Animal Production Research

Vol. 11, No. 4, 2022 (21-36)
doi: 10.22124/AR.2023.22294.1705
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Use of acid-consuming bacteria and various buffers to improve digestion and fermentation of highly concentrated diets

F. Vafaee [1], M. Chaji[2*]

1. Former MSc Student of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran

(Received: 14-05-2022 – Accepted: 21-11-2022)

Introduction: The use of highly concentrated rations in the fattening of ruminant animals is done to improve the performance per unit of feed consumption. Increasing the amount of concentrate in the ration improves the food conversion ratio and the weight gain of fattening lambs, and the production of volatile fatty acids. However, some *in vivo* experiments have reported that long-term use of highly concentrated diets is not always associated with increased performance. Therefore, feeding diets containing high amounts of concentrate (with a limited amount of effective fiber) often leads to metabolic disorders, the most important of which is subacute ruminal acidosis which causes a decrease in dry matter consumption and reduces the fiber digestibility, milk fat, lameness, and liver abscess, and even leads to the death of the animal. Moreover, sub-acute acidosis leads to significant economic losses. Therefore, preventive measures to prevent acidosis and improve starch digestion, such as the use of antibiotics, probiotics, and buffers, have been taken into consideration. Lactate-consuming bacteria metabolize lactic acid and control its accumulation in the rumen. This process is important when the animal diet contains a large amount of grain. *Megasphaera elsdenii* and *Selenomonas ruminantium* are the dominant strains that consume lactic acid in the rumen, and among these two strains, *Megasphaer alsdeni* consumes 65 to 95% of the lactate in the rumen. The use of biological methods in controlling pH changes can also reduce the dependence of livestock on chemical additives to some extent. Therefore, the present experiment was conducted to compare the effect of different chemical and biological buffers (acid-consuming bacteria) on the digestion and fermentation of highly concentrated diets.

Materials and methods: The experimental treatments included: 1. The control diet (without additives and containing 70% concentrate + 30% fodder or basal diet), 2. Basal diet + 3 mL of bacteria *Megasphaera elsdenii* (bacteria- 4.5×10^8 cfu/3mL), 3. Basal diet + 1% sodium bentonite, 4. Basal diet + 1% sodium bentonite + 3 mL of bacteria, 5. Basal diet + 1% sodium bicarbonate, 6. Basal diet + 1% sodium bicarbonate + 3 mL bacteria, 7. Basal diet + 1% magnesium oxide, 8. Basal diet + 1% magnesium oxide + 3 mL bacteria, 9. Basal diet + 1% zeolite, 10. Basal diet + 1% zeolite + 3 mL bacteria, 11. Basal diet + 1% sodium sesquicarbonate, and 12. Basal diet + 1% sodium-sesquicarbonate + 3 mL bacteria. *Megasphaera elsdenii* bacteria were isolated and prepared from Najdi goats at the Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan (Ahvaz, Iran) and their activity was investigated in experiments. In gas production experiments, the experimental samples were ground with a mill containing a 1 mL sieve. About 200 mg of the dry matter of the desired sample was weighed and poured into 100 mL vials, and eight replicates were considered for each treatment. The produced gas of the samples was recorded at 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, and 96 hours of incubation using a digital barometer.

Results and discussion: The effect of experimental treatments on potential and rate of gas production, partitioning factor, microbial biomass production, microbial biomass production efficiency, pH, ammonia nitrogen concentration, apparent dry matter digestibility, and protozoa population was significant (P<0.05), and except for

* Corresponding author: chaji@asnrukh.ac.ir

ammonia nitrogen, all parameters in buffer treatments were higher than the control. The highest gas production potential (68.26 mg), microbial biomass production (1212.31 mg), and microbial biomass production efficiency (79%) were observed in the treatment containing sodium bicarbonate + bacteria (P<0.05). The highest pH and ammonia nitrogen were for the treatment containing bacteria (6.60) and control (27.30 mg/100 mL). The total protozoa population was the highest in the treatment of sodium bentonite + bacteria.

Conclusions: In general, the results of the present experiment showed that the use of buffers improved digestion and fermentation conditions, and each of the buffers had a greater effect on one or more parameters than the others. In addition, acid-consuming bacteria as a pH regulator had competitive effects with chemical buffers, especially bicarbonate buffer, and even better in some cases. The effect of some chemical buffers used in the present experiment, such as bicarbonate, has been further investigated, but the effect of other chemical and biological buffers mentioned in the present experiment on the digestive and fermentation properties of ruminant animals has been investigated less. Therefore, it is recommended to investigate the effect of chemical buffers used in the present experiment alone or together with acid-consuming bacteria in feeding ruminant animals.

Keywords: Chemical buffers, *Megasphaera elsdenii*, Protozoa population, Gas production parameters, Digestibility

How to cite this article:

Vafaee F. and Chaji M. 2022. Use of acid-consuming bacteria and various buffers to improve digestion and fermentation of highly concentrated diets. Animal Production Research, 11(4): 21-36. doi: 10.22124/AR.2023.22294.1705

تحقیقات تولیدات دامی

سال یازدهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۱ (۳۶-۲۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

استفاده از باکتری‌های مصرف کننده اسید و بافرهای مختلف برای بهبود هضم و تخمیر جیره‌های پرکنسانتره

فرشته وفایی[۱]، مرتضی چاجی[۲*]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

۲- استاد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۳۰)

چکیده

این پژوهش با هدف مطالعه تاثیر استفاده از باکتری مصرف کننده اسید و بافرهای مختلف شیمیایی بر قابلیت هضم و تخمیر جیره‌های پرکنسانتره انجام شد. فراسنجه‌های تولید گاز تعداد ۱۲ تیمار آزمایشی شامل ۱- جیره شاهد (یا پایه فاقد افزودنی)، ۲- جیره پایه+ سه میلی لیتر باکتری *مگاسفرا السدنی* ($1/5 \times 10^8$ cfu/mL)، ۳ تا ۱۲- یک درصد از پنج بافر بنتونیت سدیم، بیکربنات سدیم، اکسید منیزیم، زئولیت، سدیم سسکوئی کربنات به تنهایی یا همراه با باکتری *مگاسفرا السدنی* در زمان‌های مختلف اندازگیری و محاسبه شد. اثر تیمارهای آزمایشی بر پتاسیل و نرخ تولیدگاز، عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی، بازده تولید توده زنده میکروبی، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک و جمعیت پروتوزوآ معنی‌دار بود ($P<0/05$) و غیر از نیتروژن آمونیاکی، همه فراسنجه‌ها در تیمارهای حاوی بافر بیشتر از شاهد بودند. بیشترین پتانسیل تولید گاز (۶۸/۲۶ میلی‌لیتر)، تولید توده زنده میکروبی (۲۱۲/۳۱ میلی‌گرم)، بازده تولید توده زنده میکروبی (۷۹ درصد) مربوط به تیمار حاوی بیکربنات سدیم + باکتری *مگاسفرا السدنی* بود ($P<0/05$). بیشترین pH و نیتروژن آمونیاکی به ترتیب مربوط به تیمار حاوی باکتری (۶/۶۰) و شاهد (۲۷/۳۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) بود. کل جمعیت پروتوزوآ در تیمار بنتونیت سدیم + باکتری بیشترین مقدار بود. در کل، نتایج آزمایش حاضر نشان داد که استفاده از بافرها باعث بهبود شرایط هضم و تخمیر شدند و هر کدام از بافرها روی یک یا چند فراسنجه تاثیر بیشتری نسبت به بقیه داشتند. به‌علاوه، باکتری مصرف کننده اسید به عنوان تنظیم کننده pH، آثاری قابل رقابت با بافرهای شیمیایی به ویژه بافر بیکربنات و حتی در مواردی بهتر داشت.

واژه‌های کلیدی: بافرهای شیمیایی، باکتری *مگاسفرا السدنی*، جمعیت پروتوزوآ، فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم

* نویسندهٔ مسئول: chaji@asnrukh.ac.ir

doi: 10.22124/AR.2023.22294.1705

مقدمه

استفاده از جیره‌های پرکنسانتره در پرواربندی دام‌های نشخوارکننده با هدف بهبود عملکرد افزایش وزن به ازای مصرف هر واحد مصرف خوراک انجام می‌شود. افزایش مقدار کنسانتره جیره سبب بهبود ضریب تبدیل غذایی و افزایش وزن بره‌های پرواری (Papi and Tehrani, 2017)، و افزایش تولید اسیدهای چرب فرار می‌شود (2000; Wang ., 2009 Carro *et al*.,*et al*). با این وجود، برخی آزمایشات روی دام زنده گزارش کرده‌اند که استفاده طولانی مدت از جیره‌های پرکنسانتره همواره با افزایش عملکرد همراه نیست (Norollahi, 2007; Asadi *et al*., 2016). بنابراین، تغذیه با جیره‌های حاوی مقادیر زیاد کنسانتره (به همراه مقدار محدودی از الیاف مؤثر) اغلب به اختلالات متابولیکی می‌انجامد، که از مهم‌ترین آنها می‌توان به اسیدوز تحت حاد شکمبه‌ای اشاره کرد که سبب کاهش ماده خشک مصرفی، کاهش قابلیت هضم الیاف، کاهش چربی شیر، لنگش و آبسه کبدی می‌شود و حتی مرگ حیوان را به دنبال دارد (Calsimiglia *et al*., 2008; Plaizier *et al*., 2018). کربوهیدرات در جیره‌هایی با دانه زیاد به وسیله باکتری‌ها و پروتوزوآها به اسید لاکتیک تخمیر می‌شوند و سبب کاهش pH به زیر شش شده و فعالیت باکتری‌های سلولولایتیک و تعداد پروتوزوآها را کاهش می‌دهد (McDaniel, 2009). مشخصه اسیدوز تحت حاد، pH برابر با ۵/۵ و پایین‌تر، کاهش مصرف خوراک و عملکرد دام است و منجر به زیان‌های اقتصادی قابل توجهی می‌شود. به همین منظور، اقدامات پیشگیرانه برای جلوگیری از بروز اسیدوز و بهبود هضم نشاسته از قبیل استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها و بافرها مورد توجه قرار گرفته‌اند (Der Bedrosian, 2009).

بیکربنات سدیم، سسکویی‌کربنات سدیم، کربنات منیزیم، اکسید منیزیم و بنتونیت سدیم، افزودنی‌های رایج در تغذیه دام هستند که از نقش‌های مهم برخی از آنها، فعالیت بافری است (Sulzberger *et al.,* 2016) بافرها سبب کاهش اسیدیته و افزایش نسبت استات به پروپیونات شده و سبب بهبود هضم الیاف می‌شوند. لذا، این عمل سبب افزایش مصرف خوراک و به دنبال آن، افزایش تولید شیر و نیز چربی شیر می‌شود (Beauchemin and Yang, 2005; Sulzberger *et al.,* 2016).

باکتری‌های مصرف کننده لاکتات، اسید لاکتیک را متابولیزه کرده و تجمع آن را در شکمبه کنترل می‌کنند. این فرآیند زمانی اهمیت دارد که که جیره دام حاوی مقدار زیادی دانه باشد (Kung and Hession, 1995). *مگاسفرا السدنی* و *سلنوموناس رومینانتیوم* سویه‌های غالب مصرف کننده اسید لاکتیک در شکمبه هستند. از بین این دو سویه، ۶۵ تا ۹۵ درصد لاکتات موجود در شکمبه به وسیله *مگاسفرا السدنی* مصرف می‌شود. بنابراین *مگاسفرا السدنی* با مصرف اسید لاکتیک از کاهش شدید pH شکمبه در نتیجه تجمع اسید لاکتیک جلوگیری می‌کند (Prabhu *et al*., 2012). استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند سبب تقویت جمعیت این باکتری‌ها و تکثیر آن‌ها شود (Aikman *et al*., 2011). از بافرهای رایج در تغذیه دام می‌توان به بیکربنات سدیم اشاره نمود که آثار مفید آن نیز اثبات شده است، اما قیمت آن تا حدودی بالا است. حال اگر افزودنی‌هایی با خواص بافری وجود داشته باشند که قیمت مناسب‌تری نسبت به بافرهای رایج داشته باشند، می‌توانند هزینه‌های تولید را کاهش دهند. از طرفی، استفاده از روش‌های زیستی در کنترل تغییرات pH نیز می‌تواند تا حدودی وابستگی دام را به افزودنی‌های شیمیایی کاهش دهد. از این رو، آزمایش حاضر با هدف مقایسه اثر بافرهای مختلف شیمیایی و زیستی (باکتری‌های مصرف کننده اسید) بر هضم و تخمیر جیره‌های پر کنسانتره انجام شد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر در آزمایشگاه‌ها و ایستگاه آموزشی-پژوهشی دامپروری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. به منظور بررسی تاثیر افزودنی میکروبی و بافرهای شیمیایی مختلف بر فراسنجه‌های تولید گاز، تخمیر شکمبه‌ای و قابلیت هضم مواد مغذی به روش برون‌تنی، ۱۲ جیره به عنوان تیمار آزمایشی مورد استفاده قرار گرفتند که شامل: ۱- جیره شاهد (فاقد افزودنی و حاوی ۷۰ درصد کنسانتره+۳۰ درصد علوفه یا جیره پایه) (جدول ۱)، ۲- جیره پایه + سه میلی لیتر باکتری *مگاسفرا السدنی* (باکتری- 10^8 cfu/3mL × ۴/۵)، ۳- جیره پایه + یک درصد بنتونیت سدیم، ۴- جیره پایه + یک درصد بنتونیت سدیم + سه میلی لیتر باکتری، ۵- جیره پایه + یک درصد بیکربنات سدیم، ۶- جیره پایه + یک درصد بیکربنات سدیم + سه میلی لیتر باکتری، ۷- جیره

پایه + یک درصد اکسید منیزیم، ۸- جیره پایه + یک درصد اکسید منیزیم + سه میلی لیتر باکتری، ۹- جیره پایه + یک درصد زئولیت، ۱۰- جیره پایه + یک درصد زئولیت + سه میلی لیتر باکتری، ۱۱- جیره پایه + ۱ درصد سدیم سسکوئی کربنات، ۱۲- جیره پایه + یک درصد سدیم سسکوئی کربنات + سه میلی لیتر باکتری، بودند. باکتری‌های *مگاسفرا السدنی* ($۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ cfu/mL) مورد استفاده از بز نجدی و در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان (ملاثانی، اهواز، ایران) جداسازی و تهیه شد و فعالیت آنها در آزمایش‌هایی مورد بررسی قرار گرفت (Mohammadabadi *et al*., 2018). جهت کشت و جداسازی باکتری *مگاسفرا السدنی*، مایع شکمبه به‌دست آمده از بزهای نجدی که صاف شده بود پس از رقیق کردن با محلول رقیق کننده بی‌هوازی یا ADS (anaerobic dilution solution) به محیط کشت درون لوله‌ها اضافه شد و برای رشد باکتری‌ها، در گرمخانه در دمای ۳۹ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند. پس از رشد، باکتری‌ها به محیط کشت جامد حاوی آگار منتقل شده و دوباره به انکوباتور با دمای ۳۹ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از رشد کلنی‌ها طی سه تا هفت روز، هر کلنی به محیط کشت مایع منتقل شد. جدایه‌های خالص شده به منظور ادامه آزمایش به محلول گلیسرول بی‌هوازی و استریل شده منتقل شدند و در فریزر ۲۰- °C نگه‌داری شدند (Mohammadabadi *et al*., 2018).

مکمل‌های بافری مورد استفاده در پژوهش حاضر شامل بافر بی‌کربنات سدیم از شرکت کیمیا سپاهان (اصفهان، ایران)، بنتونیت سدیم از شرکت پایا فرآیند هزاره نوین (مشهد، ایران)، زئولیت از شرکت افرند توسکا (تهران، ایران)، اکسید منیزیم از گروه دانش بنیان ویوان (مشهد، ایران) و سدیم سسکوئی کربنات از کارخانه دام و طیور مینو صباح گلستان (مینودشت، ایران) تهیه شد.

آزمایش تولید گاز: نمونه‌های آزمایشی با آسیاب حاوی غربال یک میلی لیتری آسیاب شدند. حدود ۲۰۰ میلی گرم از ماده خشک نمونه مورد نظر توزین و به داخل ویال‌های ۱۰۰ میلی لیتری ریخته شد. برای هر تیمار، هشت تکرار در نظر گرفته شد. سپس ۳۰ میلی لیتر مخلوط ۱:۲ مایع شکمبه و بزاق (۱۰ میلی لیتر مایع شکمبه و ۲۰ میلی لیتر بزاق مصنوعی) به آن‌ها اضافه شد. با استفاده از دی اکسید کربن، محیط درون ویال‌ها بی‌هوازی شد و بلافاصله درب آنها کاملاً بسته شد و به حمام آب با دمای ۳۹ درجه سلسیوس منتقل شد. دو ویال فاقد نمونه خوراکی که تنها حاوی ۳۰ میلی لیتر مخلوط مایع شکمبه و بافر بود به منظور تصحیح گاز تولیدی ناشی از فعالیت میکروبی مایع شکمبه در نظر گرفته شد. گاز تولیدی نمونه‌ها در زمان‌های صفر، ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوباسیون به کمک فشارسنج دیجیتال ثبت شد. داده‌های آزمایش با استفاده از مدل نمایی (Orskov and McDonald, 1979) تجزیه واریانس شدند و فراسنجه‌های تولید گاز با رابطه زیر محاسبه شد (Menke and Steingass, 1988):

$$P = b\ (1\text{-}e^{-ct})$$

که در این رابطه، P= حجم تولید گاز در زمان t، b= بخش دارای پتانسیل تولید گاز (میلی لیتر در ۲۰۰ میلی گرم ماده خشک)، c= نرخ تولید گاز (درصد در ساعت)، t= مدت زمان قرار دادن نمونه در حمام آب گرم و e= عدد نپری است.

از داده‌های تولید تجمعی گاز بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری برای تعیین عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی استفاده شد (Blümmel *et al*., 1997).

میلی لیتر گاز تولیدی ÷ میلی گرم ($mg\ ml^{-1}$) عامل تفکیک ماده آلی واقعاً هضم شده =

عامل) × گاز تولیدی= (میلی گرم) تولید توده میکروبی (۲/۲ -تفکیک

ماده آلی ÷ تولید توده میکروبی = بازده تولید توده میکروبی واقعاً هضم شده

تهیه مایع شکمبه: مایع شکمبه مورد استفاده در آزمایش تولید گاز با استفاده از لوله معدی از پنج راس گوسفند نر بالغ تغذیه شده با جیره بر پایه علوفه در سطح نگهداری قبل از خوراک‌دهی صبح گرفته شد. این مایع پس از صاف کردن با چهار لایه پارچه نخی متقال و اختلاط با یکدیگر، با قرار دادن آن در فلاسک حاوی آب گرم با دمای ۳۹ درجه سلسیوس، به آزمایشگاه منتقل شد.

شمارش پروتوزوآ: جهت شمارش پروتوزوآ، در پایان ساعت ۲۴ از محیط کشت گاز، نمونه تهیه شد. برای ثابت کردن پروتوزوآ، ۱۰ میلی لیتر مایع محیط کشت میگروارگانیسم‌های شکمبه با ۱۰ میلی‌لیتر فرم آلدهید ۱۰ درصد مخلوط و شمارش پروتوزوآها با استفاده از لام هموسایتومتر انجام شد (Dehority, 2003).

جدول ۱- اجزای خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیره پایه

Table 1. Feed ingredients and chemical composition of basal diet

Ingredients	Amounts (g/kg DM)
Alfalfa hay	201
Wheat straw	99.0
Barley grain	300
Corn grain	210
Soybeans meal	123.5
Wheat bran	55.0
Calcium carbonate	4.00
Salt	2.50
Vitamin and mineral supplements[a]	5.00
Chemical composition	
Dry matter	891
Organic matter	948
Ash	51.7
Crude protein	161
Ether extract	27.0
NDFom[b]	290
ADFom[c]	165
Non–fiber carbohydrates[d]	470.3
ME[e] (Mcal/kg DM)	2.65

[a] Premix contained (per kg): Vitamin A, 500,000 IU/mg; vitamin D_3, 100000 IU/mg; vitamin E, 100 mg/kg; Ca, 180 g/kg; P, 60000 mg/kg; Na, 60000 mg/kg; Mg, 19000 mg/kg; Zn, 3000 mg/kg; Fe, 3000 mg/kg; Mn, 19000 mg/kg; Cu, 300 mg/kg; Co, 100 mg/kg; Se, 1 mg/kg; I, 100 mg/kg; antioxidant, 400 mg/kg; carrier, up to 1000 g.

[b] NDFom, ash-free neutral detergent fiber.

[c] ADFom, ash-free acid detergent fiber.

[d] Calculated as: NFC=1000 – (NDFom g/kg + crude protein g/kg + ether extract g/kg + ash g/kg).

[e] Calculated from each feed ingredient.

تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH شکمبه: به منظور تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی در پایان ساعت ۲۴ از محیط کشت میکروارگانیسم‌های شکمبه در آزمایش تولید گاز، نمونه‌برداری انجام شد و بلافاصله pH نمونه‌ها با دستگاه pH متر (مدل WTW 3110، ساخت آلمان) اندازه‌گیری شد. پس از صاف کردن با پارچه متقال چهار لایه به مقدار مساوی با اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال (۱۶/۷ میلی لیتر اسید کلریدریک مرک ۳۷ درصد در یک لیتر آب مقطر) مخلوط شد و جهت اندازه‌گیری بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. همچنین غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط با دستگاه اسپکتوفتومتر (Bio-Rad, Libra S22, England) اندازه‌گیری شد (Broderick and Kang, 1980).

تجزیه آماری: داده‌های حاصل از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS ویرایش ۹/۴ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. برای آثار معنی‌دار، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال خطای پنج درصد انجام شد. مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

که در این رابطه، Y_{ij}= مقدار مشاهده شده، μ= میانگین جامعه، T_i= اثر تیمار i ام و ε_{ij}= اثر خطای آزمایش است.

نتایج و بحث

فراسنجه‌های تولید گاز (ضرایب): پتانسیل تولید گاز (ضریب b) و نرخ تولید گاز (ضریب c) به‌طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفتند ($P<۰/۰۵$). افزودن باکتری به تنهایی یا همراه با بافر در همه تیمارها در مقایسه با تیمار شاهد، باعث افزایش معنی‌دار پتانسیل تولید گاز شد. در مورد نرخ تولید گاز، از نظر افزایش و کاهش تنوع وجود داشت، به‌طوری که در تیمارهای ۲ (جیره پایه + باکتری)، ۶ (جیره پایه + بیکربنات سدیم + باکتری)، ۹ (جیره پایه + زئولیت) و ۱۰ (جیره پایه + زئولیت + باکتری)، افزایش نسبت به شاهد معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، اما افزایش و کاهش در سایر تیمارها، معنی‌دار نبود (جدول ۲). بیشترین پتانسیل تولید گاز در تیمار حاوی بیکربنات سدیم+ باکتری *مگاسفرا السدنی* مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). از طرفی، پتانسیل تولید گاز در تیمار حاوی باکتری به عنوان بافر زیستی (تیمار ۲) از بسیاری از تیمارهای حاوی بافر شیمیایی به تنهایی (نظیر

تیمارهای ۷ و ۱۱) یا مخلوط با بافر زیستی (مانند تیمارهای ۸ و ۱۲) به‌طور معنی‌داری بیشتر بود و نسبت به بسیاری از تیمارهای حاوی بافرهای شیمیایی به تنهایی یا مخلوط با بافر زیستی از نظر عددی بیشتر بود (تیمارهای ۳، ۹ و ۱۰). این موضوع موید نقش مفید باکتری *مگالسفرا السدنی* به عنوان یک بافر طبیعی زیستی است.

در مقایسه با تیمار شاهد (جیره پایه شامل ۷۰:۳۰ کنسانتره و علوفه) در آزمایش حاضر، افزودن بنتونیت سدیم (تیمارهای ۳ و ۴) سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز شد و بر نرخ تولید گاز تاثیری نداشت که برای نتایج پتانسیل تولید گاز موافق با نتایج سایر محققین (Khalifeh *et al*., 2012) بود. در آزمایش محققین مذکور، افزودن دو و چهار درصد بنتونیت سدیم به جیره گوسفندان دهنده مایع شکمبه برای آزمایش تولید گاز که با جیره‌های حاوی ۵۰:۵۰ کنسانتره و علوفه تغذیه شده بودند، سبب افزایش تولید گاز شد، در حالی که نرخ تولید گاز به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر قرار گرفت که مخالف با نتایج آزمایش حاضر است. در آزمایش دیگری، استفاده از نمونه‌های مختلف بنتونیت سدیم در محیط کشت (کشت ثابت، مایع شکمبه) به مقدار شش درصد ماده خشک جیره، سبب کاهش معنی‌دار تولید گاز و نرخ تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد (Mojtahedi, 2013) که موافق با نتایج آزمایش حاضر نبود. شاید دلیل اختلاف آن‌ها با آزمایش حاضر، استفاده از مقادیر متفاوت بنتونیت در آن آزمایش (شش درصد) نسبت به آزمایش حاضر (یک درصد) بود زیرا بنتونیت سدیم، ماده مغذی قابل تخمیری که تولید کننده گاز باشد ندارد و جزء ترکیبات معدنی است.

در آزمایشی با انکوباسیون جیره‌های (۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد علوفه) حاوی بافرهای مختلف پس از ۹۶ ساعت، مشخص شد که افزودن مخلوطی از یک بافر حاوی ۳۵ درصد بیکربنات سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت سدیم، یا بافری حاوی ۲۰ درصد بیکربنات سدیم + ۴۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم و یا بافری حاوی ۴۰ درصد اکسید منیزیم، سبب کاهش پتانسیل و نرخ تولید گاز شد (Vaghar *et al*., 2018) که نتایج آزمایش حاضر، آن را تایید نمی‌کند. در آزمایش حاضر، افزودن بافر اکسید منیزیم به تنهایی یا همراه با باکتری *مگاسفرا السدنی* نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش معنی‌دار تولید گاز شد.

جدول ۲- فراسنجه‌های تولید گاز (ضرایب) جیره‌های آزمایشی حاوی افزودنی‌های بافری و باکتریایی تنظیم کننده pH مایع شکمبه

Table 2. Gas production parameters (coefficients) of experimental diets containing buffer and bacterial additives regulating ruminal pH

Treatment no.	Experimental treatments (basal diet + additive)[1]	Gas production parameters[3]	
		b (mL)	c (mL/h)
1	Control (basal diet without additive)	40.16^{d}	0.045^{c}
2	Basal diet (BD)+ 3 mL *Megasphaera elsdenii* (bacteria)[2]	57.52^{b}	0.113^{a}
3	BD+ 1% Sodium bentonite	55.56^{cb}	0.087^{abc}
4	BD+1% Sodium bentonite + 3 mL bacteria	57.76^{b}	0.046^{c}
5	BD+ 1% Bicarbonate sodium	60.08^{b}	0.071^{abc}
6	BD+ 1% Sodium bicarbonate + 3 mL bacteria	68.26^{a}	0.108^{ab}
7	BD+ 1% Magnesium oxide	49.40^{c}	0.052^{bc}
8	BD+ 1% Magnesium oxide + 3 mL bacteria	47.99^{c}	0.063^{abc}
9	BD+ 1% Zeolite	53.60^{cb}	0.108^{ab}
10	BD+ 1% Zeolite + 3 mL bacteria	52.08 ^{cb}	0.094^{ab}
11	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate	49.44^{c}	0.060^{abc}
12	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate + 3 mL bacteria	49.91^{c}	0.046^{c}
SEM		3.0312	0.0176
P-value		0.0001	0.0212

[1] Control (Basal diet, containing 70% concentrate and 30% forage).
[2] *Megasfera elsdenii* (1.5×10^{8} cfu/mL).
[3] b: Gas production from the fermentable fraction; c: Gas production rate (mL/h)
[a-d] Within the same column, means by similar letters are not significantly different (P<0.05).
SEM: Standard error of the means.

از طرفی، موافق با نتایج آزمایش حاضر، در آزمایش برخی از پژوهشگران (Mao *et al*., 2017; Vaghar *et al*., 2018)، استفاده از بافر بیکربنات سدیم باعث افزایش تولید گاز شد، به‌طوری که در بین بافرهای مورد استفاده آن‌ها، بیشترین پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز مربوط به بافر بیکربنات سدیم (یک و سه درصد جیره) بود. در مقایسه با تیمار شاهد، در آزمایش حاضر، افزودن زئولیت و بنتونیت سدیم به تنهایی یا همراه با باکتری به جیره پایه، سبب افزایش معنی‌دار تولید گاز شد و نرخ تولید گاز تنها در تیمار حاوی زئولیت به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود، که موافق نتایج محققین دیگر بود (Khoujeh *et al.*, 2016). محققین مذکور اثر بافرهای مختلف از جمله زئولیت را در جیره (شامل ۲۵ درصد علوفه و ۷۵ درصد کنسانتره) بر فراسنجه‌های تولید گاز مطالعه کردند و دریافتند که دو درصد زئولیت نسبت به شاهد پتانسیل تولید گاز بالاتری را نشان داد. برای فرآیندهای تخمیر، عامل اسیدیته مناسب شکمبه الزامی است. افت سریع pH سبب توقف فعالیت‌های انتقال یون هیدروژن در دیواره میکروب‌ها شده و رشد و فعالیت میکروب‌ها را کاهش می‌دهد. میزان تجزیه‌پذیری ماده خشک به‌خصوص گروه الیاف وابسته به اسیدیته شکمبه است. در pH زیر ۵/۵، به دلیل توقف فعالیت میکروبی، تخمیر قطع و روند هضم رو به اضمحلال می‌رود (Ghoniem *et al*., 2018). بافرها باعث افزایش pH و ظرفیت بافری شکمبه شده که خود منجر به افزایش غلظت اسیدهای چرب فرار تولیدی در شکمبه، بهبود عملکرد شکمبه، افزایش سرعت تجزیه-پذیری، افزایش سرعت عبور و در نتیجه تخلیه سریع‌تر شکمبه می‌شوند که این خالی شدن شکمبه منجر به افزایش مصرف ماده خشک می‌شود (McDaniel, 2009). طی پژوهشی (Direkvandi *et al*., 2020) به منظور استفاده از افزودنی میکروبی برای جلوگیری از اسیدوز با جیره پایه (۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد علوفه) در بره‌های پرواری، دریافتند که پتانسیل تولید گاز و نرخ تولید گاز در تیمارهای آزمایشی حاوی باکتری *مگاسفرا السدنی* نسبت به تیمار شاهد افزایش پیدا کرد. علت احتمالی این نتیجه را شاید بتوان بهبود شرایط اسیدیته شکمبه برای فعالیت میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه گونه‌های سلولتیک که تولیدکننده دی‌اکسید کربن و متان هستند ذکر کرد زیرا بافرها باعث حفظ pH شکمبه (جدول ۳) در محدوده مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌های شکمبه می‌شوند (McDonald *et al*., 2011). در پژوهشی با افزودن بیکربنات سدیم به جیره غذایی به این نتیجه رسیدند که این بافر با افزایش pH مایع شکمبه سبب افزایش رشد و زنده‌مانی جمعیت‌های میکروبی شده و شمار کل باکتری‌های شکمبه، باکتری‌های سلولولایتیک و آمیلولایتیک را در گاومیش افزایش داده است (Koul *et al*., 1998). از طرفی، باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک نظیر *مگاسفرا السدنی* با کاهش تولید این اسید و افزایش pH شکمبه شرایط را برای فعالیت همه انواع باکتری‌ها و در نتیجه افزایش تولید اسیدهای چرب فرار و سایر فرآورده‌های تخمیری فراهم می‌کنند، که این مورد ممکن است باعث افزایش تولید گاز در آزمایش حاضر شده باشد. برای نمونه در آزمایشی، استفاده از افزودنی‌های باکتریایی نظیر *مگاسفرا السدنی* به تنهایی یا همراه با *ساکارومایسس سرویسیه* منجر به افزایش غلظت پروپیونات و بوتیرات شد (Direkvandi *et al*., 2020).

فراسنجه‌های تخمیری تولید گاز: فراسنجه‌های تخمیری تولید گاز جیره بره‌های پرواری حاوی بافر شیمیایی و باکتری *مگاسفرا السدنی* (زیستی) در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی، بازده تولید توده زنده میکروبی و ماده آلی واقعاً تجزیه شده، معنی‌دار شد ($P<۰/۰۵$). بیشترین تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی مربوط به تیمار حاوی بیکربنات سدیم + باکتری *مگاسفرا السدنی* و کمترین مربوط به شاهد بود ($P<۰/۰۵$). برای تولید توده زنده میکروبی، غیر از تیمارهای ۷ و ۹ (به ترتیب حاوی اکسید منیزیوم و زئولیت) که از نظر عددی بیشتر از شاهد بودند، اختلاف سایر تیمارها با شاهد، معنی‌دار و بیشتر بود. بازده تولید توده زنده میکروبی در همه تیمارها غیر از تیمار حاوی زئولیت به‌طور معنی‌داری بیشتر از شاهد بود. تیمار شاهد دارای بیشترین مقدار عامل تفکیک بودکه اختلاف آن فقط با تیمار حاوی بیکربنات سدیم معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$)، اما اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها نداشت.

علت افزایش تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی به تفاوت در مقدار گاز تولیدی باز می‌گردد. به عبارت دیگر، همان عواملی که بر تولید گاز تاثیر می‌گذارند به نوعی منجر به تغییر در این فراسنجه‌ها نیز می‌شوند. پژوهشگران بیان کردند که تولید گاز با تولید اسیدهای چرب فرار و ساخت توده میکروبی، رابطه خطی دارد و مقدار حجم خالص گاز تولیدی به ازای هر واحد سوبسترای تجزیه شده

نشان‌دهنده مقدار سوخت و ساز میکروبی است (Theodorou *et al*., 1994). با افزودن بیکربنات سدیم به جیره غذایی مشخص شد که بیکربنات سدیم با افزایش pH مایع شکمبه سبب افزایش رشد و زنده‌مانی جمعیت‌های میکروبی شده و شمار کل باکتری‌های شکمبه، باکتری‌های سلولولایتیک و آمیلولایتیک را در گاومیش افزایش داده است (Koul *et al*., 1998) که با نتایج به‌دست آمده از آزمایش حاضر، یعنی افزایش تولید توده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی با افزودن بافرهای شیمیایی و میکروبی به جیره مطابقت دارد.

همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، افزودن بافرهای شیمیایی از جمله بیکربنات سدیم نسبت به تیمار شاهد باعث افزایش pH مایع شکمبه و جلوگیری از ایجاد اسیدوز شده است که علت این امر، اثر قلیایی‌کنندگی بافرهای شیمیایی در جیره‌های با کنسانتره بالا است. اما برخلاف نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر (جدول ۳)، در پژوهشی دریافتند که تیمارهای دریافت کننده یک درصد بیکربنات سدیم در مقایسه با تیمار حاوی دو درصد بیکربنات یا سایر تیمارهای حاوی بافرهای دیگر نظیر زئولیت و بنتونیت سدیم، پایین‌ترین مقدار قابلیت هضم ماده آلی، عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی را نشان دادند، در صورتی که تیمارهای حاوی بیکربنات (تیمارهای ۷ تا ۱۰)، بالاترین مقدار را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی داشتند (Khoujeh *et al.*, 2016).

جدول ۳- فراسنجه‌های تخمیری تولید گاز جیره‌های آزمایشی حاوی افزودنی‌های بافری و باکتریایی تنظیم کننده pH در آزمایش تولید گاز

Table 3. Fermentation parameters of gas production of experimental diets containing buffer and bacterial additives regulating ruminal pH in the gas production experiment

Treatment No.	Experimental treatments (basal diet + additive)[1]	Gas production parameters			
		Partitioning factor (mg/mL)	Microbial biomass production (mg)	Microbial biomass production efficiency	Truly degradable organic matter
1	Control (basal diet without additive)	10.20[a]	172.65[c]	0.71[d]	250[b]
2	Basal diet (BD)+ 3 mL *Megasphaera elsdenii* (bacteria)[2]	9.28[abc]	206.65[ab]	0.76[abc]	265[ab]
3	BD+ 1% Sodium bentonite	9.29[abc]	203.25[ab]	0.77[abc]	260[ab]
4	BD+1% Sodium bentonite + 3 mL bacteria	9.42[abc]	209.33[a]	0.79[a]	265[ab]
5	BD+ 1% Bicarbonate sodium	8.39[c]	208.49[ab]	0.78[ab]	270[a]
6	BD+ 1% Sodium bicarbonate + 3 mL bacteria	8.91[bc]	212.31[a]	0.79[a]	270[a]
7	BD+ 1% Magnesium oxide	10.13[a]	180.95[bc]	0.73[cd]	255[ab]
8	BD+ 1% Magnesium oxide + 3 mL bacteria	10.04[a]	195.73[ab]	0.75[abc]	250[b]
9	BD+ 1% Zeolite	9.35 [abc]	188.71[abc]	0.73[cd]	265[ab]
10	BD+ 1% Zeolite + 3 mL bacteria	9.23[abc]	202.77[ab]	0.75[abc]	270[a]
11	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate	9.20[abc]	192.13[ab]	0.75[abc]	260[ab]
12	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate + 3 mL bacteria	9.33 [abc]	202.12[ab]	0.76[abc]	250[b]
SEM		0.335	8.008	0.012	4.621
P-value		0.0259	0.0309	0.0302	0.0488

[1] Control (basal diet, containing 70% concentrate and 30% forage).

[2] *Megasfera elsdenii* (1.5×10^8 cfu/mL).

[a-d] Within the same column, means by similar letters are not significantly different ($P<0.05$).

SEM: Standard error of the means.

نشان داده شده است که حجم گاز بالاتر مربوط به تولید توده زنده میکروبی بالاتر و محتوای دیواره سلولی پایین‌تر است و بیان کردند که با افزایش تولید گاز، قابلیت هضم ماده خشک در محیط آزمایشگاهی بهبود می‌یابد (Aderinboye *et al*., 2016). گزارش شده است که رابطه مثبتی بین تولید توده زنده میکروبی و تولید گاز در گونه‌های گاو، گوسفند و بز وجود دارد (Gasmi *et al*., 2005). با توجه به اینکه بین تیمارهای حاوی افزودنی‌های مختلف بافر شیمیایی و میکروبی مقدار مواد مغذی به ویژه پروتئین متفاوت بود (با توجه به اینکه انواع افزودنی‌ها به‌صورت سرک به جیره پایه افزوده شده بود)، لذا شاید بخشی از اختلاف در فراسنجه‌های تخمیری به ویژه تولید توده زنده میکروبی را بتوان به این مورد نسبت داد. در آزمایشی به منظور بررسی تاثیر منابع مختلف بافری بر فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم فراسنجه‌های تخمیری جیره آزمایشی حاوی ۲۵ درصد علوفه و ۷۵ درصد کنسانتره، تیمار دریافت کننده دو درصد زئولیت، بالاترین مقدار عامل تفکیک، تولید توده زنده میکروبی و بازده تولید توده زنده میکروبی را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی نظیر جیره شاهد (۷۵ به ۲۵ نسبت کنسانتره به علوفه، بدون افزودنی)، جیره شاهد + بیکربنات سدیم، جیره شاهد + بنتونیت سدیم) داشت (Khoujeh *et al*., 2016). پژوهشگرانی با استفاده از افزودنی میکروبی در جیره حاوی ۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد علوفه، مشاهده کردند که جیره حاوی *مگاسافرا السدنی* + *ساکارومایسس‌سرویسیه* + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، یا *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و یا *ساکارومایسس سرویسیه* + *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* + *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، کمترین میزان تولید توده زنده میکروبی را داشتند که متناسب با کاهش تولید توده زنده میکروبی در این تیمارها، بیشترین غلظت نیتروژن آمونیاکی نیز در این تیمارها مشاهده شد که نشان‌دهنده کاهش استفاده از نیتروژن موجود برای تولید توده زنده میکروبی است (Direkvandi *et al*., 2020).

pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی محیط کشت شکمبه و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک: فراسنجه‌های تخمیری پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در جدول ۴ نشان داده شده است. اثر تیمارهای آزمایشی بر pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک، معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). بیشترین غلظت نیتروژن آمونیاکی مربوط به تیمار شاهد بود و غلظت آن در تمامی تیمارها به‌طور معنی‌داری کم‌تر از شاهد بود. بین تیمارهای حاوی بافر نیز از این نظر اختلاف وجود داشت، به‌طوری که غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای ۶ (بیکربنات سدیم + باکتری)، ۷ (اکسید منیزیم) و ۸ (اکسید منیزیم + باکتری) به‌طور معنی‌داری بیشتر از بقیه تیمارهای حاوی بافر بود، اما با یکدیگر اختلافی نداشتند. بیشترین pH و قابلیت هضم ظاهری ماده خشک در تیمار حاوی باکتری مشاهده شد که مقدار pH غیر از تیمار بنتونیت سدیم (تیمار سوم)، نسبت به سایر تیمارهای حاوی بافر، فقط از نظر عددی بیشتر بود. همچنین کمترین مقدار pH مربوط به تیمار شاهد بود ($P<۰/۰۵$). بین تیمارهای حاوی بافر به تنهایی یا بافر و باکتری با یکدیگر و با شاهد اختلافی از نظر قابلیت هضم ظاهری ماده خشک وجود نداشت. نتایج، اثر مفید استفاده از باکتری *مگاسفرا السدنی* را در بهبود فراسنجه‌های تخمیر نسبت به تیمار شاهد نشان داد.

تغذیه جیره حاوی مقدار کنسانتره زیاد و علوفه کم به دلیل افزایش مصرف کربوهیدرات‌های سهل‌الهضم و افزایش دسترسی باکتری‌های شکمبه به ذرات خوراک منجر به افزایش سرعت تجزیه مواد در شکمبه و کاهش pH شکمبه می‌شود (Faichney *et al*., 2004). استفاده از بافرها در خوراک یکی از ابزارهای کنترل pH شکمبه است. بافرها نسبت به تغییر در اسیدیته مقاومت ایجاد می‌کنند. بافرهای حقیقی نظیر بیکربنات سدیم، سدیم سسکوئی کربنات، سنگ آهک و بنتونیت سدیم و مانند آن، از افزایش pH شکمبه جلوگیری می‌کنند، اما pH را بالاتر از حد معینی افزایش نمی‌دهند (Wenping and Murphy, 2005). گزارش شده است که استفاده از مخلوط بیکربنات سدیم، اکسید منیزیم و یک ترکیب تجاری بافری (اسید باف)، سبب افزایش pH محیط کشت در مقایسه با شاهد شد (Danesh Mesgaran *et al*., 2013)، که با نتایج به‌دست آمده در آزمایش حاضر مطابقت دارد. در آزمایش حاضر، افزایش pH شکمبه در اثر افزودن بافر نسبت به تیمار شاهد می‌تواند به دلیل کاتیون‌های قابل تعویض با یون هیدروژن، به عنوان تعدیل‌کننده یون هیدروژن در محیط کشت، باشد که از کاهش pH شکمبه و به تبع آن، اسیدوز جلوگیری می‌کند (Mojtahedi, 2013). در آزمایشی مشخص شد که اکسید منیزیم نسبت به کربنات سدیم، مقدار pH را به میزان بیشتری افزایش داد، اما زمان ماندگاری pH در محدوده بالا در منبع اکسید منیزیم پایین‌تر است. در آزمایش حاضر،

مقدار pH محیط کشت بین دو تیمار به‌طور تقریبی مشابه بود (Bach *et al*., 2018). به‌طور کلی، در نتیجه تاثیر بافر بر pH، جذب اسیدهای چرب فرار با از بین بردن یون‌های هیدروژن (اسیدهای یونیزه شده) و نیز با تبادل اسیدهای چرب فرار یونیزه شده با بیکربنات طی فرآیند جذب، موجب ثابت ماندن pH در محدوده خنثی می‌شود (Stevenson and Glare., 1963; Silanikove *et al*., 2006). نمونه‌برداری از شکمبه دام‌های مصرف کننده جیره‌های حاوی بنتونیت سدیم به عنوان بافر حقیقی طی ساعات مختلف، نمایانگر بالاتر بودن pH شکمبه نسبت به جیره شاهد و عدم افت pH به زیر شش طی همه ساعات بود (Ekrami, 2009). در هنگام استفاده از بنتونیت، کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی به دو شکل ممکن است صورت گیرد: ۱- به دلیل وجود بارهای سطحی در پروتئین‌ها (Dixon *et al*., 2008) و بار مخالف آن در سطح بنتونیت، پروتئین و اسیدهای آمینه به واسطه جذب سطحی به بنتونیت تا حدودی از تخمیر میکروبی محافظت می‌شوند (Brigatti *et al*., 2006)، ۲- وجود خاصیت تعویض کاتیونی نیز در بنتونیت سبب می‌شود تا یون آمونیوم با کاتیون‌های موجود در ساختمان بنتونیت مبادله شود (Theodorou *et al*., 1994). لذا، در آزمایش حاضر، ممکن است همین عوامل سبب کمتر بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار حاوی بنتونیت باشند.

گزارش شده که بنتونیت قادر است در محیطی که غلظت آمونیاک بالا است، آن را جذب کرده و پس از اینکه غلظت آن در محیط کاهش یافت، شروع به آزاد کـردن مجدد آمونیاک کند. بنابراین اضافه کردن بنتونیت به جیره می‌تواند تـا حدودی دسترسی میکروارگانیزم‌ها به نیتروژن را متعادل ساخته و نیز به عنوان یک ماده افزودنی بـا ارزش در جهت بهبود ارزش غذایی خوراک مدنظر قرار گیرد (Ghoniem *et al*., 2018). گزارش شده که اضافه کردن بنتونیت به جیره منجر به کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی نسبت به گروه شاهد شد (Fenn and Leng, 1989; Wallace and Newbold, 1991). در بررسی تخمیر شکمبه‌ای با استفاده از *مگاسفرا السدنی* (Zebeli *et al*., 2012)، دریافتند که pH شکمبه تحت تاثیر افزودن باکتری *مگاسفرا السدنی* به جیره بره‌ها قرار نمی‌گیرد و همچنین مقادیر pH به دامنه کمتر از ۵/۸ نمی‌رسد. در آزمایشی برون‌تنی گزارش شده است که استفاده از *مگاسفرا السدنی* سویه B159 سبب جلوگیری از

جدول ۴- اثر بافرهای شیمیایی و باکتری *مگاسفرا السدنی* بر فراسنجه‌های تخمیری و قابلیت هضم ماده خشک در ساعت ۲۴

Table 4. Effect of chemical buffers and *Megasphaera elsdenii* bacteria on fermentative parameters and *In vitro* dry matter digestibility in 24 h

Treatment No.	Experimental treatments (basal diet + additive)[1]	pH	Ammonia nitrogen (mg/100 mL)	IVOMAD [3]
1	Control (basal diet without additive)	6.12^{c}	27.30^{a}	51.72^{b}
2	Basal diet (BD)+ 3 mL *Megasphaera elsdenii* (bacteria)[2]	6.60^{a}	17.02^{de}	57.32^{a}
3	BD+ 1% Sodium bentonite	6.27^{bc}	16.23^{de}	54.76^{ab}
4	BD+1% Sodium bentonite + 3 mL bacteria	6.50^{ab}	15.91^{e}	55.30^{ab}
5	BD+ 1% Bicarbonate sodium	6.50^{ab}	19.70^{bcde}	52.08^{ab}
6	BD+ 1% Sodium bicarbonate + 3 mL bacteria	6.54^{a}	22.04^{bc}	53.89^{ab}
7	BD+ 1% Magnesium oxide	6.41^{ab}	23.85^{b}	50.82^{ab}
8	BD+ 1% Magnesium oxide + 3 mL bacteria	6.50^{ab}	22.54^{bc}	53.24^{ab}
9	BD+ 1% Zeolite	6.44^{ab}	20.67^{bcd}	50.68^{ab}
10	BD+ 1% Zeolite + 3 mL bacteria	6.46^{ab}	17.93^{cde}	52.74^{ab}
11	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate	6.46^{ab}	19.48^{bcde}	50.98^{ab}
12	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate + 3 mL bacteria	6.49^{ab}	18.09^{cde}	52.02^{ab}
SEM		0.0759	1.374	1.7602
P-value		0.0089	0.0020	0.0244

[1] Control (Basal diet, containing 70% concentrate and 30% forage).

[2] *Megasfera elsdenii* (1.5×10^{8} cfu/mL).

[3] *In vitro* organic matter digestibility (IVOMAD, %) = 14.88 + 0.8893GP + 0.0448CP + 0.0651 Ash.

[a-e] Within the same column, means by similar letters are not significantly different ($P<0.05$).

SEM: Standard error of the means.

تجمع لاکتات و کاهش pH در محیط حاوی کربوهیدرات‌های قابل تخمیر شد (Kung and Hession, 1995). طی انجام پژوهشی (Meissner *et al*., 2014) گزارش شد که ۴۸ تا ۹۶ ساعت عادت‌پذیری برای تاثیر معنی‌دار *مگاسفرا السدنی* بر پایداری pH نیاز است. با آزمایش روی گاوهای شیری مشاهده شده است که افزودن بافرهای کلینوپتیولیت (زئولیت‌ها) و بیکربنات سدیم، تاثیر معنی‌داری بر بهبود قابلیت هضم ماده خشک نداشت (Dschaak *et al*., 2010) که منطبق با نتایج آزمایش حاضر است.

جمعیت پروتوزوآی شکمبه: نتایج مربوط به اثر جیره‌های آزمایشی بر جمعیت پروتوزوآی شکمبه در جدول ۵ ارائه شده است. بین تیمارهای آزمایشی از نظر جمعیت کل یا جنس-های مختلف پروتوزوآ، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P<۰/۰۵$). افزودن باکتری به تنهایی یا همراه با بافرهای شیمیایی در مقایسه با تیمار شاهد، جمعیت کل پروتوزوآ را افزایش داد، اما فقط اختلاف تیمارهای ۲ (جیره پایه + باکتری)، ۴ (بنتونیت سدیم + باکتری)، ۸ (اکسید منیزیم + باکتری)، ۹ (زئولیت) و ۱۰ (زئولیت+ باکتری) با شاهد، معنی دار بود ($P<۰/۰۵$) و اختلاف سایر تیمارها با شاهد، غیرمعنی دار بود. جمعیت هلوتریش‌ها در همه تیمارهای آزمایشی حاوی باکتری یا باکتری-بافر بیشتر از شاهد بود، اما فقط اختلاف تیمارهای ۲، ۳، ۴ و ۸ با شاهد، معنی‌دار شد ($P<۰/۰۵$). در مقایسه با شاهد، تیمارهای ۲ (باکتری *مگاسفرا السدنی*)، ۴ (بنتونیت سدیم + باکتری) و ۹ (زئولیت) باعث افزایش معنی‌دار جمعیت انتودینومورف‌ها شدند ($P<۰/۰۵$). نسبت به تیمار شاهد، اثر تیمارهای ۸ (زئولیت) و ۱۲ (سدیم سسکوئی کربنات + باکتری) بر جمعیت پروتوزوآیی سلولایتیک، معنی‌دار شد ($P<۰/۰۵$) و اختلاف سایر تیمارها با شاهد، معنی‌دار نبود. بیشترین جمعیت انتودینومورف‌ها و کل جمعیت پروتوزوآ مربوط به تیمار ۴ بود و تیمار ۶ (بیکربنات سدیم + باکتری)، کمترین جمعیت را نشان داد.

در یک مطالعه مشخص شد که تغذیه جیره‌های حاوی مواد متراکم زیاد باعث کاهش pH شکمبه تا کمتر از شش و کاهش معنی‌دار غلظت پروتوزوآ می‌شود (Philippeau *et al*., 2017)، که مطابق آزمایش حاضر همان‌طور که در جدول ۵ مشاهده می‌شود، تیمارهای آزمایشی ۴، ۸، ۹ و ۱۰ نسبت به شاهد (جیره پایه با نسبت ۷۰ به ۳۰ کنسانتره/علوفه) به‌صورت معنی‌داری سبب افزایش جمعیت پروتوزوآیی شدند، گرچه سایر تیمارهای آزمایشی نیز افزایش جمعیت را به‌طور عددی و غیرمعنی‌داری نشان دادند. بنتونیت‌ها به دلیل لایه‌های چندوجهی و بار الکتریکی در سطح آن با تداخل در حرکت پروتوزوآی مژک‌دار، فعالیت آن‌ها را کاهش داده و این عمل سبب کاهش بلعیده شدن باکتری‌ها به وسیله پروتوزوآها و اجازه باقی ماندن جمعیت باکتریایی و قارچی بیشتری در مایع شکمبه می‌شود و زمینه فعالیت بیشتر باکتری‌ها را فراهم می‌کند (Baah *et al*., 2007).

تحقیقات نشان داده که اگر چه پروتوزوآها نقش مهمی در هضم الیاف در شکمبه دارند، اما حذف آن‌ها اجازه می‌دهد که باکتری‌ها بیشتر روی الیاف گیاهی، کلونی تشکیل دهند (Krause and Combs, 2003). در آزمایشی با افزودن بنتونیت در شرایط آزمایشگاهی، فعالیت سلولازی باکتری‌ها افزایش غیرمعنی‌داری داشت (Abdl-Rahim, 2010) که این حالت می‌تواند با اعمال آنتاگونیستی بنتونیت بر جمعیت پروتوزوآها، متانوژنزها و باکتری‌های آمیلولتیک مرتبط باشد. مطالعات نشان داد که بنتونیت سدیم با توجه به خاصیت چسبندگی و ماندگاری طولانی در شکمبه، از راه مهار حرکت مژک‌داران سبب کاهش حرکت و مرگ آن‌ها، به خصوص هلوتریش‌ها، می‌شود (Wallace and Newbold, 1991). اما در آزمایش حاضر، افزودن بنتونیت و زئولیت نه تنها باعث کاهش جمعت پروتوزوآیی نشد، بلکه باعث افزایش آن نیز شده است. شاید دلیل این نتیجه را بتوان این‌گونه بیان کرد که افزودن این بافرها به جیره‌های پرکنسانتره آزمایش حاضر با حفظ pH در دامنه مناسب (جدول ۴) باعث افزایش فعالیت پروتوزوآ شده است و آثار منفی بنتونیت و زئولیت تا حدی جبران شده است. حال افزودن باکتری مصرف کننده اسید (*مگالسفرا السدنی*) در کنار بنتونیت و زئولیت باعث تقویت اثر بنتونیت و زئولیت بر حفظ pH شکمبه شده است. لذا جمعیت پروتوزوآیی نیز با بهتر شدن شرایط در این تیمارها (بنتونیت و زئولیت + باکتری) افزایش بیشتری یافته است (جدول ۴). طی پژوهشی مشخص شد که در بین تیمارهای آزمایشی، بیشترین تعداد پروتوزوآی شکمبه در ۴ و ۸ ساعت پس از خوراک‌دهی در گروه دریافت کننده بیکربنات سدیم بود. در کل، علت کاهش تعداد پروتوزوآها در جیره شاهد را می‌توان به کاهش pH شکمبه نسبت داد. افت pH باعث اسیدی شدن شکمبه و تخریب پروتوزوآها می‌شود

(Dehority, 2003) که در آزمایش حاضر نیز در تیمار شاهد، افت pH نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی مشاهده می‌شود (جدول ۳).

تحلیل اقتصادی: نکته مهم و قابل توجه این بود که استفاده از هر یک از انواع بافرها در جیره‌های پرکنسانتره آزمایش حاضر نسبت به شاهد (فاقد بافر)، نتیجه مناسب‌تری داشت و از طرف دیگر، نتیجه حاصل از همه این بافرها تا حدود زیادی نزدیک به هم بود و اختلاف بین بافرها به‌طور مطلق در یکی نسبت به بقیه معنی‌دار نبود و تفاوت‌ها نسبی بود. بنابراین، می‌توان توصیه کرد که در کنار بافرهای متداولی نظیر بیکربنات سدیم و سدیم سسکوئی کربنات که اغلب قیمت بالاتری نسبت به سایر بافرها دارند، توجه به استفاده از سایر بافرها یا قلیایی کننده‌ها، به ویژه بنتونیت و زئولیت و نیز بافر زیستی (باکتری‌های مصرف کننده اسید نظیر *مگالسفرا السدنی* در آزمایش حاضر)، می‌تواند منجر به کاهش هزینه‌های تغذیه و تولید شود. برای نمونه قیمت بیکربنات سدیم، سدیم سسکوئی کربنات، اکسید منیزیوم، بنتونیت و زئولیت به ترتیب ۸۵۰۰۰، ۱۸۰۰۰۰، ۴۳۵۰۰، ۱۰۰۰۰ و ۷۵۰۰ ریال به ازای هر کیلوگرم است. این تفاوت قابل توجه بین بافرها و قلیایی کننده‌هایی نظیر بنتونیت و زئولیت با بیکربنات سدیم، سدیم سسکوئی کربنات و اکسید منیزیوم نشان می‌دهد که استفاده از آن‌ها منجر به بهبود ارزش اقتصادی تولید خواهد شد.

جدول ۵- جمعیت پروتوزوآی شکمبه (×۱۰^{۴}) جیره‌های آزمایشی حاوی بافر شیمیایی و باکتری *مگاسفرا السدنی* در آزمایش تولید گاز

Table 5. Rumen protozoa population (×10^{4}) of experimental diets containing chemical buffer and *Megsfera elsdenii* bacteria in the gas production experiment

Treatment No.	Experimental treatments (basal diet + additive)[1]	Holotrich	Entodinomorphs	Cellulolytic[3]	Total protozoa population
1	Control (basal diet without additive)	0.50^{c}	2.00^{cd}	2.00^{b}	4.50^{c}
2	Basal diet (BD)+ 3 mL *Megasphaera elsdenii* (bacteria)[2]	2.50^{b}	5.50^{b}	1.00^{b}	9.00^{ab}
3	BD+ 1% Sodium bentonite	3.00^{b}	2.00^{cd}	2.50^{ab}	7.50^{bc}
4	BD+1% Sodium bentonite + 3 mL bacteria	2.50^{b}	8.50^{a}	4.00^{ab}	15.00^{a}
5	BD+ 1% Bicarbonate sodium	1.00^{c}	2.00^{cd}	4.50^{ab}	7.50^{bc}
6	BD+ 1% Sodium bicarbonate + 3 mL bacteria	1.00^{c}	0.50^{d}	3.50^{ab}	5.00^{c}
7	BD+ 1% Magnesium oxide	1.00^{c}	1.50^{d}	3.50^{ab}	6.00^{c}
8	BD+ 1% Magnesium oxide + 3 mL bacteria	5.00^{a}	2.50 ^{cd}	1.50^{b}	9.00^{ab}
9	BD+ 1% Zeolite	2.00^{bc}	4.00^{b}	7.50^{a}	13.50^{ab}
10	BD+ 1% Zeolite + 3 mL bacteria	1.50^{bc}	3.00^{bcd}	4.50^{ab}	9.00^{ab}
11	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate	1.50^{bc}	2.50 ^{cd}	1.50^{b}	5.50^{c}
12	BD+ 1% Sodium sesquicarbonate + 3 mL bacteria	0.75^{c}	2.00^{cd}	5.00^{a}	7.50^{bc}
SEM		0.736	0.854	1.315	1.968
P-value		0.0339	0.0016	0.0166	0.0350

[1] Control (Basal diet, containing 70% concentrate and 30% forage).
[2] *Megasfera elsdenii* (1.5×10^{8} cfu/mL).
[3] *Polyplastron*, *Epidinium*, and *Eudiplodinium*
[a-d] Within the same column, means by similar letters are not significantly different (*P*<0.05).
SEM: Standard error of the means.

نتیجه‌گیری کلی

در کل، نتایج آزمایش حاضر نشان داد که استفاده از بافرها باعث بهبود شرایط هضم و تخمیر شد و هر کدام از بافرها روی یک یا چند فراسنجه، تاثیر بیشتری نسبت به بقیه داشتند. به‌علاوه، باکتری مصرف کننده اسید به عنوان تنظیم کننده pH، آثاری قابل رقابت و حتی در مواردی بهتر نسبت به بافرهای شیمیایی به ویژه بافر بیکربنات داشت. اثر تعدادی از بافرهای شیمیایی مورد استفاده در آزمایش حاضر نظیر بیکربنات بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است، اما اثر سایر بافرهای شیمیایی و زیستی اشاره شده در این آزمایش که حتی نسبت به آن دارای قیمت بسیار مناسب‌تری بودند، بر خصوصیات هضمی و تخمیری دام‌های نشخوارکننده کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا، توصیه می‌شود که اثر بافرهای شیمیایی مورد استفاده در آزمایش حاضر به تنهایی یا به همراه باکتری‌های مصرف کننده اسید در تغذیه دام‌های نشخوارکننده مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

از مسئولین محترم دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان برای فراهم آوردن امکان انجام این پژوهش سپاسگزاری می‌شود.

فهرست منابع

Abdl-Rahim M. A. 2010. *In vitro* manipulation of rumen fermentation efficiency by fumaric acid – bentonitecoupled addition as an alternative to antibiotics. Journal of Agricultural Science, 2(2): 174-180.

Aderinboye R. Y., Akinlolu A. O., Adeleke M. A., Najeem G. O., Ojo V. O. A., Isah O. A. and Babayemi O. J. 2016. *In vitro* gas production and dry matter degradation of four browse leaves using cattle, sheep and goat inocula. Slovak Journal of Animal Science, 49(1): 32-43.

Aikman P. C., Henning P. H., Humphries D. J. and Horn C. H. 2011. Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with Megasphaera elsdenii NCIMB 41125 in early lactation. Journal of Dairy Science, 94: 2840-2849.

Asadi A., Kiani A., Azarfar A. and Valipour A. 2016. Effects of Metafix with or without Monensin on performance and blood metabolites in Farahani lambs. Iranian Journal of Animal Science, 47: 421-428. (In Persian).

Baah J. M., Ivan A. N., Hristov K. M., Koenig L. M., Rode T. and McAllister A. 2007. Effects of potential dietary antiprotozoal supplements on rumen fermentation and digestibility in heifers. Animal Feed Science and Technology, 137: 126-137.

Beauchemin K. A. and Yang W. Z. 2005. Effects of physically effective fiber on intake, chewing activity, and ruminal acidosis for dairy cows fed diets based on corn silage. Journal of Dairy Science, 88: 2117-2129.

Bach A., Guasch I., Elcoso G., Duclos J. and Khelil-Arfa H. 2018. Modulation of rumen pH by sodium bicarbonate and a blend of different sources of magnesium oxide in lactating dairy cows submitted to a concentrate challenge. Journal of Dairy Science, 101(11): 9777-9788.

Blümmel M., Steingaβ H. and Becker K. 1997. The relationship between *in vitro* gas production, *in vitro* microbial biomass yield and 15 N incorporation and its implications for the prediction of voluntary feed intake of roughages. British Journal of Nutrition, 77(6): 911-921.

Brigatti M. F., Galan E. and Theng B. K. J. 2006. Strauctures and mineralogy of clay minerals. Handbook Clay Science, Elsevier Ltd.

Broderick G. A. and Kang J. H. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. Journal of Dairy Science, 63: 64-75.

Calsimiglia S., Cardozo P. W., Ferrer A. and Bach A. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to combined effect of type of diet and pH. Journal of Animal Science, 86: 702-711.

Carro M. D., Valdés C., Ranilla M. J. and González J. S. 2000. Effect of forage to concentrate ratio in the diet on ruminal fermentation and digesta flow kinetics in sheep. Journal of Animal Science, 70: 127-134.

Danesh Mesgaran M., Amini J., Paktinat M. 2013. *In vitro* usage of various non-organic compounds to subdue acidogenic value and enhance the fermentation of alfalfa hay-based diets by mixed rumen microbiota. Journal of Livestock Production, 4(10): 165-170.

Dehority B. A. 2003. Rumen microbiology (2nd ed.). London: Academic Press. Pp. 11-151.

Der Bedrosian M. 2009. The effect of sodium bicarbonate or live yeast culture Saccharomyces cerevisiae on the metabolism and production of lactating dairy cows. Ph.D. Dissertation, University of Delaware, Newark, Delaware.

Direkvandi E., Mohammadabadi T. and Salem A. Z. 2020. Oral administration of lactate producing bacteria alone or combined with Saccharomyces cerevisiae and *Megasphaera elsdenii* on performance of fattening lambs. Journal of Applied Animal Research, 48(1): 235-243.

Dixon J. B., Kannewischer I., TenorioArvide M. G. and Barrientos Velazquez A. L. 2008. Aflatoxin sequestration in animal feeds by quality-labelledsmectite clays: an introductory plan. Applied Clay Science, 40: 201-208.

Dschaak C., Eun M., Young J. S., Stott A. J. and Peterson S. 2010. Effects of supplementation of natural zeolite on intake, digestion, ruminal fermentation, and lactational performance of dairy cows. The Professional Animal Scientist, 26: 647-654.

Ekrami S. H. S. 2009. Utilization of growth promoters and bentonite in sheep rations. Ph.D. Dissertation, University of Al-Azhar, Egypt.

Faichney G. J., Teleki E. and Brown G. H. 2004. Effect of physical form of lucene hay on digestion and rate of passage in sheep. Australian Journal of Agricultural Research, 55: 1253-1262.

Fenn P. D. and Leng R. A. 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 Agricultural Research, 40: 889-896.

Gasmi Boubaker A., Kayouli C. and Buldgen A. 2005. *In viro* gas produvtion and its relationship to in situ disappearance and chemical composition of some Mediterrnean browse species. Animal Feed Science and Technology, 123-124: 303-311.

Ghoniem A. H., El–Bltagy E. A. and Abdou A. A. 2018. Effect of supplementation dry yeast or bentonite and their combination as feed additives on productive performance of lactating buffalos. Journal of Animal and Poultry Production, 9(11): 423-431.

Harrison J. R., White R., Kincaid E., Block T., Jenkins N. and Pierre S. T. 2012. Effectiveness of potassium carbonate sesquihydrate to increase dietary cation-anion difference in early lactation cows. Journal of Dairy Science, 95(7): 3919-3925.

Hu W. and Murphy M. R. 2005. Statistical evaluation of early- and mid-lactation dairy cow responses to dietary sodium bicarbonate addition. Animal Feed Science and Technology, 119: 43-54.

Khalifeh M. J., Mohammadabadi T., Chaji M., Salari S. and Khalil M. 2012. The effect of different levels of sodium bentonite on *in vitro* fermentation and digestibility of soybean meal. In: Proceedings of the 15th AAAP Animal Science Congress, 26-30 November. Thailand. Pp. 3133-3135.

Khoujeh B., Gharehbash A. M., Bayat Kouhsar J. and Moslemipour F. 2016. Effect of using different sources of buffer on digestibility and fermentation parameters in *In vitro* situation. Proceedings of the 7th Iranian Congress on Animal Science, Karaj, Iran. (In Persian).

Koul V., Kumar U., Sareen V. K. and Singh S. 1998. Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves. Indian Journal of Animal Science, 68: 629-631.

Krause K. M. and Combs D. K. 2003. Effects of forage particle size, forage source and grain fermentability on performance and ruminal pH in midlactation cows. Journal of Dairy Science, 86: 1382-1397.

Kung L. and Hession A. O.1995. Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with (*Megasphaera elsdenii)*. Journal of Animal Science, 73(1): 250-256.

Mao S., Huo W., Liu J., Zhang R. and Zhu W. 2017. *In vitro* effects of sodium bicarbonate buffer on rumen fermentation, levels of lipopolysaccharide and biogenic amine, and composition of rumen microbiota. Journal of the Science of Food and Agriculture, 97(4): 1276-1285.

McDaniel M. R. 2009. The effects of dosing feedlot cattle with *Megasphaera elsdenii* strain NCIMB 41125 prior to the introduction of a grain-rich diet. Ph.D. Dissertation, Kansas State University, Kansas.

McDonald P., Edwards R. A., Greenhalgh J. F. D., Morgan C. A., Sinclair L. A. and Wilkinson R. G. 2011. Animal Nutrition (7th ed.). Harlow United Kingdom: Longman Group. Pp. 30-693.

Meissner H. H., Henning P. H., Leeuw K. J., Hagg F. M., Horn C. H., Kettunen A. and Apajalahti J. H. A. 2014. Efficacy and mode of action of selected non-ionophore antibiotics and direct-fed microbials in relation to *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 during *in vitro* fermentation of an acidosis-causing substrate. Livestock Science, 162: 115-125.

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

Mojtahedi M. 2013. Identification of nanostructure and nanoporous bentonite adsorbents and their efficiency on aflatoxin b1 detoxification *in vitro* and *in vivo*. Ph.D. Dissertation, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. (In Persian).

Mohammadabadi T., Bakhtiari M. A. and Alimirzaei P. 2018. Isolation and identification of lactate-producing and utilizing bacteria from the rumen of Najdi goats. Indian Journal of Small Ruminant, 24(2): 276-280.

Norollahi H. 2007. Effect of fattening period on growth and carcass characteristics of male Turkey-Ghashghaii lambs. Pajohesh and Sazandegi, 75: 132-137. (In Persian).

Orskov E. R. and McDonald I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agricultural Science, 92: 499-503.

Papi N. and Mostafa Tehrani A. 2017. Effects of dietary concentrate levels on growth performance, feed intake and carcass characteristics of fattening shall male lambs. Journal of Ruminant Research, 5(2): 59-70. (In Persian).

Philippeau C., Lettat A., Martin C., Silberberg M., Morgavi D. P., Ferlay A. and Nozière P. 2017. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal characteristics, methane emission, and milk fatty acid composition in cows fed high-or low-starch diets. Journal of Dairy Science, 100(4): 2637-2650.

Plaizier J. C., Danesh Mesgaran D., Derakhshani H., Golder H., Khafipour E., Kleen J. L., Lean I., Loor J., Penner G. and Zebeli Q. 2018. Enhancing gastrointestinal health in dairy cows: A review. Animal, 12(2): 399-418.

Prabhu R., Altman E. and Eiteman M. A. 2012. Lactate and acrylate metabolism by Megasphaera elsdenii under batch and steady-state conditions. Applied and Environmental Microbiology, 78: 8564-8570.

Silanikove N., Landau S., Kababya D., Bruckental I. and Nitsan Z. 2006. Analytical approach and effects of condensed tannins in carob pods (*Ceratonia siliqua*) on feed intake, digestive and metabolic responses of kids. Livestock Science, 99: 29-38.

Stevenson A. E. and Glare N. T. 1963. Measurement of feed intake by grazing cattle and sheep. New Zealand Journal of Agricultural Research, 6(1-2): 121-126.

Sulzberger S. A., Kalebich C. C., Melnichenko S. and Cardoso F. C. 2016. Effects of clay after a grain challenge on milk composition and on ruminal, blood, and fecal pH in Holstein cows. Journal of Dairy Science, 99(10): 8028-8040.

Theodorou M. K., Williams B. A., Dhanoa M. S., McAllan A. B. and France J. A. 1994. Simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. Animal Feed Science and Technology, 48: 185-197.

Vaghar Seyedi, S.M., Mojtahedi M., Ghiasi S.A. and Fathi Nasri M.H. 2018. Buffering capacity of some native alkalizer and buffer compounds and their effect on *in vitro* gas production and digestibility. Iranian Journal of Animal Science Research, 11 (40): 425-436. (In Persian).

Wallace R. J. and Newbold C. J. 1991. Effect of bentonite on fermentation in the rumen simulation technique (Rusitec) and rumen ciliate protozoa. Journal of Agricultural Science, 116: 163-175.

Wang Y. H., Xua M., Wang F. N., Yz Z. P., Yao J. H., Zan L. S. and Yang F. X. 2009. Effect of dietary starch on rumen and small intestine morphology and digesta pH in goats. Livestock Science, 122: 48-52.

Zebeli Q., Terrill S. J., Mazzolari A., Dunn S. M., Yang W. Z. and Ametaj B. N. 2012. Intraruminal administration of *Megasphaera elsdenii* modulated rumen fermentation profile in mid-lactation dairy cows. Journal of Dairy Research, 79(01): 16-25.