبت به تیمار شاهد کاهش یابد، به‌طوری‌که غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار بدون بنتونیت با سویا، کازئین و اوره به‌ترتیب برابر با ۳/٦٤، ٥/۳٦ و ۲۱/۱۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود و در تیمارهای حاوی مخلوط بنتونیت با سویا، کازئین و اوره به‌ترتیب برابر با ۱/۲۸، ۱/۸۸ و ۱۲/۹۱ میلی‌گرم در هر دسی‌لیتر از محیط کشت بود اما در ۲٤ ساعت پس از انکوباسیون غلظت نیتروژن آمونیاکی تقریباً با گروه شاهد یکسان بود. آن‌ها دلیل احتمالی آن‌را از دسترس خارج شدن پروتئین‌ها از تجزیه آنزیمی توسط باکتری‌ها گزارش کردند (بریتون و همکاران ۱۹۷۸).

جدول ۴- غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر) زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره‌های با پروتئین تجزیه‌پذیر پایین در شکمبه (۱۲/۰۲ درصد ماده خشک)

Table 4- Ammonia nitrogen concentration (mg/dl) of diet with low rumen degradability protein at different incubation time (12.02% of DM)

سطح افزودنی (٪ جیره) Additive level (% of diet)		زمان (ساعت)[1] Time (hour)				
		2	4	8	12	24
۰ 0	شاهد Control	4.93	5.06[a]	5.18	5.45	6.22
۱ 1	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.57	4.67[ab]	5.06	5.34	6.49
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	4.61	4.95[ab]	5.20	5.20	6.30
۲ 2	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.48	4.64[b]	5.15	5.25	6.61
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	4.78	4.98[ab]	5.00	5.28	6.59
۳ 3	بنتونیت سدیم Sodium bentonite	4.53	4.63[b]	5.26	5.40	6.58
	بنتونیت کلسیم Calcium bentonite	4.68	4.88[ab]	4.92	5.33	6.65
سطح معنی‌داری P-Value		0.19	0.01	0.30	0.99	0.30
خطای استاندارد میانگین SEM		0.16	0.10	0.10	0.29	0.14

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵).

[1]Means with different letters in each column are significantly different (P<0.05).

زمان‌های ۲، ٤، ۸، ۱۲ و ۲٤ ساعت، بیانگر زمان نمونه‌گیری از محیط کشت پس از شروع انکوباسیون می‌باشد.

[1]Time sampling (2, 4, 8, 12 and 24 h) after incubation in the medium.

نتایج آزمایش اخیر نشان داد که قدرت جذب نیتروژن آمونیاکی توسط بنتونیت سدیمی نسبت به بنتونیت کلسیمی در مقایسه با شاهد به‌طور معنی‌داری بیشتر بوده، هر چند که بنتونیت کلسیم نیز در مقادیر کمتر قادر به جذب نیتروژن آمونیاکی در محیط کشت می‌باشد. همچنین در این آزمایش نیز هر دو منبع بنتونیتی قادر بوده در زمان‌های پایین انکوباسیون (۲ و ٤ ساعت) بیشترین جذب نیتروژن آمونیاکی را داشته باشند و در عوض در زمان‌های بالاتر انکوباسیون (به‌ویژه ۲٤ ساعت) نیتروژن آمونیاکی جذب شده توسط آن‌ها در محیط کشت مجدداً آزاد گردد. داده‌های مربوط به غلظت نیتروژن آمونیاکی در ساعت‌های مختلف کشت جیره‌های با تجزیه پذیری پایین پروتئین (۱۲/۰۲ درصد ماده خشک) در جدول ٤ نشان داده شده است. غلظت نیتروژن آمونیاکی تنها در زمان ٤ ساعت انکوباسیون تحت تأثیر نوع تیمار قرار گرفت (P<۰/۰۵) به‌طوری‌که کمترین میزان غلظت نیتروژن آمونیاکی در جیره حاوی ۳ درصد بنتونیت سدیمی و بیشترین میزان آن در تیمار شاهد مشاهده گردید. همچنین بنتونیت سدیمی در مقایسه با نوع کلسیمی آن باعث کاهش معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به تیمار شاهد به‌ویژه در سطوح ۲ و ۳ درصد

آن‌هم تنها در زمان ٤ ساعت انکوباسیون شد. نتایج آزمایش اخیر نیز نشان داد که نیتروژن آمونیاکی آزاد شده از جیره‌های دارای پروتئین با قابلیت هضم پایین‌تر نیز می‌توانند در زمان‌های پایین‌تر انکوباسیون (٤ ساعت) جذب بنتونیت شده و در ساعات بالاتر انکوباسیون زمانی‌که میکروارگانیسم‌ها نیاز به نیتروژن آمونیاکی داشته باشند، توسط بنتونیت به محیط کشت رها شود. وجود بارهای سطحی در پروتئین‌ها و همینطور بار مخالف در سطح بنتونیت، باعث جذب سطحی پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه می‌گردد و تا حدی آنها را از دسترسی میکروارگانیسم‌ها خارج می‌کند (بریگاتی و همکاران ۱۹۹۹). همچنین بنتونیت به‌دلیل دارا بودن خاصیت تبادل یونی، می‌تواند یون آمونیوم را با کاتیون‌های موجود در خود تعویض کرده و در نهایت باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردد (کروم و رنگازامی ۱۹۹٦). عبدالله و همکاران (۱۹۹۵) گزارش کردند استفاده از ۲ درصد بنتونیت در جیره گوسفندان باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه نسبت به گروه شاهد گردید که با توجه به اینکه این آزمایش در شرایط درون‌تنی انجام شد، اما باز هم با نتایج آزمایش ما همخوانی دارد. همچنین بریتون و همکاران (۱۹۷۸) گزارش کردند استفاده از بنتونیت سدیم در شرایط درون‌تنی و در جیره گوسفندان، باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در زمان‌های ۲ و ٤ ساعت پس از خوراک‌دهی شد. بنابراین به‌نظر می‌رسد که ارتباط تنگاتنگی از لحاظ کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در اثر افزودن بنتونیت، هم در شرایط درون‌تنی و هم برون‌تنی وجود دارد و آن قدرت جذب آمونیاک توسط بنتونیت می‌باشد.

نتیجه گیری

نتایج آزمایش اول نشان داد قدرت جذب بنتونیت در طی فعال‌سازی تحت تأثیر اسید مصرفی قرار گرفته، به‌طوری‌که استفاده از درصد جرمی اسید به بنتونیت ۱۵، بهترین تأثیر را در جذب نیتروژن آمونیاکی داشت. نتایج آزمایش مرحله دوم نشان داد افزودن ۲ و ۳ درصد بنتونیت در جیره‌های با تجزیه‌پذیری بالای پروتئین باعث جذب نیتروژن آمونیاکی در همان ساعات اولیه انکوباسیون (۲ و ٤ ساعت) شد اما در زمان‌های بالاتر، تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشت که دلیل آن آزادسازی نیتروژن آمونیاکی جذب شده در ساعات بالاتر انکوباسیون می‌باشد. افزودن بنتونیت به جیره‌های با تجزیه‌پذیری پایین پروتئین در شکمبه در ٤ ساعت پس از انکوباسیون، تأثیر معنی‌داری بر جذب نیتروژن آمونیاکی داشت اما در زمان‌های دیگر انکوباسیون بر غلظت نیتروژن آمونیاکی تأثیری نداشت. همچنین با توجه به نتایج اخیر بنتونیت در ساعات اولیه انکوباسیون (۲ و ٤ ساعت) بیشترین جذب نیتروژن آمونیاکی را دارا بوده و کارآیی بنتونیت سدیم در برابر بنتونیت کلسیم برای جذب نیتروژن آمونیاکی آزاد شده در محیط کشت در ساعات اولیه انکوباسیون، بالاتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از حمایت‌های گروه ویوان به‌خاطر در اختیار قرار دادن محصولاتشان (بنتونیت سدیم و کلسیم: بنتوفید)، تشکر و قدردانی می‌گردد. همچنین از دانشگاه فردوسی مشهد و مجتمع آموزش عالی تربت جام نیز سپاسگزاری می‌گردد.

منابع مورد استفاده

Abdullah N, Hanita H, Ho YW, Kudo H, Jalaludin S and Ivan M, 1995. The effects of bentonite on rumen protozoa population and rumen fluid characteristics of sheep fed palm kernel cake. Asian Australian Journal of Animal Science 8(3): 249-254.

Aghashahi AR, Nikkhah A, Mirhadi SA and Moradi Shahre Babak M, 2005. Effects of natural bentonite (Montmorillonite), processed bentonite and clinopetilolite-rich tuff on the fermentation parameters, rumen microbial population and feedlot performance in male calves. Iranian journal of agricultural sciences 36(3): 613-623. (In Persian)

Aghashahi AR, Nikkhah A, Mirhadi SA, Zahedifar M and Mansouri H, 2006. Effect of different level of unprocessed bentonite, processed bentonite, and clinoptilolite of different rumen degradable protein level, on ammonia concentration, soluble and digestible protein (*In-vitro*). Pajouhesh and sazandegi 70: 80-90. (In Persian)

Amiri Rigi Z, 1386. Acid activation of bentonites from Khorasan as bleaching soil. MSc thesis, Iran University of science and technology.

AOAC International. 2002. Official methods of analysis of AOAC International. 17th edition. 1st revision. Gaithersburg, MD, USA, Association of Analytical Communities.

Azizi S, Jazayeri SH and Peyghambarzadeh SM, 2008. The effect of activation parameters on the adsorption ability of activated bentonite. Iranian Chemical Engineering Journal 34: 50-56.

Bequette BJ, Backwell FR and Crompton LA, 1998. Current concepts of amino acid and protein metabolism in the mammary gland of the lactating ruminant. Journal of Dairy Science 81: 2540-2559.

Bierman S, Erickson GE, Klopfenstein TJ, Stock RA and Shain DH, 1999. Evaluation of nitrogen and organic matter balance in the feedlot as affected by level and source of dietary fiber. Journal of Animal Science 77: 1645-1653.

Brigatti MF, Lugli C, Montorsi S and Poppi L, 1999. Effects of exchange cations and layer-charge location on cysteine retention by smectites. Clays and clay minerals 47: 664-671.

Brindly GW and Brown G, 1980. Crystal structures of clay minerala and their X-ray identification. First edition. Mineralogical Society of Great Britain and Ireland, European mineralogical union, Vol. 5.

Bringe AN and Schultz LH, 1969. Effects of roughage type or added bentonite in maintaining fat test. Journal of Dairy Science 52: 465-471.

Britton RA, Colling DP and Klopenstein TJ, 1978. Effect of complexing sodium bentonite with soybean meal or urea on *in vitro* ruminal ammonia release and nitrogen utilization in ruminants. Journal of Animal Science 46: 1738-1747.

Broderick GA and Reynal SM 2009. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science 92(6): 2822-2834.

Chorom M, Rengasamy P, 1996. Effect of heating on swelling and dispersion of different cationic forms of a smectite. Clays and clay minerals 44: 783-790.

Ensminger L and Gieseking J, 1941. The absorption of proteins by montmorillonitic clays and its effect on base-exchange capacity. Soil Science 51: 125-132.

Fenn PD and Leng RA, 1989. Wool growth and sulfur amino acid entry rate in sheep fed roughage based diets supplemented with bentonite and sulfur amino acids. Australian Journal of Agriculture Research 40: 889-896.

Galyean ML, 1996. Protein levels in beef cattle finishing diets: industry application, university research, and systems results. Journal of Animal Science 74: 2860-2870.

Grim RE, 1968. Clay Mineralogy. 2nd edition. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.

Hammond AC, 2006. Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle, US Department of Agriculture, Florida.

Hammond AC, 1983. Effect of dietary protein level, ruminal protein solubility and time after feeding on plasma urea nitrogen and the relationship of plasma urea nitrogen to other ruminal and plasma parameters. Journal of Animal Science 57(Suppl. 1): 435.

Kashani Motlagh MM, Youzbashi AA and Amiri Rigi Z, 2011. Effect of acid activation on structure and bleaching of properties of a bentonite. Iranian Journal of Materials Science and Engineering 8 (4): 50-56.

Kazemi M, Eskandary Torbaghan A, Tahmasbi AM, Valizadeh R, Naserian AA, 2017. Effects of phosalone consumption via feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk of Iranian Baluchi sheep. Journal of Animal Science and Technology 59: 10.

Magnoli AP, Monge MP, Miazzo RD, Cavaglieri LR, Magnoli CE, Merkis CI, Cristofolini AL, Dalcero AM and Chiacchiera SM, 2010. Effect of low levels of aflatoxin B1 on performance, biochemical parameters, and aflatoxin B1 in broiler liver tissues in the presence of monensin and sodium bentonite. Poultry Science 90: 48–58

Martin LC, Clifford AJ and Tillman AD, 1969. Studies on sodium bentonite in ruminant diets contaning urea. Journal of Animal Science 29: 777-782.

McDougall EL, 1948. Studies on ruminant saliva. 1. The composition and output of sheep's saliva. The Journal of Biochemistry 43: 99-106.

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

Mojtahedi M and Danesh Mesgaran M, 2011. Effects of the inclusion of dried molassed sugar beet pulp in a low-forage diet on the digestive process and blood biochemical parameters of Holstein steers. Livestock Science 141: 95-103.

Mohsen MK and Tawfik ES, 2002. Growth performance, rumen fermentation and blood constituents of goats fed diets supplemented with bentonite. Faculty of Agriculture, Kafr El-Sheikh, Tanta University, Egypt, 7 pp.

Mokaya R, Jones W, Davies ME, and Whittle ME, 1994. The mechanism of chlorophyll adsorption on acid-activated clays. Journal of Solid State Chemistry 111: 157-163.

Nikkhah A, Safamehr AR and Moradi Shahre Babak M, 2001. Effect of natural clinoptilolite-rich tuff and sodium bicarbonate on milk yield, milk composition and blood profile in Holstein cows. 13th international conference, Montpelleir, France.

Onal M, Sarikaya Y and Alemdaroglu T, 2002. The effect of acid activation on some physicochemical properties of a bentonite. Turkish Journal of Chemistry 26: 409-416.

Pinck L, Dyal R and Allison F, 1954. Protein-montmorillonite complexes, their preparation and the effects of soil microorganisms on their decomposition. Soil Science 78: 109-118.

Rinsig RB, Schultz LH and Shook GE, 1969. Effects of the addition of bentonite to high-grain dairy rations which depress milk fat percentage. Journal of Dairy Science 52: 1770-1775.

Seo JK, Yanga J, Kim HJ, Upadhaya SD, Cho DM and Ha JK, 2010. Effects of synchronization of carbohydrate and protein supply on ruminal fermentation, nitrogen metabolism and microbial protein synthesis in Holstein steers. Asian-Australian Journal of Animal Science 23 (11): 1455-1461.

Sinclair KD, Garnsworthy PC, Mann GE and Sinclair LA, 2014. Reducing dietary protein in dairy cow diets: implications for nitrogen utilization, milk production, welfare and fertility. Animal 8(2): 262-274.

Sreedharan V and Sivapullaiah PV, 2012. Effect of Organic modification on adsorption behaviour of bentonite. Indian Geotech Journal 42(3): 161-168.

Stern MD, Varga GA, Clark JH, Firkins JL, Huber JT and Palmquist DL, 1994. Evaluation of chemical and physical properties of feeds that affect protein metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science 77: 2762-2786.

Theodorou MK, Williams BA, Dhanoa MS, Mc Allan AB and France J, 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology 48: 185–197.

Timofeeva AS and Nikitchenko TV, 2014. Effect of the contents of flux and bentonite on the strength of dry pellets. Metallurgist 58(7–8): 637-639.

Van Horn HH, Newton GL and Kunkle WE, 1996. Ruminant nutrition from an environmental perspective: factors affecting whole-farm nutrient balance. Journal of Animal Science 74: 3082-3102.

Vandenhove H, Cremers A, Smolders E and Van Hees M, 2005. Effect of K and bentonite additions on Cs-transfer to ryegrass. Journal of Environmental Radioactivity 81: 233-253.

Wickersham TA, Titgemeyer EC, Cochran RC, Wickersham EE and Gnad DP, 2008. Effect of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming low-quality forage. Journal of Animal Science 86: 3079-3088.

Youzbash AA, Esmaeili Aval M and Sarafi MH, 2003. Evaluation of effective factors on acid activation of bentonite from Iran. International journal of industrial engineering and production management 14(5): 247-258.

Effect of sodium, calcium, processed, and natural bentonites on ruminal ammonia nitrogen concentration using *in vitro* methods

M Khabbaz Sirjani[1], A Tahmasbi[2]*, A A Naserian[2], H Kermanshahi[2], M Kazemi[3], A Eskandary Torbaghan[4] and E Ibrahimi Khorram Abadi[3]

Received: February 21, 2017 Accepted: June 18, 2017
[1]Professional engineering, Department of Animal science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[2]Professor, Department of Animal science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
[3]Assistant professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam
[4]Professional engineering, Department of Environmental Health Engineering, Torbat-e Jam Faculty of Medical Sciences
*Corresponding Author: a.tahmasbi@lycos.com

Introduction: Bentonite is a combination of aluminosilicate which has a high capacity to adsorb toxins such as aflatoxins and other substances (Magnoli et al. 2010). Many researchers have used this substance as a mineral to control and balance pH of rumen (Bringe and Schultz 1969; Rinsig et al. 1969; Britton et al. 1978). It is identified with a clay composition that 90% of which contains montmorillonite (Aghashahi et al. 2005). It has a high absorption property due to the presence of negative charges on the surface of clay materials (Aghashahi et al. 2005). Bentonite is used for different purposes such as performance improvement of male calves (Aghashahi et al. 2005), reduce radiocaesium contamination of soil (Vandenhove et al. 2005), organic modification for the adsorption of organic contamination (Sreedharan and Sivapullaiah 2012) and improvement the strength properties of dry pellets (Timofeeva and Nikitchenko 2014). The physical and chemical structure of bentonite, allows it to superficially absorb proteins and amino acids (Fenn and Leng 1989). This property of bentonite is hypothesized to protect the proteins and amino acids from microbial fermentation occurring in the rumen. On the other hand, ion exchange attribute makes ammonium ions and cations exchanged (Fenn and Leng 1989) and then, it prompts a more optimized use of rumen microorganisms for microbial protein synthesis, by gradually discharging ammonium ions (Nikkhah et al. 2001). Many commercial bentonites produce in Iran, but their benefits for ruminants is unknown; so, this experiment was conducted to evaluate the effect of sodium, calcium, processed and natural bentonites on ammonia nitrogen concentration using *in vitro* methods.

Material and methods: At the first experiment, ammonia nitrogen concentration was compared in a medium containing natural and processed (mass percent of sulfuric acid to bentonite was 10, 15 and 20) bentonites after 4 and 24 h incubation. The culture medium was prepared according to Menke and Steingass (1988) and Theodorou et al (2001). Ammonia nitrogen concentration was determined according to kjeldahl (Mojtahedi and Danesh Mesgaran 2011). Rumen fluid was collected via fistula of three Baluchi male sheep. Bentonite samples were processed and acivated with sulfuric acid and temperature. Applied feed in this culture medium was composed of ground barley (50%), urea (40%) and processed bentonite (10%). At the second experiment, the effect of adding sodium or calcium bentonite on ammonia nitrogen concentration at different incubation time in a culture containing feed rations with different rumen degradability was investigated. The crude protein was similar between treatments with different ruminal degradability (12.02 vs. 15.15). The culture medium was prepared just as experiment 1 with different feed ingredient (table 1). Bentonite samples were taken from Vivan Company. Sodium bentonite was composed of 69%SiO2, 11.71% Al2O3, 0.04% BaO, 1.56% CaO, 1.99% Fe2O3, 1.13% K2O, 1.82 MgO, 0.04 MnO, 3.08 Na2O, 0.08% P2O5, 1.17 SO3, 0.16 TiO2, 0.01> Cr2O3, 8.22% LOI and calcium bentonite was composed

of 64.63%SiO2, 10.02% Al2O3, 0.06% BaO, 4.68% CaO, 2.21% Fe2O3, 0.4% K2O, 1.5 MgO, 0.05 MnO, 2.1 Na2O, 0.08% P2O5, 2.31 SO3, 0.3 TiO2, 0.01> Cr2O3, 11.66% LOI.

Results and discussion: At the first experiment, the ammonia nitrogen concentration was affected by the treatments after 4 h incubation ($p<0.05$) as, the highest and lowest concentrations were observed in 15 (mass percentage of acid to bentonite: 15; ammonia nitrogen: 6.09mg/dl) and 20 % (mass percentage of acid to bentonite: 20; ammonia nitrogen: 7.15 mg/dl), respectively. It was reported reported that when sodium bentonite (SB) was added to the diet of Angora goats at 2.5 and 5 %, ammonia nitrogen concentration of the rumen fluid was reduced (Mohsen and Tawfic 2002). When the ratio of nitrogen to energy increases in the rumen, ammonia nitrogen production increases subsequently (Hammond 2006). Thus, bentonite with regards to it's ammonia nitrogen adsorption (Nikkhah et al. 2001), seems to be necessary for adsorption of surplus nitrogen produced in the rumen. The protein degradability in the rumen is one of the most important parameters affecting the supplying of amino acids to the small intestine; whereas, proteolysis determines the accessibility of ammonia nitrogen, amino acids, peptides, and branched-chain fatty acids in rumen microbial protein synthesis (Stern et al. 1994). In the second experiment, ammonia nitrogen concentration of rations with high degradability protein was affected by the treatments at 2 and 4 h after incubation ($P<0.05$) as, the lowest and highest values were belonging to 2 % sodium bentonite and control treatment, respectively. Ammonia nitrogen concentration in the diet with low digestible protein was also affected by the treatments after 4h incubation ($P<0.05$). According to Abdullah et al (1995), applying 2 % of bentonite in the sheep diet reduced ammonia nitrogen of rumen fluid, relative to the control group. It was also reported that the extra ammonia nitrogen was absorbed to the blood through the rumen wall and transferred into the liver and was finally transformed to urea; a process which reduces the ammonia nitrogen harmful effects on the animals (Hammond 2006). Moreover, the liver is able to synthesize urea from the NH_3, which is released from amino acids as a result of post-rumen digestion and also deamination process. The urea can be excreted through the urine or reabsorbed into the rumen. Thus, there is a strong relationship between ammonia nitrogen and blood urea nitrogen (Hammond 1983). So, application of bentonite in the diets can affect the control of the released nitrogen in the rumen and finally the blood urea nitrogen (BUN) concentration.

Conclusion: Generally, the results indicated that the ammonia nitrogen concentration was affected by the processing procedure of bentonite and sodium or calcium bentonites and the highest ammonia nitrogen absorption was observed at the first incubation times (2 and 4 h). It seems that sodium bentonite compared to calcium bentonite can be more effective in ammonia nitrogen adsorption.

Keywords: Ammonia nitrogen, Bentonite, *In vitro*, Incubation