

اثر مکمل‌های آنیونی و توازن آنیون - کاتیون در جیره گاوهای خشک بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی

یاسر فیض‌دار برآبادی^۱، سید احسان غیاسی^{۲*} و محمد باقر منتظر تربتی^۲

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۹/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۷

^۱ دانشجوی دکتری تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

^۲ استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه بیرجند

* مسئول مکاتبه: Email: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

چکیده:

زمینه مطالعاتی: توازن آنیون - کاتیون جیره گاو خشک نقش مهمی در پیشگیری از بیماری تب شیر و کاهش التهابات در اوایل زایمان دارد. بررسی اثر نوع و توازن آنیون‌ها در مقابل کاتیون‌های جیره بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. **هدف:** این آزمایش برای بررسی اثر منبع و توازن آنیون - کاتیون جیره گاو خشک بر فراسنجه‌های تولید گاز، غلظت نیتروژن آمونیاکی، pH شکمبه و قابلیت هضم ماده خشک در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. روش کار: ابتدا جیره پایه بر اساس احتیاجات گاو خشک تهیه و سپس توازن آنیون - کاتیون جیره پایه محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲ تیمار و ۱۵ تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار (۱): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۵/۶۶ - تیمار (۲): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۱۱/۳۳ - تیمار (۳): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۱۷ - تیمار (۴): اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۵/۶۶ - تیمار (۵): اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۱/۳۳ - تیمار (۶): اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۷ - تیمار (۷): فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۵/۶۶ - تیمار (۸): فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۱۱/۳۳ - تیمار (۹): فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۱۷ - تیمار (۱۰): فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۵/۶۶ - تیمار (۱۱): فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۱/۳۳ - تیمار (۱۲): فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۷. هر تیمار شامل یک سطح توازن آنیون - کاتیون (میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم ماده خشک)، یک منبع مکمل گوگرد و یک منبع مکمل فسفر بود که بر اساس نسبت احتیاجات هر عنصر در جدول احتیاجات متعادل گردید. **نتایج:** پژوهش حاضر نشان داد که اثر تیمارهای آزمایشی بر فراسنجه‌های تولید گاز، اسیدیته شکمبه و غلظت نیتروژن آمونیاکی در زمان‌های مختلف انکوباسیون اختلاف معنی‌دار آماری داشتند ($P < 0.05$). بطوریکه بیشترین و کمترین پتانسیل تولید گاز، مقدار تولید گاز در زمان ۴/۵ و کل گاز تولیدی در ۱۲۰ به ترتیب مربوط به تیمار ۱ و ۵ می‌باشد. همچنین به ترتیب بیشترین و کمترین سطح زیر منحنی pH مایع شکمبه مربوط به تیمار ۲ و ۵ است. کمترین و بیشترین تولید نیتروژن آمونیاکی در زمان ۴۸ ساعت به ترتیب مربوط به تیمار ۴ و ۹ می‌باشد. **نتیجه‌گیری نهایی:** بنابراین از لحاظ اثر توازن آنیون و کاتیون و منابع آنیونی کاهش DCAD بیش تر از ۵/۶۶ - میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم از لحاظ اقتصادی و خوشخوراکی توجیه کاربردی ندارد.

واژگان کلیدی: تولید گاز، تخمیر شکمبه، قابلیت هضم، مکمل آنیونی، نیتروژن آمونیاکی

مقدمه

اختلاف بین آنیون‌ها و کاتیون‌های خاص سهم بیشتری بر عملکرد فیزیولوژیکی دام نسبت به اثر انفرادی آنها دارد. اختلاف بین کاتیون‌ها و آنیون‌ها بصورت میلی‌اکی‌والان جیره به عنوان اختلاف کاتیون - آنیون جیره‌ای یا تعادل آنیون - کاتیون مطرح می‌شود. با کاهش یا افزایش اختلاف کاتیون - آنیون جیره، تغییر در متابولیت‌های خون ایجاد می‌شود. از دستکاری تعادل کاتیون - آنیون جیره برای تغییر عملکردهای بیولوژیکی می‌توان استفاده کرد (رزاقی ۲۰۱۰). مفهوم اختلاف کاتیون - آنیون، در تغذیه دام برای اولین بار توسط دیشینگتون (۱۹۷۵) استفاده شد و پس از آن در مطالعات مختلفی اثرات فیزیولوژیکی و متابولیکی آن مورد بررسی قرار گرفت. برای مثال تعادل کاتیون - آنیون جیره؛ بر تعادل اسید و باز در نشخوارکنندگان (فریدین و همکاران ۱۹۸۸)، عملکرد شیردهی (تاگر و همکاران ۱۹۸۸)، متابولیسم کلسیم در گاو شیرده (بلاک ۱۹۸۴) و مصرف فسفر در گوساله‌های شیرخوار مؤثر است. دستکاری DCAD باعث بهبود تولید شیر با تغییر ظرفیت بافری خون می‌شود (سانچز ۲۰۰۳؛ بیده ۲۰۰۵). تغذیه جیره با DCAD پایین در ۳ هفته پایان آبستنی اثرات مفیدی بر وضعیت اسید و باز سیستمیک، متابولیسم کلسیم، سلامت زایمان و بهره‌وری بهتر در کل دوره شیردهی و عملکرد تولید مثلی دارد (رزاقی ۲۰۱۰). تغذیه جیره‌های با DCAD پایین در دوره انتظار زایمان، یک راهکار عملی تغذیه‌ای برای افزایش کلسیم خون و تولید شیر بیشتر بعد از زایمان است. جیره با DCAD پایین غلظت یون هیدروژن خون را افزایش داده که نتیجه آن اسیدوز خفیف و افزایش جذب کلسیم می‌باشد (مور و همکاران ۲۰۰۰). کاهش^۱ DCAD با تغذیه نمک‌های آنیونی باعث کاهش pH خون و افزایش اتصال هورمون پاراتیروئید به گیرنده هورمون پاراتیروئید

بر سلول‌های استخوان، روده و کلیه می‌شود (گاف ۲۰۰۴). اگر چه تغذیه نمک‌های آنیونی به دلیل تلخ بودن مصرف خوراک را قبل از زایمان کاهش می‌دهند؛ ولی باعث بهبود متابولیسم کلسیم بعد از زایمان می‌شود (گلفرت و همکاران ۲۰۱۰). مصرف جیره‌های اسیدی باعث افزایش دفع ادراری، کلسیم یونیزه خون و پاسخ هورمون‌های کلسی‌تروپیک^۲ می‌شود. کاهش اختلاف کاتیون - آنیون جیره قبل از زایمان همچنین منجر به کاهش وقوع ادم پستان و افزایش دفع کلیوی آب می‌شود. آنچه در مطالعات کمتر بدان توجه شده اثرات نوع نمک‌های آنیونی و اختلاف آنها با کاتیون جیره بر ویژگی‌های تخمیر شکمبه و عملکرد هضم شکمبه‌ای است. مطالعاتی نیز به بررسی اثر نمک‌های آنیونی بر مصرف خوراک متمرکز شده‌اند. کاهش سطح اختلاف کاتیون - آنیون جیره گاوهای انتظار زایمان با استفاده از نمک‌های آنیونی موجب کاهش معنی‌دار مصرف خوراک می‌شود. این نتیجه، ناشی از کاهش خوشخوراکی جیره و پاسخ به اسیدوز متابولیکی ایجاد شده، می‌باشد (گلفرت و همکاران ۲۰۰۶). ورود کاتیون‌ها و آنیون‌ها به داخل بدن وضعیت اسید و باز بدن را تغییر می‌دهد (هو و همکاران ۲۰۰۷). آزمایشات متعددی وجود دارد که نشان می‌دهند تغییر DCAD جیره مصرفی گاو در هر مرحله از شیردهی به طور مستقیم خون و pH ادرار، همچنین بیکربنات خون و باز اضافی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. فیض‌دار برآبادی و همکاران (۲۰۲۰) گزارش کردن که سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره گاو شیری و منابع کاتیونی بر نرخ و تولید گاز، اسیدیته شکمبه، نیتروژن آمونیاکی و مقدار ناپدید شده ماده خشک در شرایط برون‌تنی مؤثر می‌باشد. نتایج مطالعه مجتهدی (۲۰۱۳) نشان می‌دهد که استفاده از ۶ درصد نمونه‌های مختلف بنتونیت سدیم در محیط کشت سبب کاهش معنی‌دار

2 Calcitropic

¹dietary cation-anion difference

مشاهده نمی‌شود، هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر نوع منبع آنیونی و توازن آنیون و کاتیون بر متغیرهای تخمیر شکمبه در گاوهای خشک به روش برون‌تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

این تحقیق در ایستگاه دامپروری و آزمایشگاه‌های گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند با استفاده از مایع شکمبه دو رأس گاو خشک نژاد هلشتاین دارای فیستولای شکمبه‌ای انجام گرفت.

تنظیم جیره و تیمارهای آزمایشی

برای بررسی اثر منبع و توازن آنیون - کاتیون جیره گاو خشک بر تولید گاز ابتدا جیره پایه براساس توصیه‌های NRC (۲۰۰۱) آماده شد. نمونه‌های آزمایشی با آسیاب و غربال یک میلی‌متری آسیاب شد. در مرحله بعد غلظت عناصر کلسیم، سدیم، پتاسیم و منیزیم با استفاده از روش جذب اتمی و فسفر و گوگرد با روش رنگ‌سنجی و دستگاه اسپکتروفتومتر و کلر با روش گراویمتری تعیین شد (AOAC ۲۰۰۵). سپس توازن آنیون - کاتیون جیره بر اساس معادله زیر تعیین شد (گاف و همکاران ۱۹۹۷).

$$DCAD \text{ (mEq/ kg)} = (\text{Na} + \text{k} + 0.15 \text{Ca} + 0.15 \text{Mg}) - (\text{Cl} + 0.2\text{S} + 0.3\text{P})$$

گوگرد طبق توصیه NRC (۲۰۰۱) معادل ۱/۷۳ در نظر گرفته شد. تیمارهای آزمایشی به شرح ذیل می‌باشد:

تیمار(۱): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۵/۶۶ -

تیمار(۲): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۱۱/۳۳ -

تیمار(۳): اسید فسفریک + اسید سولفوریک + ۱۷ - تیمار(۴):

اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۵/۶۶ - تیمار(۵):

اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۱/۳۳ - تیمار(۶)

: اسید فسفریک + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۷ - تیمار(۷):

فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۵/۶۶ - تیمار(۸):

تولید و نرخ گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد. مطالعات نشان داده مکمل‌های دولومیتی (کربنات منیزیم) تولید گاز در شرایط برون‌تنی را افزایش می‌دهند (وارادیو و همکاران ۲۰۰۳). کول و همکاران (۱۹۹۸) بیان کردند که هرچند مکانیسم دقیقی برای پاسخ به افزایش تولید گاز در افزودن مکمل‌های معدنی مانند بیکربنات سدیم و کربنات منیزیم شناخته شده نیست، اما یکی از این مکانیسم‌های پیشنهادی در افزایش تولید گاز، افزایش تعداد میکروب‌های شکمبه با افزودن این ترکیبات عنوان شده است. همچنین این نویسندگان گزارش کردند که افزودن بیکربنات سدیم شمار کل باکتری‌های شکمبه، باکتری‌های سلولایتیک و آمیلولایتیک در بوفالو را افزایش داده است. در آزمایشات برون تنی بدنبال کمبود منیزیم در متابولیسم شکمبه، کاهش هضم سلولز مشاهده شده است (ویلسو ۱۹۸۰). بنابراین مطابق شواهد اندک موجود نمک‌های آنیونی بر متابولیسم میکروبی شکمبه، هضم شکمبه‌ای دیواره سلولی، تجزیه‌پذیری پروتئین و تولید آمونیاک و سایر ویژگی‌های کنتیکی تخمیر تاثیرگذار باشد (فیض‌دار برآبادی و همکاران ۲۰۲۰؛ وارادیو و همکاران ۲۰۰۳). از آنجا که در منابع اطلاعات قابل استنادی برای این فرضیه

تبادل آنیون - کاتیون جیره پایه بر اساس فرمول فوق توسط نرم افزار اکسل محاسبه شد. در مرحله دوم نمک‌های آنیونی شامل سولفات کلسیم نیم‌آبه، اسید سولفوریک، اسید فسفریک و فسفات آمونیوم مونوبازیک به عنوان درصدی از جیره توسط نرم افزار اکسل محاسبه (جدول ۲) و به شکل محلول در قالب طرح فاکتوریل بر جیره پایه با سمپلر اضافه شد، تا به سطح توازن آنیون - کاتیون مورد نظر برسد همچنین در کلیه تیمارها نسبت فسفر به

کمی (CPG 2400 Sensor) اندازه‌گیری شد و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (فشار ۱ اتمسفر و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) تبدیل شد (بلومل و همکاران ۱۹۹۹). داده‌های حاصل در برابر زمان پلات شد و با استفاده از مدل نمایی $P=v(1-\exp(-k(t)))$ (شفولد و همکاران ۱۹۹۴) و رویه NLIN نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۹) پارامترهای مدل محاسبه شد. در این مدل p گاز تولیدی، v گاز مرتبط با سوپسترای دارای پتانسیل تخمیر و k نرخ تولید گاز در زمان است. متغیرهای $T_{0.5}$ و $G_{0.5}$ به ترتیب معادل با زمان تحقق نصف حداکثر تولید گاز (زمانی که رشد میکروارگانیسم‌ها در فاز لگاریتمی قرار دارد) و گاز متناظر با زمان $T_{0.5}$ بر اساس معادله بلومل و همکاران (۱۹۹۹) محاسبه شد.

اندازه‌گیری pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم ماده خشک

در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم ماده خشک اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری pH سه ویال از هر تکرار از بن‌ماری خارج شده و پس از ثبت گاز تولیدی بلافاصله میزان pH هر ویال با استفاده از دستگاه pH متر دیجیتالی (Metrohm 727 pH lab) اندازه‌گیری شد. به منظور تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی از روش فنول - هیپوکلریت استفاده شد (برادریک و کانگ ۱۹۸۰). در این روش ۵ میلی‌لیتر مایع شکمبه در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انکوباسیون صاف و با ۳۳۳ میکرولیتر اسید کلریدریک ۳ نرمال برای تثبیت فعالیت میکروارگانیسم‌ها ترکیب شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. برای تعیین نیتروژن آمونیاکی ۳ میلی‌لیتر مایع شکمبه پس از یخ‌گشایی به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰۰ دور سانتریفیوژ شد. با استفاده از معرف‌های فنول، هیپوکلریت و محلول استاندارد کلرید آمونیوم آماده‌سازی انجام شد و غلظت این فراسنجه توسط

فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۱۱/۳۳ - تیمار (۹):
فسفات آمونیوم + اسید سولفوریک + ۱۷ - تیمار (۱۰):
فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۵/۶۶ - تیمار (۱۱):
فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم‌آبه + ۱۱/۳۳ - تیمار (۱۲):
فسفات آمونیوم + سولفات کلسیم نیم-آبه + ۱۷ - .

در مرحله دوم گاز حاصل از تخمیر آزمایشگاهی بر اساس روش اصلاح شده بلومل و همکاران (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد. در این مرحله مایع شکمبه قبل از تغذیه صبح از دو رأس گاو هلشتاین خشک دارای فیستولای شکمبه با میانگین وزن 60.0 ± 2.0 کیلوگرم به وسیله پمپ خلاء از طریق فیستولای شکمبه جمع‌آوری شد. محتویات شکمبه به وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف شد و سپس درون بطری داخل فلاسک عایق حاوی آب گرم ۳۹ درجه قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه انتقال داده شد. جهت اطمینان از بی‌هوازی 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. سپس ۵۰۰ میلی-گرم نمونه ماده خشک و نمک آنیونی (به صورت محلول میکرولیتری با سمپلر به خوراک درون شیشه اضافه شد) و ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به نسبت یک قسمت مایع شکمبه و ۲ قسمت بزاق مصنوعی در شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری بی‌هوازی ریخته شد و در دستگاه بن‌ماری (۳۹ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. به منظور تصحیح گاز تولیدی با منشاء مایع شکمبه تعداد ۳ عدد شیشه بدون ماده غذایی و فقط دارای مخلوط مایع شکمبه و بافر برای هر زمان به عنوان بلنک در نظر گرفته شد.

فراسنجه‌های تولید گاز

فشار گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶ و ۱۲۰ ساعت از آغاز انکوباسیون بر اساس کیلو پاسکال و با تخلیه در نقطه قرائت توسط فشار سنج

$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + AB_{ij} + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$
 Y_{ijk} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین کل، A_i = اثر سطح i عامل A ، B_j = اثر سطح j عامل B ، C_k = اثر سطح k عامل C ، AB_{ij} = اثر متقابل سطح i ام از عامل A با سطح j ام از عامل B ، AC_{ik} = اثر متقابل سطح i ام از عامل A با سطح k ام از عامل C ، BC_{jk} = اثر متقابل سطح j ام از عامل B با سطح k ام از عامل C ، ABC_{ijk} = اثر متقابل سطح i ام از عامل A با سطح j ام از عامل B با سطح k ام از عامل C و E_{ijkl} = اثر خطای آزمایشی.

داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS (۲۰۰۹) رویه GLM تجزیه و تحلیل آماری شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی کرامر در سطح ۵٪ خطا استفاده شد. در تجزیه آماری داده‌های تکراردار در زمان همانند pH، نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم اثر زمان در مدل توسط رویه MIXED منظور شد

دستگاه الیزاریدر در طول موج ۵۵۰ نانومتر تعیین شد (برادریک و کانگ ۱۹۸۰، ان.ال.یو ۲۰۱۳). به منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک، در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ ساعت پس از انکوباسیون ابتدا نمونه‌ها با صافی ۴۲ میکرومتری به وسیله پمپ خلاء و قیف بوختر فیلتر شد و مواد باقی‌مانده روی صافی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در آن قرا گرفت و مقدار تجزیه‌پذیری ظاهری ماده خشک تعیین گردید (غیائی و همکاران ۲۰۱۵؛ جهانی و همکاران ۲۰۱۱).

تجزیه و تحلیل آماری

از یک طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل $3 \times 2 \times 2$ (عامل اول منابع گوگردی شامل سولفات کلسیم نیم‌آبه، اسید سولفوریک، عامل دوم منابع فسفوری شامل اسید فسفریک و فسفات آمونیوم مونوبازیک و عامل سوم سه سطح DCAD شامل $56/6$ ، $-113/3$ و -17) با ۱۲ تیمار و ۱۵ تکرار برای هر تیمار برای آنالیز نتایج طرح استفاده شد. مدل آماری طرح به صورت زیر می‌باشد:

Table 1- Ingredients of experimental diets (basis of % DM)

Ingredients	Treatments ¹											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Corn silage	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66	46.66
Barley grain	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83	5.83
Corn grain	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16
Soybean meal	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11
Sugar beet pulp	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16	1.16
Wheat bran	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66	32.66
Wheat straw	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66	11.66
Salt	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214	0.214
Urea	0.0055	0.0048	0.0052	0.0045	0.0059	0.0021	0.0055	0.0023	0.0065	0.0006	0.0059	0.00015
vit. permix ⁶	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204	0.5204
Calcium chloride	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477	0.00477
Calcium carbonate	0.02105	0.02106	0.0084	0.0084	0.0213	0.02127	0.0042	0.00415	0.02152	0.0215	-	-
CSW ²	-	-	0.017	0.017	-	-	0.0229	0.0229	-	-	0.0289	0.02888
HS ³	0.0115	0.0115	-	-	0.0155	0.01548	-	-	0.01942	0.0194	-	-
HP ⁴	0.00186	-	0.0018	-	0.0092	-	0.0091	-	0.01658	-	0.0164	-
NHP ⁵	-	0.00423	-	0.0024	-	0.01198	-	0.01183	-	0.0216	-	0.02134

¹Each treatment from 1 to 12 containing two sources of sulfur and phosphorus, and one level of DCAD. in all treatment the ratio of phosphorus to sulfur was fixed to 1.73 (NRC,2001). ²CSW: calcium sulfate hemihydrates. ³HS: sulfuric acid. ⁴HP: Phosphoric acid. ⁵NHP: ammonium phosphate monobasic. ⁶permix including: standard commercial mix of Fe, Mn, Zn, Se, Cu, I, and Vitamins of A, D₃, H₂, B₁, B₂, B₃, B₅, B₆, B₉, B₁₂, K₃, and Antioxidant.

Table 2 – Chemical composition of experimental diets

composition	Treatments											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NE _L (Mcal/kg)	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44	1.44
ME (Mcal/kg)	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31	2.31
CP (%)	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46	12.46
ADF (%)	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5	24.5
NDF (%)	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8	50.8
NFC (%)	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2	28.2
Ca (%)	1.76049	1.76097	1.76101	1.76109	1.76107	1.76029	1.75945	1.75781	1.76046	1.7603	1.76078	1.76084
Na (%)	0.18905	0.18907	0.19054	0.19056	0.18668	0.18677	0.18869	0.18879	0.18428	0.18446	0.18682	0.18698
K (%)	0.75823	0.75831	0.76419	0.76427	0.74865	0.74908	0.75676	0.75718	0.73909	0.73982	0.74927	0.74993
Mg (%)	0.18514	0.18515	0.18659	0.18661	0.18280	0.18290	0.18478	0.18488	0.18046	0.18046	0.18295	0.18311
Cl (%)	0.96002	0.96009	0.96517	0.96524	0.95174	0.95211	0.95875	0.95911	0.94348	0.94411	0.95227	0.95284
P (%)	0.85900	0.85925	0.86334	0.86481	1.08078	1.08138	1.08649	1.08629	1.30390	1.30519	1.30895	1.30954
S (%)	0.50087	0.50088	0.50156	0.50157	0.63001	0.62942	0.63067	0.63073	0.75654	0.75600	0.76197	0.76164
¹ DCAD ₆ (MEq/100gDM)	-5.66	-5.66	-5.66	-5.66	-11.33	-11.33	-11.33	-11.33	-17	-17	-17	-17
² DCAD ₄ (MEq/100gDM)	-31.07	-31.07	-31.06	-31.06	-39.20	-39.21	-39.20	-39.20	-47.27	-47.23	-47.49	-47.46

¹DCAD₆ (MEq/100gDM) = (Na+K+0.15Ca+0.15Mg) - (Cl+0.2S+0.3P) (Goff et al. 1997). ²DCAD₄ (MEq/100gDM) = (Na+K) - (Cl+S) (Wen-xuan et al., 2013)

نتایج و بحث

اثرات افزودن تیمارها بر تولید گاز

نتایج حاصل از روند تولید گاز در طی ۱۲۰ ساعت انکوباسیون در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای حاصل از تولید گاز تحت تأثیر اثرات متقابل سه‌تایی فاکتورهای آزمایشی قرار گرفتند. بیشترین پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر) به ازای سوبسترای قابل تخمیر (۷) مربوط به تیمار ۱ دارای سطح DCAD، ۵/۶۶- میلی‌اکی‌والان بود که نمک آنیونی آن از دو منبع اسید فسفریک و اسید سولفوریک تأمین شده بود. طبق انتظار بیشترین مقدار تولید گاز در زمان t.۰ و کل گاز تولیدی در ۱۲۰ ساعت انکوباسیون نیز مربوط به همین تیمار ۱ بود. در مقابل تیمار ۵ دارای سطح DCAD، ۱۱/۳۳- میلی‌اکی‌والان تأمین شده از دو منبع اسید سولفویک و اسید فسفریک، کمترین پتانسیل تولید گاز به ازای سوبسترای قابل تخمیر، کمترین G.۰ (تولید گاز در زمان t.۰) و پایین‌ترین گاز تولیدی در ۱۲۰ ساعت انکوباسیون را به خود اختصاص داد. بالاترین نرخ تخمیر در تیمار ۱۰ با سطح DCAD، ۱۷- میلی‌اکی‌والان در 100 گرم ماده خشک حاوی دو منبع اسید سولفوریک و فسفات آمونیوم منوبازیک و کمترین نرخ تخمیر در تیمار ۴ با سطح DCAD، ۵/۶۶- میلی‌اکی‌والان تأمین شده از دو منبع سولفات کلسیم نیم‌آبه و فسفات آمونیوم منوبازیک مشاهده شد. زمان رسیدن به نصف پتانسیل تولید گاز یعنی زمانی که فعالیت میکروارگانیسم‌ها به حداقل می‌رسد (t.۰) در تیمار ۴ بالاترین و در تیمار ۱۰ کمترین مقادیر را به خود اختصاص دادند. این افزایش زمان t.۰ را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که چون حلالیت سولفات کلسیم نیم‌آبه کمتر می‌باشد، بنابراین خاصیت بافری آنها نسبت به اسید سولفوریک و اسید فسفریک که حلالیت بالایی دارند مدت طولانی‌تری تداوم دارد و بنابراین نرخ تخمیر این دو منبع پایین می‌باشد (وانگ و همکاران ۲۰۱۱).

مشاهدات جدول ۳ نشان می‌دهد رابطه معکوسی بین نرخ تخمیر و زمان رسیدن به نصف پتانسیل تولید گاز برقرار می‌باشد.

تیمار ۵ دارای DCAD ۱۱/۳۳- میلی‌اکی‌والان بود که از منابع آنیون‌ها اسید فسفریک و اسید سولفوریک تأمین شده بود. از آنجایی که منابع اسیدی ظرفیت بافری را سریع‌تر مصرف می‌کنند، باعث کاهش سریع اسیدیته شکمبه می‌شوند؛ بنابراین طبق انتظار در این تیمار t.۰، گاز تولیدی در زمان t.۰ و کل گاز تولیدی در ۱۲۰ ساعت انکوباسیون نیز پایین می‌باشد. اثرات تیمارهای آزمایشی بر pH مایع شکمبه فقط در زمان ۱۲ انکوباسیون اختلاف معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$). در زمان ۱۲ انکوباسیون بیشترین pH مایع شکمبه مربوط به تیمار ۱۲ حاوی DCAD، ۱۷- میلی‌اکی‌والان است که در آن از دو منبع فسفات آمونیوم و سولفات کلسیم نیم‌آبه استفاده شده است. اوتزل و بارمور (۱۹۹۳) اثر سه منبع مختلف از نمک‌های آنیونی را در جیره‌های گاوهای آبستن مقایسه کردند و مشاهده کردند که همه جیره‌های حاوی نمک‌های آنیونی، باعث اسیدوز متابولیکی خفیف در گاوها شدند که کاملاً با مکانیسم‌های غیر تنفسی جبران می‌شدند. همچنین گزارش کردند که میزان pH ادرار و دفع بی‌کربنات با خوراندن جیره‌های آنیونی کاهش یافت. با توجه به این که در تحقیقات گذشته محاسبه توازن آنیون - کاتیون برای جیره گاو خشک را بر اساس معادله سه و چهار عنصری محاسبه نمودند ولی در تحقیق حاضر بر اساس معادله شش عنصری، نمی‌توان نتایج بدست آمده را ملاک قرار داد اما تأثیر کاهشی بر pH شکمبه با نتایج این مطالعات همسو می‌باشد. از این رو با توجه به اینکه مکمل‌های معدنی آنیونی اسیدی در تیمار ۵ در ساعات نزدیک‌تر به شروع تخمیر تأثیر خود بر کاهش ظرفیت بافری را بیشتر نشان داده است همان گونه که تیمار بدون اسید با بالاترین غلظت (تیمار ۱۲) در همین زمان اثر

ذاتی نوع مکمل بر افزایش شاخص اسیدیته را به نمایش می‌گذارد.

Table 3- Gas production kinetics of experimental diets containing different DCAD value and sulfur and Phosphor sources

treatment	DCAD (MEq/100g)	Source		Parameters				
		S ¹	P ²	V ³	K ⁴	T _{0.5} ⁵	G _{0.5} ⁶	Gas ⁷
1	-5.66	HS	HP	95.286 ^a	0.055 ^c	12.629 ^c	47.643 ^a	61.337 ^a
2	-5.66	HS	NHP	93.619 ^{bc}	0.055 ^c	12.599 ^c	46.809 ^b	59.366 ^{bcd}
3	-5.66	CSW	HP	94.319 ^{ab}	0.052 ^{cd}	13.320 ^b	47.159 ^{ab}	58.857 ^{cde}
4	-5.66	CSW	NHP	95.217 ^{ab}	0.050 ^c	13.808 ^a	47.608 ^{ab}	58.666 ^d
5	-11.33	HS	HP	84.715 ^g	0.058 ^b	11.882 ^e	42.357 ^g	54.653 ^f
6	-11.33	HS	NHP	92.493 ^{cd}	0.058 ^b	11.897 ^e	46.246 ^{bd}	59.647 ^{bc}
7	-11.33	CSW	HP	88.218 ^e	0.054 ^c	12.836 ^c	44.109 ^e	55.611 ^f
8	-11.33	CSW	NHP	93.507 ^{bc}	0.052 ^d	13.215 ^b	46.753 ^b	58.410 ^d
9	-17	HS	HP	93.784 ^{bc}	0.061 ^{ab}	11.416 ^{ef}	46.892 ^{bc}	61.286 ^{ab}
10	-17	HS	NHP	86.335 ^f	0.062 ^a	11.261 ^f	43.167 ^f	5.6664 ^e
11	-17	CSW	HP	91.470 ^d	0.055 ^c	12.653 ^c	45.735 ^d	57.870 ^{de}
12	-17	CSW	NHP	94.483 ^{ab}	0.056 ^c	12.342 ^{cd}	47.241 ^{ab}	60.152 ^{abc}
SEM				0.330	0.0002	0.060	0.165	0.294
	P			0.136	0.0001	0.024	0.068	0.121
	S			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0196
	DCAD			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
<i>P value</i>	P×S			0.0001	0.0003	0.0005	0.0001	0.0001
	DCAD×P			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	DCAD×S			0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	DCAD×S×P			0.0001	0.0018	0.0002	0.0001	0.0001

* Values with different letters in each column are different significantly for DCAD×S×P effects ($p < 0.05$).¹ Sulfur sources. ² Phosphorus sources. ³ Potential of gas production from substrate fermentation. ⁴ The rate of gas production. ⁵ The Time that gas production reach to half of V. ⁶ Gas production at T_{0.5}. ⁷The volume of produced gas in 120 hours Incubation HP: Phosphoric acid. HS: Sulfuric acid. NHP: Ammonium phosphate monobasic. CSW: Calcium sulfate hemihydrates. Experimental treatments included : Treatment (1): Phosphoric acid + sulfuric acid + (-5.66) Treatment (2): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (3): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-17) Treatment (4): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (5): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-11.33) Treatment (6): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-17) Treatment (7): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-5.66) Treatment (8): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (9): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + 17- Treatment (10): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (11): Ammonium phosphate + semi-aqueous calcium sulfate (-11.33) Treatment (12): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-17).

مختلف آزمایشی بر pH مایع شکمبه در محیط کشت را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج بدست آمده به طور کلی پس از استخراج اثر زمان، اثرات متقابل سه‌تایی فاکتورهای آزمایش بر pH مایع شکمبه معنی‌دار نبود. تغییرات سطح زیر منحنی pH در زمان‌های نمونه‌برداری معنی‌دار بود ($p < 0.05$). بیشترین سطح زیر منحنی pH مایع شکمبه

اسیدیته شکمبه تابع تولید اسیدهای چرب فرار توسط باکتری‌های شکمبه، میزان جذب این اسیدهای چرب فرار توسط شکمبه، جریان آب در دیواره شکمبه، جریان بزاق و مواد سازنده بافرهای داخل شکمبه، اسیدیته خوراک و در نهایت میزان عبور آب از هزارلا به قسمت‌های پایین‌تر می‌باشد (مورفی و همکاران ۱۹۸۲). جدول ۴ اثر تیمارهای

سوبسترا، می‌توان در تخمیر شکمبه‌ای تغییراتی ایجاد نمود. احتمالاً کاهش غلظت آمونیاک مایع شکمبه منجر به کاهش هضم الیاف می‌شود چرا که نیتروژن آمونیاکی تنها منبع نیتروژن برای باکتری‌های هضم کننده سلولز باشد (گریسولد و همکاران ۲۰۰۳). همانطور که داده‌های جدول ۵ نشان می‌دهد هضم ماده خشک در تیمار ۴ در زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون کمترین مقدار بوده است. از این رو کاهش تجزیه پروتئین خوراک نیز می‌تواند علتی مضاعف و همپوشان بر کاهش نیتروژن آمونیاکی و متعاقباً کاهش هضم فیبر باشد.

مربوط به تیمار ۲ با سطح DCAD، ۵/۶۶- میلی‌اکی‌والان بود که آنیون‌ها از منابع فسفات آمونیوم و اسید سولفوریک تأمین شده بود. کمترین سطح زیر منحنی pH مایع شکمبه مربوط به نیتروژن آمونیاکی تیمارهای آزمایشی در جدول ۵ نشان داده شده است. کل نیتروژن آمونیاکی تولید شده در ۷۲ ساعت و سطح زیر منحنی نیتروژن آمونیاکی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، با افزایش زمان انکوباسیون تولید نیتروژن آمونیاکی افزایش یافته است. در زمان ۴۸ انکوباسیون اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده شد، به گونه‌ای که بیشترین تولید نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار ۹ حاوی توازن آنیون - کاتیون ۱۷- میلی‌اکی‌والان همراه با دو منبع اسید سولفوریک و اسید فسفریک می‌باشد. نیتروژن آمونیاکی به شدت تحت تأثیر تجزیه پروتئین خام جیره توسط میکروارگانیسم‌ها و تجزیه جمعیت میکروبی به دلیل بازیافت نیتروژن در شرایط نامساعد می‌باشد (ابراهیمی خرم‌آبادی و همکاران ۲۰۱۵). از طرفی چون قابلیت هضم ماده خشک در این زمان و در این تیمار طبق داده‌های جدول ۶ افزایش یافته است، بنابراین این افزایش احتمالاً مربوط به تجزیه پروتئین خام خوراک به دلیل عدم در دسترس بودن منابع کربوهیدراتی در این زمان و در نتیجه عدم همزمانی انرژی و پروتئین می‌باشد. یکی از دلایل احتمالی دیگری که تأثیری منابع مورد استفاده بر جمعیت پروتوزواها را می‌توان عنوان نمود که با کاهش جمعیت پروتوزواها، تولید نیتروژن آمونیاکی افزایش می‌یابد (ایوجین و همکاران ۲۰۰۴).

کمترین میزان نیتروژن آمونیاکی در تیمار ۴ مشاهده می‌شود که حاوی منابع فسفات آمونیوم و سولفات کلسیم نیم آبه با DCAD، ۵/۶۶- میلی‌اکی‌والان می‌باشد. ونپات و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند که برای بهینه‌سازی ارزش تغذیه‌ای خوراک، بهبود بازدهی تخمیر و استفاده از

Table 4- In vitro ruminal pH related parameters of experimental diets containing different DCAD value and sulfur and Phosphor sources

treatment	DCAD (MEq/100g)	Source		Time				Total pH ³	Area(cm ²) under the curve of rumen pH
		S ¹	P ²	12	24	48	72		
1	-5.66	HS	HP	6.585 ^{ab}	6.576	6.611	6.600	6.593	2.196 ^{ab}
2	-5.66	HS	NHP	6.625 ^{ab}	6.630	6.615	6.576	6.612	2.206 ^a
3	-5.66	CSW	HP	6.563 ^{ab}	6.628	6.650	6.520	6.589	2.201 ^{ab}
4	-5.66	CSW	NHP	6.625 ^{ab}	6.595	6.608	6.610	6.609	2.202 ^{ab}
5	-11.33	HS	HP	6.560 ^b	6.550	6.568	6.566	6.561	2.186 ^b
6	-11.33	HS	NHP	6.578 ^{ab}	6.546	6.585	6.550	6.565	2.188 ^{ab}
7	-11.33	CSW	HP	6.633 ^{ab}	6.571	6.601	6.585	6.597	2.198 ^{ab}
8	-11.33	CSW	NHP	6.610 ^{ab}	6.565	6.610	6.573	6.588	2.195 ^{ab}
9	-17	HS	HP	6.564 ^{ab}	6.536	6.566	6.560	6.558	2.189 ^{ab}
10	-17	HS	NHP	6.615 ^{ab}	6.603	6.621	6.580	6.605	2.202 ^{ab}
11	-17	CSW	HP	6.630 ^{ab}	6.630	6.606	6.558	6.607	2.205 ^{ab}
12	-17	CSW	NHP	6.677 ^a	6.561	6.558	6.570	6.590	2.196 ^{ab}
SEM				0.023	0.022	0.018	0.020	0.011	0.0039
<i>P value</i>		P		0.0205	0.9145	0.9191	0.3360	0.1145	0.1761
		S		0.0144	0.1664	0.3120	0.8182	0.0281	0.0131
		DCAD		0.2508	0.0079	0.0431	0.7861	0.0148	0.0036
		P×S		0.0053	0.0176	0.0197	0.1328	0.0227	0.0017
		DCAD×P		0.0369	0.8868	0.4789	0.2724	0.0410	0.0284
		DCAD×S		0.0100	0.8531	0.3033	0.3268	0.0091	0.0058
	DCAD×S×P		0.0416	0.117	0.2083	0.0855	0.1243	0.0167	

* Values with different letters in each column are different significantly for DCAD×S×P effects ($p < 0.05$). ¹ Sulfur sources. ² Phosphorus sources. ³Total pH: Acidity changes after removal of the effect of time over the whole incubation time due to experimental factors. HP: Phosphoric acid. HS: Sulfuric acid. NHP: Ammonium phosphate monobasic. CSW: Calcium sulfate hemihydrates. Experimental treatments included : Treatment (1): Phosphoric acid + sulfuric acid + (-5.66) Treatment (2): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (3): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-17) Treatment (4): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (5): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-11.33) Treatment (6): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-17) Treatment (7): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-5.66) Treatment (8): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (9): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + 17- Treatment (10): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (11): Ammonium phosphate + semi-aqueous calcium sulfate (-11.33) Treatment (12): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-17).

Table 5- effects of different levels of DCAD and anionic sources on ammonia nitrogen (mg/dl) during the incubation times

treatment	DCAD (MEq/100g)	Source		Time(h)				Total NH ₃ ³	Area under the curve of rumen NH ₃
		S ¹	P ²	12	24	48	72		
1	-5.66	HS	HP	21.078	26.409	33.682 ^{ab}	36.502	29.418	9.385
2	-5.66	HS	NHP	20.990	25.896	31.495 ^{ab}	39.859	29.560	9.271
3	-5.66	CSW	HP	24.679	25.581	36.834 ^{ab}	32.051	29.786	9.659
4	-5.66	CSW	NHP	20.160	23.627	30.398 ^b	40.101	28.572	8.837
5	-11.33	HS	HP	20.471	23.751	36.210 ^{ab}	37.042	29.369	9.235
6	-11.33	HS	NHP	18.934	26.084	32.585 ^{ab}	35.036	28.160	9.013
7	-11.33	CSW	HP	20.699	25.457	35.435 ^{ab}	37.491	29.770	9.422
8	-11.33	CSW	NHP	20.114	27.606	35.081 ^{ab}	37.064	29.966	9.594
9	-17	HS	HP	20.206	23.082	37.869 ^a	34.870	29.007	9.177
10	-17	HS	NHP	20.550	24.755	34.898 ^{ab}	37.084	29.322	9.260
11	-17	CSW	HP	20.337	24.036	33.481 ^{ab}	35.669	28.381	8.975
12	-17	CSW	NHP	19.855	22.956	34.323 ^{ab}	34.829	27.991	8.835
SEM				1.481	1.299	1.517	1.856	0.814	0.275
<i>P value</i>		P		0.1860	0.5647	0.0068	0.1130	0.4444	0.2795
		S		0.4840	0.8744	0.8222	0.6219	0.8961	0.9834
		DCAD		0.2241	0.0717	0.1319	0.5015	0.4287	0.3664
		P×S		0.4052	0.3349	0.5917	0.6187	0.8162	0.5774
		DCAD×P		0.5680	0.1751	0.0247	0.0361	0.8887	0.4317
		DCAD×S		0.7273	0.2269	0.1912	0.4459	0.1838	0.1997
		DCAD×S×P		0.4296	0.7841	0.0404	0.3389	0.4570	0.3727

* Values with different letters in each column are different significantly for DCAD×S×P effects ($p < 0.05$). ¹ Sulfur sources.

² Phosphorus sources. ³Total NH₃: Ammonia nitrogen changes after removal of the effect of time over the whole incubation time due to experimental factors. HP: Phosphoric acid, HS: Sulfuric acid, NHP: Ammonium phosphate monobasic, CSW: Calcium sulfate hemihydrates. Experimental treatments included: Treatment (1): Phosphoric acid + sulfuric acid + (-5.66) Treatment (2): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (3): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-17) Treatment (4): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (5): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-11.33) Treatment (6): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-17) Treatment (7): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-5.66) Treatment (8): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (9): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + 17- Treatment (10): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (11): Ammonium phosphate + semi-aqueous calcium sulfate (-11.33) Treatment (12): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-17).

درصد) را دارا بود. تطبیق این نتیجه با داده‌های pH و تولید گاز نیز شرایط بهینه این تیمار برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها را تایید می‌کند. گانبرگ و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که بر اساس معادله ۴ عنصری کاهش DCAD به ۹- میلی‌اکی‌والان در ۱۰۰ گرم ماده خشک، ضمن اثرات مثبت بر متابولیسم کلسیم و مقاومت انسولینی هیچ اثر منفی بر مصرف ماده خشک قبل و بعد از زایش و میانگین تولید شیر آنها پس از زایش نداشت. گل‌فرت و

تجزیه‌پذیری ماده خشک در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جدول ۶ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد تجزیه‌پذیری ماده خشک بین تیمارهای آزمایشی در زمان‌های مختلف انکوباسیون به لحاظ آماری معنی‌دار نیست، اما در زمان ۱۲۰ انکوباسیون تمایل زیادی به معنی‌داری داشتند ($p < 0.06$). تیمار ۲ حاوی دو منبع اسید سولفوریک و فسفات آمونیوم مونوبازیک با سطح DCAD ۵/۶۶- میلی‌اکی‌والان بالاترین قابلیت هضم ماده خشک (۸۴/۲

معادل تقریبی سطح ۳۰- بر اساس معادله ۴ عنصری (جدول ۲) و در حدود سطح ۰/۳ برای معادله سه عنصری (Na+K-Cl) می‌باشد. در مطالعه حاضر با کاهش DCAD، کاهش معنی‌داری در قابلیت هضم ماده خشک مشاهده نشده و بهترین نتایج در مجموع در سطح توازن ۵/۶۶- مشاهده می‌گردد.

همکاران (۲۰۰۶) کاهش مصرف ماده خشک را با مصرف نمک‌های کلریدی گزارش کردند که در مطالعه حاضر از منابع سولفور و فسفر استفاده شده است. از آنجا که نحوه محاسبه DCAD در مطالعات مختلف بر اساس فرمول‌های متنوع است، مقایسه نتایج و بیان دامنه قابل قبول باید بر اساس یک مبنا ممکن نیست. سطح ۵/۶۶- در این تحقیق

Table 6- The effects of different levels of DCAD and anionic sources on the invitro DM digestibility during the incubation times

treatment	DCAD (MEq/100g)	Source		Time (h)					
		S ¹	P ²	0	12	24	48	72	120
1	-5.66	HS	HP	0.206	0.561	0.698	0.776	0.795	0.826 ^{ab}
2	-5.66	HS	NHP	0.206	0.490	0.667	0.762	0.769	0.842 ^a
3	-5.66	CSW	HP	0.206	0.498	0.689	0.762	0.787	0.821 ^{ab}
4	-5.66	CSW	NHP	0.206	0.543	0.697	0.728	0.774	0.794 ^b
5	-11.33	HS	HP	0.206	0.560	0.693	0.772	0.813	0.829 ^{ab}
6	-11.33	HS	NHP	0.206	0.560	0.714	0.773	0.799	0.823 ^{ab}
7	-11.33	CSW	HP	0.206	0.506	0.687	0.764	0.800	0.806 ^{ab}
8	-11.33	CSW	NHP	0.206	0.533	0.693	0.775	0.784	0.821 ^{ab}
9	-17	HS	HP	0.206	0.570	0.721	0.755	0.800	0.832 ^{ab}
10	-17	HS	NHP	0.206	0.564	0.682	0.791	0.804	0.828 ^{ab}
11	-17	CSW	HP	0.206	0.546	0.649	0.759	0.758	0.796 ^{ab}
12	-17	CSW	NHP	0.206	0.533	0.693	0.775	0.784	0.821 ^{ab}
SEM				0.014	0.019	0.017	0.014	0.023	0.010
<i>P value</i>		P			0.8590	0.6479	0.8982	0.7344	0.7292
		S			0.0417	0.4009	0.1593	0.3300	0.0014
		DCAD			0.0800	0.7476	0.3995	0.5550	0.9245
		P×S			0.0212	0.7928	0.4440	0.5886	0.9929
		DCAD×P			0.6228	0.5539	0.0983	0.4210	0.6484
		DCAD×S			0.4513	0.3865	0.6003	0.7745	0.5797
	DCAD×S×P				0.0936	0.0788	0.6488	0.8619	0.0545*

*Means within same column with different superscripts indicate a tendency to significance for DCAD×S×P effects (P<0.06). ¹ Sulfur sources. ²Phosphorus sources. HP: Phosphoric acid. HS: Sulfuric acid. NHP: Ammonium phosphate monobasic. CSW: Calcium sulfate hemihydrates. Experimental treatments included : Treatment (1): Phosphoric acid + sulfuric acid + (-5.66) Treatment (2): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (3): Phosphoric acid + Sulfuric acid + (-17) Treatment (4): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (5): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-11.33) Treatment (6): Phosphoric acid + Calcium sulfate hemihydrates + (-17) Treatment (7): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-5.66) Treatment (8): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + (-11.33) Treatment (9): Ammonium phosphate + Sulfuric acid + 17- Treatment (10): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-5.66) Treatment (11): Ammonium phosphate + semi-aqueous calcium sulfate (-11.33) Treatment (12): Ammonium phosphate + Calcium sulfate hemihydrates + (-17).

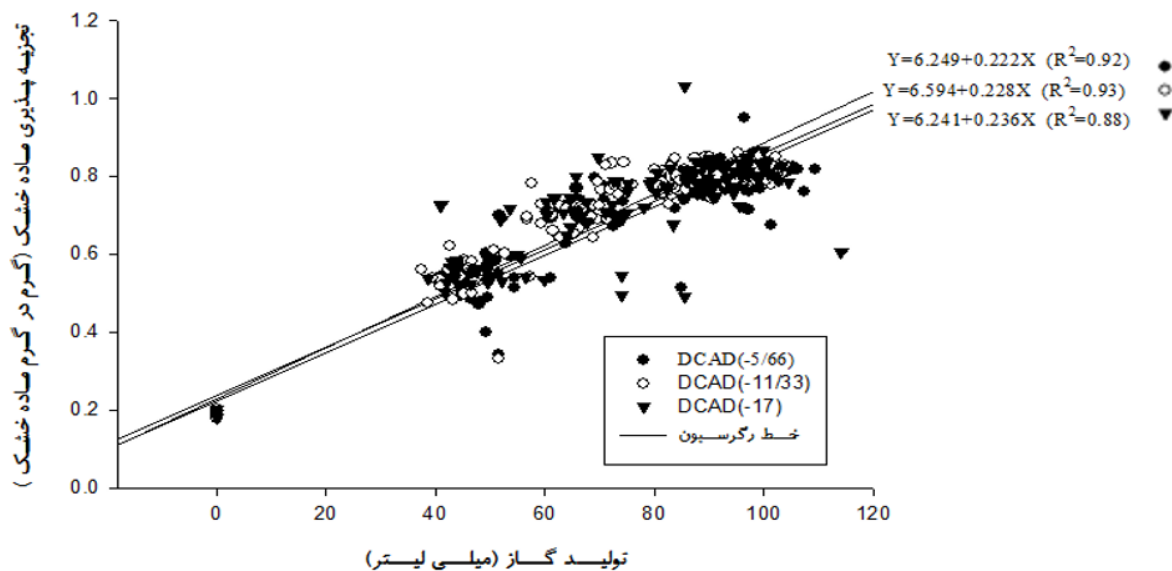


Figure 1- Linear regression between gas production and dry matter degradability in different levels of DCAD in dry cow's diet

بافری اسیدهای چرب فرار می‌باشد (غیائی و همکاران ۲۰۱۵). نتایج نشان می‌دهد به طور کلی با افزایش تجزیه‌پذیری ماده خشک تولید گاز نیز افزایش یافته است. این همبستگی در سطوح DCAD $11/3$ - و 17 - میلی‌اکی‌والان نسبت به $5/66$ - به لحاظ عددی بالاتر بوده ولی بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. بنابراین همان‌طور که در رابطه با قابلیت هضم ماده خشک بیان شد، کاهش توازن آنیون - کاتیون جیره به زیر $5/66$ - میلی‌اکی‌والان به لحاظ اقتصادی توجیهی ندارد و این سطح نزدیک به سطوح توصیه شده توسط زیمپل و همکاران (۲۰۱۸) می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به طور کلی استفاده از منابع اسید فسفریک و اسید سولفوریک به همراه توازن آنیون - کاتیون $5/66$ - میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک باعث بهبود فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی شد. از لحاظ اثر توازن آنیون و کاتیون و منابع آنیونی کاهش

مکانیسم مشخصی برای ارجحیت اسید سولفوریک نسبت به سولفات کلسیم یک و نیم‌آبه در منابع مشابه ذکر نشده اما آنچه نتایج نشان می‌دهد تفاوت اصلی بین سطح توازن $5/66$ - میلی‌اکی‌والان در 100 گرم ماده خشک در اثر منبع گوگرد ایجاد شده و تأمین گوگرد از منبع اسید سولفوریک در این سطح بدون اینکه منبع فسفر تفاوت معنی‌داری ایجاد کند بیشترین تأثیر مثبت را بر قابلیت هضم ماده خشک نشان داده است. این داده‌ها با بالا بودن پتانسیل تولید گاز، تداوم تخمیر ($t_{1/5}$) و شرایط بهینه pH در جداول ۳ و ۴ همخوانی دارد. بنابراین شاید این توصیه منطقی به نظر برسد که کاهش DCAD به پایین‌تر از سطح اول ($5/66$ -) به دلیل کاهش خوشخوراکی احتمالی و افت برخی فراسنجه‌های تخمیری اقتصادی و کاربردی نیست.

شکل (۱) همبستگی بین تولید گاز و تجزیه‌پذیری ماده خشک را برای سطوح مختلف DCAD نشان می‌دهد. افزایش این همبستگی به معنای افزایش سهم گاز دی-اکسیدکربن ناشی از تخمیر ماده خشک در مجموع گاز تولیدی نسبت به گاز متان و گاز دی‌اکسیدکربن ناشی از

DCAD بیش تر از ۵/۶۶- میلی اکی والان بر کیلوگرم از لحاظ اقتصادی و خوشخوراکی توجیه کاربردی ندارد.

منابع مورد استفاده

- AOAC, 2005. Official Methods of Analysis. Vol. I. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- Beede DK, 2005. Formulating diets with optimum cation-anion difference for lactating dairy cows. In Florida Ruminant Nutrition Symposium.
- Block E, 1984. Manipulating Dietary Anions and Cations for Prepartum Dairy Cows to Reduce Incidence of Milk Fever. *Journal of Dairy Science* 67(12): 2939-2948.
- Blümmel M, M Gomezulu R, Chen XB, Makkar HPS, Becker K and Ørskov ER, 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.
- Broderick GA and Kang JH, 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.
- Dishington IW, 1974. Prevention of milk fever (hypocalcemic paresis puerperalis) by dietary salt supplements. *Acta Veterinaria Scandinavica* 16(4): 503-512.
- Ebrahimi Khoramabadi E, Tahmasbi AM, Danesh Mesgaran M, Naserian AA and Vakili SA, 2015. Effect of Different Dietary Rumen Degradable to Rumen Undegradable Protein Ratio on Nitrogen Efficiency and Urea Transporter-B Expression in Growing Baluchi Male Lambs. *Journal of Ruminant Research* 2(4):1-22. (In Persian).
- Eugène M, Archimède H and Sauvant D, 2004. Quantitative meta-analysis on the effects of defaunation of the rumen on growth, intake and digestion in ruminants. *Livestock Production Science* 85(1): 81-97.
- Feizdar Barabady Y, Ghiasi SE and Montazer Torbati MB, 2020. Effect of dairy cow dietary cation source and DCAD on invitro rumen fermentation parameters. *Iranian Journal of Animal Science Research* 12(2):195-181. (In Persian).
- Fredeen AH, DePeters EJ and Baldwin RL, 1988. Effects of acid-base disturbances caused by differences in dietary fixed ion balance on kinetics of calcium metabolism in ruminants with high calcium demand. *Journal of Animal Science* 66(1): 174-184.
- Gelfert CC, Alpers I, Decker M, Hüting A, Baumgartner W and Staufenbiel R, 2006. Untersuchungen zum Auftreten der Gebärdparese in verschiedenen Regionen Deutschlands und zum Einsatz unterschiedlicher Therapien im Vergleich zur Kalziuminfusion-Teil 2: Differenzialdiagnosen und Heilungserfolg. *Tierärztliche Praxis Großtiere* 34(6):357-367.
- Gelfert CC, Loeffler LM, Frömer S, Engel M, Männer K and Staufenbiel R, 2010. Comparison of the impact of different anionic salts on the acid-base status and calcium metabolism in non-lactating, non-pregnant dairy cows. *The Veterinary Journal* 185(3): 305-309.
- Ghiasi SE, Valizadeh R and Naserian AA, 2015. Effect of Oxidized Soybean Oil against Pomegranate Seed as Antioxidant on the in vitro Rumen Fermentation Parameters. *Iranian Journal of Animal Science Research* 7(3):244-256. (In Persian).
- Goff JP and Horst RL, 1997. Effects of the Addition of Potassium or Sodium, but Not Calcium, to Prepartum Rations on Milk Fever in Dairy Cows. *Journal of Dairy Science* 80(1): 176-186.
- Goff JP, Ruiz R and Horst RL, 2004. Relative acidifying activity of anionic salts commonly used to prevent milk fever. *Journal of Dairy Science* 87(5): 1245-1255.

- Griswold KE, Apgar GA, Bouton J and Firkins JL, 2003. Effects of urea infusion and ruminal degradable protein concentration on microbial growth, digestibility, and fermentation in continuous culture. *Journal of Animal Science* 81(1): 329-336.
- Grünberg W, Donkin SS and Constable PD, 2011. Periparturient effects of feeding a low dietary cation-anion difference diet on acid-base, calcium, and phosphorus homeostasis and on intravenous glucose tolerance test in high-producing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 94(2):727-45.
- Hu W, Kung L and Murphy MR, 2007. Relationships between dry matter intake and acid–base status of lactating dairy cows as manipulated by dietary cation–anion difference. *Animal Feed Science and Technology* 136(3): 216-225.
- Jahani AH, Danesh Mesgaran M, Vakili A, Rezayazdi K and Hashemi M, 2011. Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. *African Journal Microbial Research* 5: 4812-4819. (In Persian).
- Koul V, Kumar U, Sareen VK and Singh S, 1998. Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves. *Indian Journal of Animal Sciences* 68(7): 629-631.
- Mojtahedi, M, 2013, Identification of nanostructure and nanoporous bentonite adsorbents and their efficiency on aflatoxin b1 detoxification in vitro and in vivo (Doctoral dissertation, Ph. D. Dissertation. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad. (In Persian).
- Moore SJ, VandeHaar MJ, Sharma BK, Pilbeam TE, Beede DK, Bucholtz HF and Goff JP, 2000. Effects of Altering Dietary Cation-Anion Difference on Calcium and Energy Metabolism in Peripartum Cows¹. *Journal of Dairy Science* 83(9): 2095-2104.
- Murphy MR, Baldwin RL and Koong LJ, 1982. Estimation of stoichiometric parameters for rumen fermentation of roughage and concentrate diets. *Journal of Animal Science* 55(2): 411-421.
- NRC, 2001. National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle.
- Oetzel GR and Barmore JA, 1993. Intake of a concentrate mixture containing various anionic salts fed to pregnant, nonlactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 76(6): 1617-1623.
- Razzaghi A, Aliarabi H, Tabatabayee SMM, Saki AA and Zamani P, 2010. Effect of Dietary Cation-Anion Difference on Acid- Base Balance, Calcium Homeostasis and Performance of Holstein Dairy Cows. *Iranian Journal of Animal Science* 41(2):109-117. (In Persian).
- Sanchez WK, 2003. The latest in dietary cation-anion difference (DCAD) Nutrition. Proceeding of 43rd Annual Dairy Cattle Day. 26th March, Main Theater, University of California. Davis Campus.
- SAS, 2009. SAS User's Guide. Version 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
- Schofield P, Pitt RE and Pell AN, 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. *Journal of Animal Science* 72(11): 2980-2991.
- Tucker WB, Harrison GA and Hemken RW, 1988. Influence of Dietary Cation-Anion Balance on Milk, Blood, Urine, and Rumen Fluid in Lactating Dairy Cattle¹. *Journal of Dairy Science* 71(2): 346-354.
- U.N.L, 2013. <https://animalscience.unl.edu/ruminant-nutrition-lab>
- Váradyová Z, Baran M, Zawadzki W and Siroka P, 2003. Effect of dolomite, magnesium oxide (MgO) and chalk (CaCO₃) on in vitro fermentation of amorphous and crystalline cellulose and meadow hay using inoculum from sheep. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 116(1-2): 50-54.
- Wanapat M, Khejornsart P, Pakdee P and Wanapat S, 2008. Effect of supplementation of garlic powder on rumen ecology and digestibility of nutrients in ruminants. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 88(13): 2231-2237.
- Wang M, Tang SX and Tan ZL, 2011. Modeling in vitro gas production kinetics: derivation of logistic–exponential (LE) equations and comparison of models. *Animal Feed Science and Technology* 165(3-4): 137-150.

- Wilson GF, 1980. Effects of magnesium supplements on the digestion of forages and milk production of cows with hypomagnesaemia. *Animal Science* 31(2): 153-157.
- Zimpel R, Poindexter MB, Vieira-Neto A, Block E, Nelson CD, Staples CR and Santos JEP, 2018. Effect of dietary cation-anion difference on acid-base status and dry matter intake in dry pregnant cows. *Journal of Dairy Science* 101(9): 8461-8475.

Effect of anionic supplements and dietary anion-cation balance of dry cows on invitro ruminal fermentation properties

Y Feizdar Barabady¹, SE Ghiasi^{2*} and MB Montazer Torbati²



Received: November 29, 2020

Accepted: September 29, 2021

¹ PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

² Professor Assistant, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Iran

*Corresponding author: E mail: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

 <p>پژوهش‌های علوم دامی Animal Science Research</p>	<p>Journal of Animal Science/vol.33 No.1/ 2023/pp 23-41 https://animalscience.tabrizu.ac.ir</p>	
<p>© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/) DOI: 10.22034/AS.2021.43104.1595</p>		

Introduction: Differences between specific anions and cations have a greater contribution to the physiological performance of animals than their individual effect. The difference between cations and anions in milliequivalents of the diet is referred to as the cation-anion difference or the anion-cation balance (Razzaghi 2009). DCAD manipulation by altering blood buffering capacity, improves milk production in dairy cow (Sanchez 2003). Feeding diets with low DCAD during the Prepartum period is a practical nutritional strategy to increase blood calcium and produce more milk Postpartum. Diets containing low DCAD increased the concentration of hydrogen ions in the blood, resulting in mild acidosis and increased calcium absorption (Moore et al 2000). Decreasing DCAD by feeding anionic salts lowers blood pH and increases the binding of parathyroid hormone to the parathyroid hormone receptor on bone, intestinal, and kidney cells (Goff 2004). However, feeding anionic salts reduces prenatal feed intake due to its bitterness; but it improves postpartum calcium metabolism (Golfert et al 2010). One way to activate postpartum calcium homeostasis is to use DCAD-negative diets in the Prepartum period. Nutrition High-anion diets, commonly known as "anion-salt diets," have been used to prevent milk fever for the past 40 years. One possible reason is that dietary metabolic acidosis increases the tissue response to parathyroid hormone. Therefore, the aim of this experiment was to investigate the effect of anion source type and anion and cation balance on rumen fermentation parameters in dry cows *in vitro*.

Material and methods: This study was done at the Research Farm and laboratories of the Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture, in University of Birjand, using the ruminal fluid of two dry Holstein cows with ruminal fistula. In order to investigate the effect of source and dietary anion-cation difference (DCAD) of dry cow's diet on gas production parameters, ammonia nitrogen concentration (N-NH₃), rumen pH and dry matter digestibility in *in vitro* condition. Basal diet was prepared based on the requirements of dry cows. In the next step, concentrations of calcium, sodium, potassium, magnesium, chlorine, phosphorus and sulfur in the basal diet were determined by atomic absorption spectroscopy and the DCAD of the basal diet was calculated. After this, the anionic salts of calcium sulfate hemihydrates, sulfuric acid, phosphoric acid and monobasic ammonium phosphate were added as a percentage of the diet in solution form to the base diet with a sampler to reach the desired anion-cation balance. The factorial experiment conducted in a completely randomized design with 12 treatments and 15

replications. Anionic salts of calcium sulfate hemihydrates, sulfuric acid, phosphoric acid, ammonium phosphate monobasic and different DCAD levels (-56.6, -11.33 and -17.0 meq/100gDM) were used. Each treatment was including a DCAD level and a sulfur and phosphorus source that balanced according to each element ratio in table of requirements. In the next step, the gas from fermentation was measured based on the modified method of Bloomel et al. (1997). The produced gas pressure was recorded at times of 2, 4, 6, 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 and 120 hours from the beginning of incubation. The data were plotted against time and analyzed using the exponential Schofield model ($P = v (1 - \exp(-k(t)))$) in the NLIN procedure of SAS software. At times of 12, 24, 48 and 72 hours after incubation, three vials of each replicate were removed from incubator and after recording gas production, immediately after opening the cap, the pH of each vial was measured Using a digital pH meter (Metrohm 727 pH lab). In order to determine the concentration of ammonia nitrogen after centrifugation of the contents of each vial, 5 ml of clear supernatant was removed from it and combined with 333 μ l of 3 N hydrochloric acid and then stored at -20 ° C. Phenol and hypochlorite reagents were used to measure ammonia nitrogen and the adsorption was read by ELISA at 650 nm (Broderick and Kang, 1980). In order to determine the rumen digestibility of the dry matter, the residues obtained from each vial were oven dried in 60 ° C for 48 hours.

Results and discussion: The results showed that the effects of experimental treatments on gas production parameters, rumen pH and ammonia nitrogen concentration were significantly different at different incubation times ($p < 0.05$). The highest gas production potential per fermentable substrate is related to Treatment containing DCAD level of -5.66, which is supplied from two sources of phosphoric acid and sulfuric acid. As expected, the total gas production at 120 hours of incubation and also gas production at $t_{0.5}$ is related to this treatment. The fermentation rate and time to reach half of the gas production potential in this treatment is average. Therefore, it can be concluded that this treatment has been able to provide suitable ruminal buffering conditions for microorganisms due to good results in DM digestibility too. The highest area below the pH curve of ruminal fluid was related to treatment with DCAD of -5.66, which was obtained from ammonium phosphate and sulfuric acid sources. The lowest level below the pH curve of ruminal fluid is related to the treatment containing DCAD -11.33, which is provided from sources of phosphoric acid and sulfuric acid. The highest ammonia nitrogen production is related to the treatment containing the anion-cation balance of 170 with two sources of sulfuric acid and phosphoric acid. Ammonia nitrogen is strongly influenced by the breakdown of crude dietary protein by microorganisms and the breakdown of the microbial population due to nitrogen recycling under adverse conditions (Ebrahimi Khoramabadi et al 2015). On the other hand, because the dry matter digestibility has increased at this time and in this treatment, this increase is probably related to the breakdown of feed crude protein due to improve fermentation conditions (Eugène et al 2004).

Conclusion: In general, the use of phosphoric acid and sulfuric acid sources with the anion-cation balance of -5.66 MEq/100gDM improved the gas production parameters, the rumen pH curve under area, and the ammonia nitrogen concentration. However, in terms of the effect of anion and cation balance and anion sources, the reduction of DCAD more than -5.66 MEq/100gDM has no practical justification in terms of economic and palatability.

Key words: Ammonia nitrogen, Anion Supplements, Digestibility, Gas production, Rumen fermentation