

## اثر منبع کاتیونی و اختلاف آنیون - کاتیون جیره گاو شیری در اوایل شیردهی بر قابلیت هضم شکمبه‌ای، تولید گاز متان و جمعیت میکروبی شکمبه به روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز رقابتی

یاسر فیض‌دار برآبادی<sup>۱</sup>، سید احسان غیائی<sup>۲\*</sup>، محمد باقر منتظر تربتی<sup>۲</sup>

۱- دانشجوی دکترای علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران،

۲- استادیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۱ تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱/۱۸

### چکیده

هدف از انجام این پژوهش بررسی اثر منبع و توازن آنیون - کاتیون جیره (DCAD) گاوهای شیری بر جمعیت پروتوزوآها، متانوژن‌ها، غلظت نیتروژن آمونیاکی، گاز متان و قابلیت هضم ماده خشک در شرایط آزمایشگاهی بود. برای شمارش جمعیت پروتوزوآها و متانوژن‌ها از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) رقابتی استفاده شد. این طرح برای گاو شیری در اوایل شیردهی با میانگین ۵۸۰ کیلوگرم وزن بدن، سن ۲۵ ماهگی و تولید روزانه ۳۵ کیلوگرم در قالب آزمایش فاکتوریل ۲×۳ انجام شد. عوامل مؤثرها شامل DCAD (meq/kgDM) ۱۵۰+، ۲۵۰+ و ۳۵۰+، منابع پتاسیم (کربنات پتاسیم بدون آب (KC) و کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات (KCS)) و منابع منیزی (اکسید منیزیم (MO) و کربنات منیزیم (MC)) بود. اثر تیمارهای آزمایشی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی معنی‌دار نبود. در همه تیمارها افزایش DCAD باعث کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در شکمبه شد. اثر تیمارهای آزمایشی بر تولید گاز متان، قابلیت هضم ماده خشک، جمعیت پروتوزوآها و متانوژن‌ها معنی‌دار بود. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تیمار حاوی DCAD ۲۵۰+ میلی‌اکی‌والان تأمین شده از دو منبع کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و کربنات منیزیم باعث کاهش جمعیت پروتوزوآ، متانوژن‌ها، تولید متان و افزایش قابلیت هضم ماده خشک می‌شود. با توجه به اینکه اختلاف معنی‌دار بین DCAD ۲۵۰+ و ۳۵۰+ مشاهده نشد، بنظر می‌رسد که منابع کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و کربنات منیزیم به همراه سطح تعادل آنیون - کاتیون جیره ۲۵۰+ میلی‌اکی‌والان از طریق بهبود شرایط بافری شکمبه باعث بهبود پارامترهای تخمیر شکمبه‌ای می‌شود. بنابراین این دو منبع احتمالاً مکمل‌های مناسبی در جیره گاوهای شیری هستند.

**کلمات کلیدی:** جمعیت میکروبی، قابلیت هضم، متان، نیتروژن آمونیاکی، PCR رقابتی

\*نویسنده مسئول: سید احسان غیائی

آدرس: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند-ایران.

پست الکترونیک: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir

## مقدمه

مطالعه میکروارگانیسم‌های شکمبه، اثرات متقابل آنها و میزان وابستگی آنها با سیستم‌های مختلف زیستی در سال‌های اخیر به طور چشمگیری افزایش یافته است (۳۱). نشخوارکنندگان موجوداتی هستند که رابطه همزیستی قابل توجهی با میکروارگانیسم‌های شکمبه دارند. با توجه به اینکه بازده استفاده از جیره توسط میکروارگانیسم‌های شکمبه یکسان نیست؛ بنابراین بررسی عوامل مؤثر بر رشد و تغییر این میکروارگانیسم‌ها و همچنین بررسی تأثیر دستکاری‌های تغذیه‌ای بر روی گروه‌های میکروبی شکمبه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (۳).

به طور کلی میکروارگانیسم‌های شکمبه به پنج دسته قارچ‌ها، پروتوزوا، فاژها، آرک‌ها و باکتری‌ها تقسیم بندی می‌شوند. متانوژن‌ها جزء حوزه آرکی‌ها هستند و به لحاظ فیلوژنتیکی با پروتوزواها و قارچ‌ها متفاوتند. در حدود ۲ تا ۴ درصد از فلور میکروبی شکمبه را متانوژن‌ها به خود اختصاص داده اند. متانوژن‌هایی که از محتویات شکمبه کشت شده اند تنها به چند جنس و گونه تعلق دارند؛ در حالی که متانوژن‌ها خارج از محیط شکمبه به ۲۳ جنس و صدها گونه طبقه‌بندی می‌شوند (۲۷). پروتوزواها اولین میکروارگانیسم‌هایی بودند که به علت اندازه و فعالیت قابل توجه در شکمبه کشف شدند. پروتوزواها همانند باکتری‌ها در شکمبه بی‌هوازی بوده و جزء مؤک‌داران هستند (۱). امروزه روش‌های مختلفی برای شمارش باکتری‌های شکمبه استفاده می‌شود.

یکی از روش‌های شناخته شده در بررسی کمی اکوسیستم میکروبی شکمبه تکنیک PCR رقابتی می‌باشد. تکنیک PCR رقابتی کمی شامل تکثیر همزمان یک قطعه از DNA هدف به همراه مقادیر مشخصی از DNA رقیب می‌باشد؛ چنانچه این دو قطعه

در یک واکنش PCR به عنوان الگوی تکثیر قرار بگیرند، بر اساس غلظت‌های اولیه بر سر محتوی واکنش PCR رقابت می‌کنند. بنابراین می‌توان از روی نسبت شدت باندهای محصولات PCR این دو قطعه بر روی ژل آگارز، غلظت اولیه DNA هدف را به طور نسبی مورد ارزیابی قرار داد (۲۲). اگر چه تکنیک PCR رقابتی نسبتاً پیچیده است ولی صحت و بسامد استفاده از آن در مطالعات بیشتر از دیگر تکنیک‌های کمی و حتی بیشتر از Real-time PCR گزارش شده است (۳۴). سخاوتی و همکاران (۲۹) از تکنیک PCR رقابتی برای شمارش بسیاری از میکروارگانیسم‌های مرتبط با دستگاه گوارش نشخوارکنندگان استفاده کردند.

اختلاف آنیون - کاتیون جیره (DCAD) شامل تفاوت بین کاتیون‌ها و آنیون‌های ثابت جیره می‌باشد. اختلاف بین آنیون‌ها و کاتیون‌های خاص سهم بیشتری بر عملکرد فیزیولوژیکی دام نسبت به اثر انفرادی آنها دارد (۲). استفاده از جیره‌هایی با DCAD نرمال در ارتباط مستقیم با عملکرد و بهره‌وری دام بوده و از دیر باز مورد توجه متخصصان تغذیه دام قرار گرفته است (۱۰). دستکاری اختلاف آنیون - کاتیون جیره، با تقویت بی‌کربنات خون و سیستم بافری بدن در خنثی نمودن اسید حاصل از سوخت و ساز مواد غذایی مؤثر بوده و افزایش تولید شیر را بدنبال خواهد داشت. هیو و همکاران (۲۰) و همچنین چان و همکاران (۱۳) گزارش کردند که گاوها در اوایل شیردهی DCAD بالاتری نسبت به اواخر شیر دهی نیاز دارند. کاربونو و همکاران (۱۴) نیز بیان کردند که مصرف ماده خشک از طریق کاهش DCAD در گاوهای دوره انتقال به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. هاریسون و همکاران (۱۹) بیان کردند که افزایش DCAD در اوایل شیردهی باعث بهبود عملکرد شکمبه، افزایش قابلیت هضم ماده خشک و در نتیجه افزایش مصرف ماده خشک می‌شود.

شد. در مرحله بعد توازن آنیون - کاتیون جیره بر اساس معادله (۱۸) محاسبه گردید و منابع کاتیونی بر اساس احتیاجات گاوهای شیری به جیره پایه اضافه شد تا به سطح DCAD مورد نظر برسد. ترکیب جیره پایه و تیمارهای آزمایش در جدول (۱) نشان داده شده است. هر تیمار شامل یک سطح منبع مکمل پتاسیمی و یک سطح منبع مکمل منیزیمی بود. در همه تیمارها نسبت پتاسیم به منیزیم به طور ثابت ۴/۲ در نظر گرفته شد. تعادل آنیون - کاتیون جیره پایه ۱۱۰+ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک بود. در مرحله دوم نمک‌ها کاتیونی کربنات پتاسیم بدون آب (kC)، کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات (kcs)، اکسید منیزیم (mo) و کربنات منیزیم (mc) به عنوان درصدی از جیره به جیره پایه اضافه شد تا به سطح تعادل آنیون - کاتیون مورد نظر برسیم. هر تیمار شامل یک سطح اختلاف آنیون - کاتیون (۱۵۰+، ۲۵۰+ و ۳۵۰+) و یک منبع مکمل پتاسیمی (کربنات پتاسیم بدون آب، کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات) و یک منبع مکمل منیزیمی (اکسید منیزیم، کربنات منیزیم) بود.

$$DCAD(mEq/kg) = (Na(g/kg)/0.023 + k(g/kg)/0.039 + 0.15Ca(g/kg)/0.020 + 0.15Mg(g/kg)/0.012) - (Cl(g/kg)/0.035 + 0.2S(g/kg)/0.016 + 0.3P(g/kg)/0.017)$$

معادله (۱)

در این روش ابتدا مایع شکبه قبل از تغذیه صبح از ۳ رأس گاو هلشتاین در اوایل شیردهی با میانگین ۵۸۰ کیلوگرم وزن بدن، سن ۲۵ ماهگی و تولید روزانه ۳۵ کیلوگرم دارای فیستولای شکبه واقع در واحد دامپروری دانشکده کشاورزی بیرجند به وسیله پمپ خلاء از طریق فیستولای شکبه جمع آوری شد. محتویات شکبه به وسیله چهار لایه پارچه متقال صاف

بنابراین افزایش DCAD از طریق منابع کاتیونی می‌تواند بر روی میکروارگانیسم‌های شکبه تأثیرگذار باشد؛ لذا این تحقیق به منظور بررسی اثر منبع کاتیونی و DCAD جیره گاو شیری بر قابلیت هضم شکبه‌ای، تولید گاز متان و جمعیت پروتوزواها و متانوژن‌های شکبه به روش PCR رقابتی در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### ترکیب جیره و تیمارهای آزمایشی

مراحل میدانی این تحقیق از جمله جمع‌آوری مایع شکبه در شهریور سال ۱۳۹۵ در واحد دامپروری دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند و تجزیه آزمایشگاهی آن در آزمایشگاه‌های تغذیه و میکروبیولوژی دام همین دانشکده انجام گرفت. ابتدا جیره‌های آزمایشی بر اساس احتیاجات گاو شیری به وسیله نرم افزار جیره نویسی NRC (۲۶) تنظیم شد و سپس نمونه‌های آزمایشی با آسیاب و غربال یک میلی‌متری آسیاب شدند. غلظت عناصر معدنی موثر در فرمول DCAD با روش AOAC (۷) و با استفاده از دستگاه جذب اتمی برای کاتیون‌ها، و روش گراویمتری برای کلر و گوگرد و روش اسپکتروفوتومتری برای فسفر در جیره پایه اندازه گیری

### نمونه‌گیری از مایع شکبه و آزمایش تولید گاز

این آزمایش در واحد دامپروری دانشکده کشاورزی دانشگاه بیرجند انجام شد. به منظور بررسی اثرات منبع و توازن آنیون - کاتیون جیره گاو شیری پرفرانسجه‌های تخمیر شکبه‌ای، تولید گاز متان و تجزیه‌پذیری ماده خشک از آزمایش تولید گاز به روش نیمه اتوماتیک با ۱۵ تکرار و ۲ ران برای هر آزمایش استفاده شد (۱۱،۵).

شد و سپس به صورت بی‌هوای درون بطری داخل فلاسک عایق حاوی آب گرم ۳۹ درجه قرار داده شد و بلافاصله به آزمایشگاه منتقل شد. جهت اطمینان از بی‌هوای بودن مایع شکمبه صاف شده گاز دی اکسید کربن به طور مداوم به آن تزریق شد و قبل از استفاده جهت انکوباسیون در حمام آب گرم (۳۹ درجه) قرار گرفت. مکمل‌های کاتیونی به عنوان درصدی از جیره به شکل محلول‌های میکرولیتری به شیشه‌ها اضافه شد، سپس ۵۰۰ میلی گرم نمونه ماده خشک و ۵۰ میلی لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی به نسبت ۱ قسمت مایع شکمبه و ۲ قسمت بزاق مصنوعی در شیشه‌های ۱۲۰ میلی لیتری بی‌هوای ریخته شد و در دستگاه انکوباتور قرار داده شد.

برای اندازه‌گیری ماده خشک هضم شده حقیقی، غلظت نیترژن و میزان متان تولیدی از محیط کشت و شرایط تولید گاز به شیوه Batch culture با سه تکرار برای هر فراسنجه استفاده شد. برای تعیین غلظت نیترژن آمونیاکی در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نمونه‌گیری از محیط کشت بعمل آمد (۱۲). علاوه بر این برای اندازه‌گیری گاز متان در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ نمونه‌گیری از گاز تولید شده در فضای فوقانی شیشه‌های کشت بعمل آمد. بدین منظور گاز متان توسط سرنگ‌های ایزوله نمونه‌برداری شد و توسط سیستم الکترونیکی مجهز به حسگر استاندارد گاز متان، غلظت گاز مذکور تعیین شد. تجزیه‌پذیری ظاهری ماده خشک در زمان‌های ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۱۲۰ اندازه‌گیری شد (۵).

### ساخت رقیب و انجام PCR رقابتی

برای شمارش جمعیت پروتوزوآها و متانوزن‌ها در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ از آغاز انکوباسیون نمونه‌گیری از محیط کشت بعمل آمد. نمونه‌ها به وسیله پارچه صافی با قطر حفرات ۵۰ میکرومتر و پمپ خلاء صاف شدند و

در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. استخراج DNA از نمونه‌های مایع شکمبه مطابق روش (RBB+C) با اندکی تغییرات انجام شد (۳۳). پس از استخراج DNA برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده از روش اسپکتروفتومتری و از دستگاه نانودرآپ مدل (EPPNDAROF V.2000) استفاده شد. جهت اندازه‌گیری غلظت و کیفیت DNA نمونه‌ها ابتدا دستگاه با ۲ میکرولیتر بافر TE کالیبره شد. سپس به وسیله دستمال مخصوص الکترودهای دستگاه تمیز شد و ۲ میکرولیتر از نمونه‌های DNA که با بافر TE رقیق شده بود بر روی الکتروود ثابت ریخته شد تا در معرض طول موج‌های تولیدی دستگاه (۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر) قرار بگیرد. نسبت جذب بین این دو طول موج عبوری از DNA استخراج شده، برآوردی از خلوص DNA می‌باشد. نسبت جذب این طول موج‌ها در DNA خالص بین ۱/۸ تا ۲ است که مقادیر کمتر از ۱/۸ می‌تواند نشان دهنده آلودگی پروتئینی و مقادیر بیشتر از ۲ نشان دهنده وجود RNA در نمونه‌ها باشد.

برای شمارش باکتری‌های موجود در مایع شکمبه از DNA موجود در نمونه‌ها استفاده شد. بدین روش که رقت‌های دهدهی از نمونه DNA استخراج شده تهیه گردید و برای هر یک از آنها واکنش PCR انجام شد. در مرحله بعد این رقت‌های دهدهی به طور متوالی رقیق گردید. رقت‌های حاصل به همراه DNA استخراج شده از مایع شکمبه به طور همزمان تکثیر شدند. مشخصات آغازگرهای مورد استفاده، در جدول (۲) نشان داده شده است. برای مشاهده محصولات PCR رقابتی از ژل آگارز یک درصد که با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شده بود، استفاده گردید. برای ساختن ژل آگارز یک درصد ابتدا یک گرم پودر آگارز وزن شد و با ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر TBE (IX) مخلوط شد. سپس محلول فوق حرارت داده شد تا پودر آگارز در آن حل شود و

افزوده شد. این مارکر حاوی قطعاتی از مولکول DNA با وزنهای مشخص می‌باشد که برای تخمین وزن مولکولهای DNA مورد استفاده قرار می‌گیرد. برای مشاهده کیفیت باندهای DNA از دستگاه ترانس لومیناتور استفاده شد. تصاویر بدست آمده با استفاده از نرم‌افزار Image J از نظر شدت و اندازه باند آنالیز شد. نتایج در نرم‌افزار آماری اکسل ثبت شد. برای هر نمونه رقت استفاده شده در برابر DNA و رقیب پلات شد. سپس مختصات محل تقاطع DNA و رقیب ثبت شد. با استفاده از معادله (۱) بر اساس وزن مولکولی رقیب استفاده شده و طول توالی رقیب تعداد کپی هر جمعیت در هر نمونه مشخص شد. در فرمول زیر هر جفت باز معادل ۶۶۰ گرم بر مول می‌باشد (۹).

محلول شفاف بدست آید. پس از سرد شدن محلول فوق ۷ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن اضافه شد. شانه مورد نظر داخل سینی تهیه ژل قرار گرفت و پس از بستن ژل شانه به آرامی از آن خارج شد تا چاهک‌ها برای بارگذاری محصول PCR ایجاد شود. در مرحله بعد ۸ میکرولیتر محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری ژل (حاوی گلیسرول و بروموفنول) ترکیب شد و در چاهک‌های ایجاد شده بر روی ژل ریخته شد. سپس ژل داخل تانک الکتروفورز قرار گرفت و در تانک الکتروفورز بافر TBE(1X) ریخته شد تا سطح ژل را به طور کامل پوشاند و ژل داخل تانک غوطه‌ور شد.

در طی بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل مارکر DNA (لدر) در مشابه محصول PCR در چاهک جداگانه‌ای

$$\text{Number of copies (molecules)} = \frac{xng * 6.0221 \times 10^{23} \text{ molecules / mole}}{(N * 660g / \text{mole})^i * 10^9 \text{ ng / g}} \quad \text{معادله (۱)}$$

در این معادله X (وزن مولکولی رقیب بر حسب نانوگرم) و N (طول قطعه رقیب) می‌باشد.

جدول شماره ۱: مواد خوراکی، ترکیب شیمیایی جیره‌ها و تیمارهای آزمایشی

اجزای جیره غذایی (DM%)											
تیمارهای آزمایشی <sup>۱</sup>											
۱	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱	۷/۴۱
۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷	۱۷/۳۷
۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷	۳۴/۲۷
۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹	۱۸/۲۹
۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳	۹/۷۳
۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴	۳/۹۴
۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷	۰/۳۷
۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸	۴/۶۸
۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲	۰/۳۲
۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲	۰/۵۲
۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲	۱/۰۲
-	-	۰/۰۱۸	۰/۰۱۸	-	-	۰/۰۱۱۸	۰/۰۱۱۸	-	-	۰/۰۰۵۵۵	۰/۰۰۵۶
۰/۰۲۱۵	۰/۰۲۱۵	-	-	۰/۰۱۴۱	۰/۰۱۴۱	-	-	۰/۰۰۶۶	۰/۰۰۶۷	-	-
-	۰/۰۰۴	-	۰/۰۰۴	-	۰/۰۰۲۶	-	۰/۰۰۲۶	-	۰/۰۰۱۲	-	۰/۰۰۱۲۵
۰/۰۰۹۶	-	۰/۰۰۹۵	-	۰/۰۰۶۲	-	۰/۰۰۶۱	-	۰/۰۰۲۹۵	-	۰/۰۰۲۹	-
<b>ترکیب شیمیایی جیره</b>											
۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹	۱/۵۹
۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱	۲/۵۱
۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳	۱۸/۳
۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷	۱۳/۷
۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱	۳۵/۱
۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵	۳۶/۵
۱/۱۶۸	۱/۱۷۵	۱/۱۷۲	۱/۱۷۹	۱/۱۸۱	۱/۱۸۵	۱/۱۸۴	۱/۱۸۶	۱/۱۹۴	۱/۱۹۶	۱/۱۹۵	۱/۱۹۷
۰/۱۸۶	۰/۱۸۷	۰/۱۸۶	۰/۱۸۷	۰/۱۸۸	۰/۱۸۸	۰/۱۸۸	۰/۱۸۹	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰
۱/۹۸۴	۱/۹۸۹	۱/۹۸۸	۱/۹۹۴	۱/۹۴۴	۱/۹۴۸	۱/۹۴۷	۱/۹۵۱	۱/۳۰۰	۱/۳۰	۱/۳۰۳	۱/۳۰۸
۰/۵۷۴	۰/۵۷۷	۰/۵۷۳	۰/۵۷۸	۰/۴۹۳	۰/۴۹۶	۰/۴۹۱	۰/۴۹۶	۰/۴۱۵	۰/۴۱۷	۰/۴۱۴	۰/۴۱۸
۰/۷۷۰	۰/۷۷۴	۰/۷۷۳	۰/۷۷۷	۰/۷۷۸	۰/۷۸۱	۰/۷۸۰	۰/۷۸۳	۰/۷۸۷	۰/۷۸۸	۰/۷۸۸	۰/۷۸۹
۰/۷۷۶	۰/۷۸۰	۰/۷۷۹	۰/۷۸۳	۰/۷۸۴	۰/۷۸۷	۰/۷۸۶	۰/۷۸۹	۰/۷۹۳	۰/۷۹۴	۰/۷۹۴	۰/۷۹۵
۰/۳۳۴	۰/۳۳۶	۰/۳۳۵	۰/۳۳۷	۰/۳۳۸	۰/۳۳۹	۰/۳۳۸	۰/۳۴۰	۰/۳۴۱	۰/۳۴۲	۰/۳۴۲	۰/۳۴۲
۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۳۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۲۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰	۱۵۰

۱- تیمارهای آزمایشی شامل: تیمار (۱): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + کرنات منیزیم + DCAD ۱۵۰ (MEq/kg) تیمار (۲): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + کرنات منیزیم + ۲۵۰ (MEq/kg) تیمار (۳): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + کرنات منیزیم + ۳۵۰ (MEq/kg) تیمار (۴): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + اکسید منیزیم + ۱۵۰ (MEq/kg) تیمار (۵): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + اکسید منیزیم + ۲۵۰ (MEq/kg) تیمار (۶): کرنات پتاسیم سسکونی هیدرات + اکسید منیزیم + ۳۵۰ (MEq/kg) تیمار (۷): کرنات پتاسیم + کرنات منیزیم + ۱۵۰ (MEq/kg) تیمار (۸): کرنات پتاسیم + کرنات منیزیم + ۲۵۰ (MEq/kg) تیمار (۹): کرنات پتاسیم + کرنات منیزیم + ۳۵۰ (MEq/kg) تیمار (۱۰): کرنات پتاسیم + اکسید منیزیم + ۱۵۰ (MEq/kg) تیمار (۱۱): کرنات پتاسیم + اکسید منیزیم + ۲۵۰ (MEq/kg) تیمار (۱۲): کرنات پتاسیم + اکسید منیزیم + ۳۵۰ (MEq/kg)

۲- شامل آهن، منگنز، روی، مس، سلنیوم، ید، کولین، ویتامین A، ویتامین D3، ویتامین E، ویتامین K3، ویتامین B1، ویتامین B2، ویتامین B3، ویتامین B5، ویتامین B6، ویتامین B9، ویتامین B12، ویتامین H2، آنتی اکسیدان.

جدول ۲: آغازگرهای مورد استفاده به منظور انجام واکنش PCR جهت شناسایی پروتوزوآها و متانوزنها شکمبه

توالی	نوع	جمعیت میکروبی
F 5' - TCA GTA CCT TAT GAG AAA TC - 3' R 5' - CAG GAC ATA TAA GGG CAT CAC - 3'	پرایمر اصلی	پروتوزوآ
F 5' - TCA GTA CCT TAT GAG AAA TC - 3' RC 5' - CAG GAC ATA TAA GGG CAT CAC GAC AAA TCA CTC CAC CAA CTA - 3'	رقیب	پروتوزوآ
F 5' - GAT CAG GCA ACG AGC GAG AC - 3' R 5' - GTG TGT GCA AGG AGC AGG GAC - 3'	پرایمر اصلی	متانوزنها
R 5' - GTG TGT GCA AGG AGC AGG GAC - 3' FC 5' - AGT CAG GCA ACG AGC GAG ACG CWA CAC GCG GGC TAC AAT G - 3'	رقیب	متانوزنها



## معادلات و روش های آماری

میانگین‌ها از آزمون توکی کرامر در سطح ۵٪ خطا استفاده شد. مدل آماری مورد استفاده به صورت زیر می‌باشد. برای تحلیل داده‌های تکرار دار در زمان از روش Repeated measure رویه آماری GLM استفاده شد.

داده‌های به دست آمده حاصل از آزمایش Batch culture در قالب آزمایش فاکتوریل با سه سطح DCAD، دو نوع منبع مکمل پتاسیمی و دو نوع منبع مکمل منیزی با ۱۲ تیمار و ۳ تکرار برای هر تیمار با استفاده از نرم افزار SAS (۲۸) رویه مدل خطی عمومی (GLM) تجزیه و تحلیل آماری شده و برای مقایسه

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + C_k + ABC_{ijk} + E_{ijkl}$$

$Y_{ijk}$ : مقدار هر مشاهده

$\mu$ : میانگین کل

$A_i$ : اثر سطح  $i$ ام عامل A

$B_j$ : اثر سطح  $j$ ام عامل B

$C_k$ : اثر سطح  $k$ ام 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

$E_{ijkl}$ : اثر خطای آزمایشی

مختلف DCAD به لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). به طوریکه در سطح DCAD +۱۵۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک بیشترین مقدار نیتروژن آمونیاکی تولیدی و در سطح DCAD +۲۵۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک کمترین مقدار مشاهده شد. این در حالی بود که بین سطوح +۲۵۰ و +۳۵۰ هیچگونه اختلاف معنی‌دار آماری مشاهده نشد. علاوه بر این اثر متقابل دوتایی منبع منیزیم و DCAD بر روی تولید نیتروژن آمونیاکی کل و سطح زیر منحنی نیتروژن آمونیاکی به لحاظ آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). اثرات متقابل سه تایی منابع پتاسیم، منیزیم و DCAD بر روی نیتروژن آمونیاکی کل و سطح زیر منحنی نیتروژن آمونیاکی معنی‌دار نبود.

اثر تیمارهای آزمایشی بر تولید گاز متان، قابلیت هضم ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم در جدول

اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت پروتوزوآها و متانوزنها در قالب آزمایش فاکتوریل برای گاو شیری با ۱۲ تیمار و سه تکرار در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SAS (۲۸) رویه مدل خطی عمومی (GLM) تجزیه و تحلیل آماری شده و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی کرامر در سطح ۵٪ خطا استفاده شد.

## نتایج

اثرات اصلی و متقابل سه تایی منابع کاتیونی و DCAD بر روی غلظت نیتروژن آمونیاکی کل تولید شده و سطح زیر منحنی نیتروژن آمونیاکی در جدول (۳) نشان داده شده است. بر اساس نتایج بدست آمده تفاوت معنی‌داری در غلظت نیتروژن آمونیاکی بین منابع کاتیونی مختلف مشاهده نشد؛ ولی غلظت نیتروژن آمونیاکی کل پس از استخراج اثر زمان بین سطوح

(۴) نشان داده شده است. بر اساس نتایج، اثرات اصلی منابع پتاسیمی، منابع منیزیمی و DCAD بر روی درصد متان تولیدی معنی‌دار نبود. ولی اثرات متقابل این سه فاکتور درصد متان تولیدی را تحت تأثیر قرار داد به گونه‌ای که بیشترین متان تولیدی مربوط به تیمار حاوی اختلاف آنیون - کاتیون ۱۵۰ میلی‌اکی‌والان بوده که از منابع کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و اکسید منیزیم تأمین شده است. کمترین درصد متان در همین منابع هنگامی که DCAD از ۱۵۰+ به ۲۵۰+ میلی‌اکی‌والان افزایش یافت، مشاهده شد.

تجزیه‌پذیری ماده خشک تحت تأثیر تیمارهای مختلف آزمایشی قرار گرفت. به طور کلی در تیمارهای مختلف با افزایش سطح DCAD جیره قابلیت هضم ظاهری ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم به صورت

خطی افزایش یافته است. بیشترین قابلیت هضم ظاهری ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم مربوط به تیمار حاوی کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و کربنات منیزیم با سطح DCAD ۳۵۰+ میلی‌اکی‌والان می‌باشد. کمترین قابلیت هضم ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم مربوط به تیمار حاوی DCAD ۱۵۰+ میلی‌اکی‌والان تأمین شده از دو منبع کربنات پتاسیم و اکسید منیزیم می‌باشد. اثرات اصلی فاکتورهای آزمایشی اثر معنی‌دار آماری بر قابلیت هضم ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم داشتند؛ بطوریکه در بین منابع کاتیونی، منابع پتاسیم و به ویژه کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات به طور قابل توجهی قابلیت هضم ماده خشک را افزایش داده است.



اثر منبع کاتیونی و اختلاف آنیون - کاتیون جیره گاو شیری... ۸۱

جدول ۳: تأثیر سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره و منابع کاتیونی بر تولید کل نیتروژن آمونیاکی و سطح زیر منحنی نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم بر دسی لیتر)

پارامتر	تیمار				
	منبع پتاسیم				
	منبع منیزیم				
تعداد آنیون - کاتیون جیره	منبع منیزیم				
NH <sub>3</sub> کل <sup>۱</sup>	منبع پتاسیم				
سطح زیر منحنی NH <sub>3</sub>	منبع منیزیم				
۸/۸۸۲	۲۹/۰۱۶	۱۵۰	mc	کربنات پتاسیم سسکونی هیدرات	
۱۰/۰۵۶	۳۱/۱۹۳	۱۵۰	mo		
۹/۱۶۷	۲۹/۴۵۹	۲۵۰	mc		
۹/۰۲۳	۲۹/۲۹۵	۲۵۰	mo		
۹/۶۸۹	۳۱/۲۸۴	۳۵۰	mc		
۹/۶۱۰	۳۰/۴۱۵	۳۵۰	mo		
۱۰/۲۳۱	۳۲/۹۸۶	۱۵۰	mc		
۱۰/۵۷۳	۳۳/۳۲۰	۱۵۰	mo		
۹/۷۰۲	۳۱/۰۰۹	۲۵۰	mc		
۸/۹۵۶	۲۸/۷۱۱	۲۵۰	mo		کربنات پتاسیم
۹/۵۲۱	۳۰/۷۲۰	۳۵۰	mc		
۹/۳۶۶	۳۰/۱۱۲	۳۵۰	mo		
۰/۴۴۷	۱/۰۸۵			SEM	
	اثرات اصلی				
۹/۴۰۴	۳۰/۱۱۰	KCS		منبع پتاسیم	
۹/۷۲۵	۳۱/۱۴۳	KC			
۹/۵۳۲	۳۰/۷۴۶	MC			
۹/۵۹۷	۳۰/۵۰۸	MO		منبع منیزیم	
۹/۹۳۵	۳۱/۶۲۹ <sup>a</sup>	۱۵۰		DCAD	
۹/۲۱۲	۲۹/۶۱۹ <sup>b</sup>	۲۵۰			
۹/۳۴۷	۳۰/۲۳۳ <sup>b</sup>	۳۵۰			
	<i>P- value</i>				
۰/۲۲۰۱	۰/۱۰۰۵			منبع پتاسیم	
۰/۸۰۱۳	۰/۷۰۴۵			منبع منیزیم	
۰/۰۸۱۴	۰/۰۲۵۲			DCAD	
۰/۳۳۴۲	۰/۳۲۳۸			منبع پتاسیم × منبع منیزیم	
۰/۲۰۱۸	۰/۰۰۷۷			DCAD × منبع پتاسیم	
۰/۰۴۸۱	۰/۰۳۵۰			DCAD × منبع منیزیم	
۰/۸۲۹۹	۰/۶۹۶۵			منبع پتاسیم × منبع منیزیم × DCAD	

\* میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون بر اساس *p-value* دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $p < 0.05$ ). منابع: کربنات پتاسیم بدون آب (kc)، کربنات پتاسیم سسکونی هیدرات (kcs)، اکسید منیزیم (mo) و کربنات منیزیم (mc) - تغییرات قابلیت هضم ماده خشک در اثر فاکتورهای آزمایشی پس از استخراج اثر زمان با روش داده‌های تکرار در زمان.

جدول ۴: تأثیر سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره و منابع کاتیونی بر بر روی تولید گاز متان (درصد)، قابلیت هضم ظاهری ماده خشک (درصد) و سطح زیر منحنی قابلیت هضم

پارامتر			تیمار		
سطح زیر منحنی قابلیت هضم	قابلیت هضم کل <sup>۱</sup>	متان (CH <sub>4</sub> )	تعادل آنیون- کاتیون جیره	منبع منیزیم	منبع پتاسیم
۰/۳۵۱ <sup>ab</sup>	۰/۶۸۱ <sup>a</sup>	۱۱/۶۲۰ <sup>bc</sup>	۱۵۰	mc	کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات
۰/۳۴۲ <sup>ab</sup>	۰/۶۷۲ <sup>ab</sup>	۱۶/۳۳۱ <sup>a</sup>	۱۵۰	mo	
۰/۳۵۷ <sup>a</sup>	۰/۶۸۹ <sup>a</sup>	۱۳/۹۹۳ <sup>abc</sup>	۲۵۰	mc	
۰/۳۵۰ <sup>ab</sup>	۰/۶۸۴ <sup>a</sup>	۱۱/۲۳۱ <sup>c</sup>	۲۵۰	mo	
۰/۳۶۱ <sup>a</sup>	۰/۶۹۸ <sup>a</sup>	۱۳/۸۶۱ <sup>abc</sup>	۳۵۰	mc	
۰/۳۵۵ <sup>a</sup>	۰/۶۹۰ <sup>a</sup>	۱۵/۳۸۶ <sup>ab</sup>	۳۵۰	mo	
۰/۳۰۸ <sup>c</sup>	۰/۶۱۷ <sup>c</sup>	۱۴/۴۷۷ <sup>abc</sup>	۱۵۰	mc	
۰/۳۲۱ <sup>bc</sup>	۰/۶۳۷ <sup>bc</sup>	۱۴/۹۶۵ <sup>abc</sup>	۱۵۰	mo	
۰/۳۵۴ <sup>ab</sup>	۰/۶۸۷ <sup>a</sup>	۱۴/۵۷۶ <sup>abc</sup>	۲۵۰	mc	
۰/۳۳۹ <sup>abc</sup>	۰/۶۷۱ <sup>ab</sup>	۱۴/۹۳۱ <sup>abc</sup>	۲۵۰	mo	
۰/۳۴۷ <sup>ab</sup>	۰/۶۸۳ <sup>a</sup>	۱۳/۲۱۲ <sup>abc</sup>	۳۵۰	mc	کربنات پتاسیم
۰/۳۵۴ <sup>a</sup>	۰/۶۸۶ <sup>a</sup>	۱۳/۲۴۵ <sup>abc</sup>	۳۵۰	mo	
۰/۰۰۷	۰/۰۰۸	۰/۸۷۴			SEM
اثرات اصلی					
۰/۳۵۳ <sup>a</sup>	۰/۶۸۶ <sup>a</sup>	۱۳/۷۳۷	KCS		منبع پتاسیم
۰/۳۳۷ <sup>b</sup>	۰/۶۶۴ <sup>b</sup>	۱۴/۲۳۴	KC		
۰/۳۴۶	۰/۶۷۶	۱۳/۶۲۳	MC		
۰/۳۴۳	۰/۶۷۳	۱۴/۳۴۸	MO		منبع منیزیم
۰/۳۳۰ <sup>b</sup>	۰/۶۵۷ <sup>b</sup>	۱۴/۳۴۸	۱۵۰		
۰/۳۵۰ <sup>a</sup>	۰/۶۸۲ <sup>a</sup>	۱۳/۶۸۳	۲۵۰		DCAD
۰/۳۵۴ <sup>a</sup>	۰/۶۸۹ <sup>a</sup>	۱۳/۹۲۶	۳۵۰		
P- value					
۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۱	۰/۳۲۶۳			منبع پتاسیم
۰/۴۵۵۳	۰/۶۲۳۲	۰/۱۵۳۲			منبع منیزیم
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۵۵۴۱			DCAD
۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۱۳	۰/۳۹۲۱			منبع پتاسیم × منبع منیزیم
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۷۸			DCAD × منبع پتاسیم
۰/۰۰۴۶	۰/۰۰۰۱	۰/۰۱۰۴			منبع منیزیم × DCAD
۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۱۲	۰/۰۱۲۹			منبع پتاسیم × منبع منیزیم × DCAD

\* میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (p<0.05). منابع: کربنات پتاسیم بدون آب (KC)، کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات (KCS)، اکسید منیزیم (mo) و کربنات منیزیم (mc) - ۱ تغییرات قابلیت هضم در اثر فاکتورهای آزمایشی پس از استخراج اثر زمان با روش داده‌های تکرار دار در زمان.

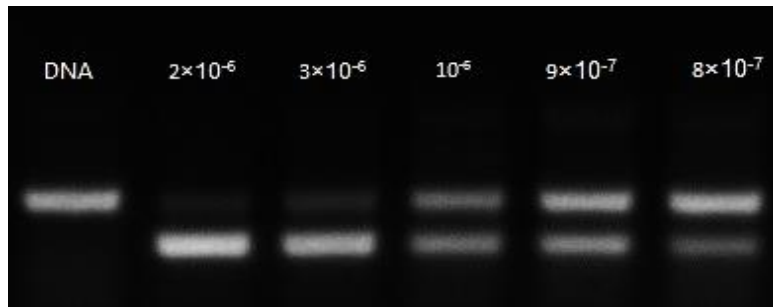
قابلیت هضم و سطح DCAD ۲۵۰+ و ۳۵۰+ میلی اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک بیشترین قابلیت هضم ماده خشک را به خود اختصاص دادند. البته بین سطوح DCAD ۲۵۰+ و ۳۵۰+ میلی‌اکی‌والان بر

اثرات اصلی DCAD نیز بر روی قابلیت هضم ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم به لحاظ آماری معنی‌دار بود (p<0.05)، به طوریکه سطح DCAD ۱۵۰+ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک کمترین

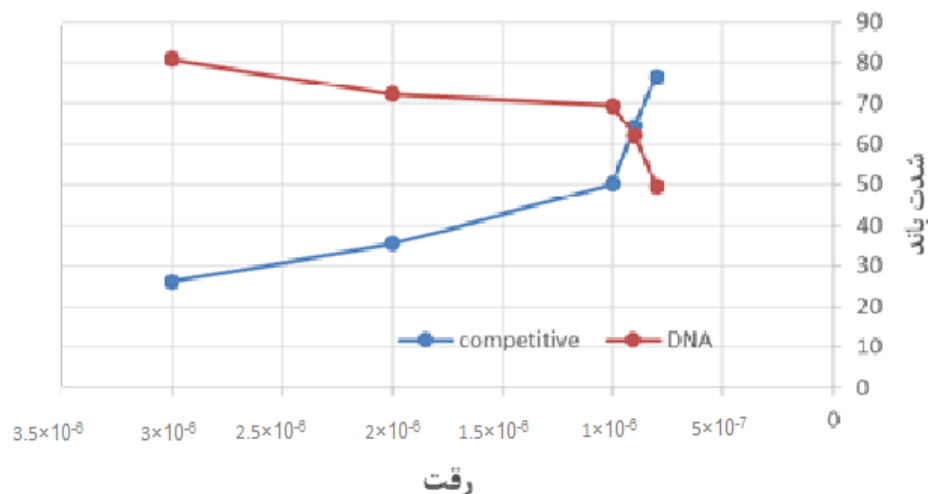
نقطه ای که باند رقیب و DNA مشابه همدیگر هستند، نشان دهنده شمار پروتوزوآ در این نمونه می‌باشند، در نهایت با استفاده از نرم‌افزار z Image این تصاویر کمی سازی شدند و نقطه تلاقی آن‌ها مشخص شد (شکل ۲).

کیلو گرم ماده خشک اختلاف معنادار آماری مشاهده نشد.

شکل (۱) واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت حاوی پروتوزوآ را نشان می‌دهد. همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود با کاهش شدت باند رقیب، شدت باند DNA افزایش می‌یابد.



شکل ۱- نمونه‌ای از واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت پروتوزوآی شکمبه



شکل ۲- نمودار داده‌های حاصل از نرم‌افزار z Image

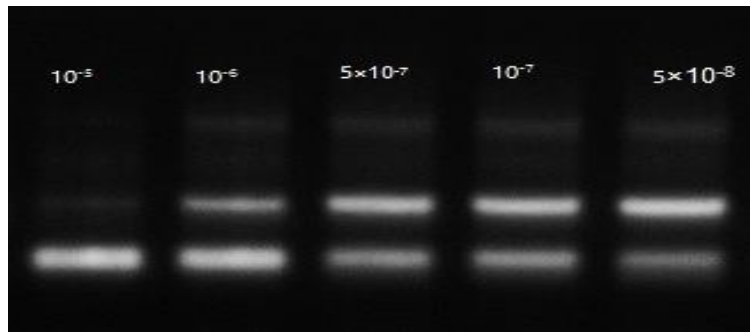
تمایل به معنی‌داری از خود نشان دادند ( $p < 0.09$ ). تیمارهای حاوی اکسید منیزیم شمار پروتوزوآی کمتری نسبت به تیمارهای حاوی کربنات منیزیم داشتند. اثرات اصلی منبع پتاسیم نیز تمایل به معنی‌داری از خود نشان دادند ( $p < 0.09$ ). به طوری که کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات نسبت به کربنات پتاسیم شمار پروتوزوآی کمتری را دارا بود.

نتایج بدست آمده از PCR رقابتی نشان داد (جدول ۵) که به طور کلی اثرات اصلی منبع منیزیم بر روی تعداد کپی پروتوزوآ تمایل به معنی‌داری نشان می‌دهد ( $p < 0.09$ ). کربنات منیزیم نسبت به اکسید منیزیم شمار پروتوزوآی بیشتری داشت. در زمان ۱۲ انکوباسیون نیز فقط اثرات اصلی منبع منیزیم تمایل به معنی‌داری از خود نشان دادند. به طوری که شمار پروتوزوآها در اکسید منیزیم نسبت به کربنات منیزیم کمتر بود. در زمان ۲۴ انکوباسیون اثرات متقابل فاکتورهای آزمایشی

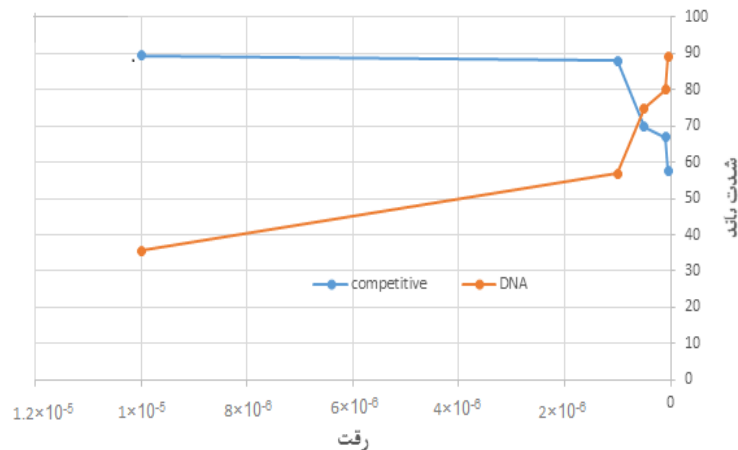
شکل (۳) واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت حاوی متانوژن را نشان می‌دهد.

۲۵۰ میلی اکی والان در کیلوگرم ماده خشک کمترین مقدار عددی تعداد آرک‌های متانوژن را به خود اختصاص داد. اثرات منبع پتاسیم تمایل زیادی به معنی‌داری از خود نشان دادند ( $p < 0.09$ ). به طوری که کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات نسبت به کربنات پتاسیم شمار متانوژن کمتری داشت. در زمان ۱۲ انکوباسیون اثرات سطح تعادل آنیون - کاتیون جیره تمایل به معنی‌داری نشان دادند. در این زمان شمار متانوژن‌ها در بین منابع پتاسیم اختلاف معنادار آماری داشتند. به طوری که کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات شمار متانوژن کمتری داشتند.

همانطور که در این شکل مشاهده می‌شود با کاهش شدت باند رقیب، شدت باند DNA افزایش می‌یابد. نقطه که باند رقیب و DNA مشابه همدیگر هستند، نشان دهنده شمار متانوژن در این نمونه می‌باشند، در نهایت با استفاده از نرم‌افزار Image J این تصاویر را کمی سازی شدند و نقطه تلاقی آن‌ها را نیز پیدا گردید (شکل ۴) همانطور که در جدول ۴-۱۰ نشان داده شده است، صرف نظر از زمان، اثرات متقابل فاکتورهای آزمایشی بر روی شمار جمعیت متانوژن‌های اختلاف معنادار آماری نداشتند. در بین اثرات اصلی اثر DCAD جیره اختلاف معنادار آماری نشان داد ( $p < 0.05$ ). به طوری که سطح DCAD، ۱۵۰ میلی‌اکی‌والان شمار متانوژن بیشتری نسبت دو سطح دیگر داشت و سطح



شکل ۳- نمونه‌ای از واکنش PCR رقابتی برای DNA استخراج شده از محیط کشت متانوژن‌های شکمبه



شکل ۵- نمودار داده‌های حاصل از نرم‌افزار Image J

اثر منبع کاتیونی و اختلاف آنیون - کاتیون جیره گاو شیری ... ۸۵

جدول ۵: تأثیر سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره و منابع کاتیونی بر جمعیت پروتوزوآها در زمان های ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون

تعداد پروتوزوآ در زمان		تیمار			
۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	تعادل آنیون- کاتیون جیره	منبع منیزیم	منبع پتاسیم	
۱/۷۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۰۷×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰	mc	کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات	
۱/۶۹×۱۰ <sup>۶</sup>	۳/۵۸×۱۰ <sup>۵</sup>	۱۵۰	mo		
۱/۵۳×۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۹۷×۱۰ <sup>۶</sup>	۲۵۰	mc		
۱/۲۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۵/۳۳×۱۰ <sup>۵</sup>	۲۵۰	mo		
۱/۴۷×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۳۹×۱۰ <sup>۶</sup>	۳۵۰	mc		
۱/۶۶×۱۰ <sup>۶</sup>	۶/۸۴×۱۰ <sup>۵</sup>	۳۵۰	mo		
۱/۶۸×۱۰ <sup>۶</sup>	۳/۱۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰	mc		
۱/۸۸×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۰۷×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰	mo		
۱/۶۸×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۰۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۲۵۰	mc		کربنات پتاسیم
۲/۰۴×۱۰ <sup>۶</sup>	۹/۳۸×۱۰ <sup>۵</sup>	۲۵۰	mo		
۲/۰۳×۱۰ <sup>۶</sup>	۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۳۵۰	mc		
۱/۴۵×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۴۳×۱۰ <sup>۶</sup>	۳۵۰	mo		
۲/۲۳×۱۰ <sup>۵</sup>	۸/۶۷×۱۰ <sup>۵</sup>			SEM	
اثرات اصلی					
۱/۵۴×۱۰ <sup>۶</sup> β	۱/۲×۱۰ <sup>۶</sup>	KCS		منبع پتاسیم	
۱/۷۹×۱۰ <sup>۶</sup> γ	۱/۴۳×۱۰ <sup>۶</sup>	KC			
۱/۶۸×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۷۶×۱۰ <sup>۶</sup> β	MC		منبع منیزیم	
۱/۶۵×۱۰ <sup>۶</sup>	۸/۷×۱۰ <sup>۵</sup> γ	MO			
۱/۷۴×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۴×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰		DCAD	
۱/۶۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۴۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۲۵۰			
۱/۶۵×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۱۳×۱۰ <sup>۶</sup>	۳۵۰			
P- value					
۰/۰۶۵۴	۰/۶۵۷۵			منبع پتاسیم	
۰/۸۲۶۲	۰/۰۸۸۵			منبع منیزیم	
۰/۷۲۷۵	۰/۸۷۰۷			DCAD	
۰/۸۸۵۶	۰/۵۱۳۳			منبع پتاسیم × منبع منیزیم	
۰/۴۰۱۶	۰/۲۰۳۹			منبع پتاسیم × DCAD	
۰/۶۴۴۵	۰/۵۶۸۲			منبع منیزیم × DCAD	
۰/۰۵۳۷	۰/۳۵۸۲			منبع پتاسیم × منبع منیزیم × DCAD	

\* علائم لاتین (β و γ) غیر مشابه تمایل به معنی داری را نشان می دهند (p<0.09).

جدول ۶: تأثیر سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره و منابع کاتیونی بر جمعیت متانوژن‌ها در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون

تعداد متانوژن‌ها در زمان		تیمار		
۲۴ ساعت	۱۲ ساعت	تعادل آنیون- کاتیون جیره	منبع منیزیم	منبع پتاسیم
۱/۴۱×۱۰ <sup>۶</sup>	۸/۰۴×۱۰ <sup>۵</sup>	۱۵۰	mc	کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات
۵/۴۳×۱۰ <sup>۵</sup>	۹/۳۶×۱۰ <sup>۵</sup>	۱۵۰	mo	
۲/۹۱×۱۰ <sup>۵</sup>	۶/۳۷×۱۰ <sup>۵</sup>	۲۵۰	mc	
۷/۵۰×۱۰ <sup>۵</sup>	۷/۰۱×۱۰ <sup>۴</sup>	۲۵۰	mo	
۵/۴۸×۱۰ <sup>۵</sup>	۹/۷۵×۱۰ <sup>۵</sup>	۳۵۰	mc	
۳/۶۵×۱۰ <sup>۵</sup>	۴/۳۰×۱۰ <sup>۵</sup>	۳۵۰	mo	
۷/۳۹×۱۰ <sup>۵</sup>	۱/۶۵×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰	mc	
۲/۱۳×۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۳۲×۱۰ <sup>۶</sup>	۱۵۰	mo	
۵/۶۳×۱۰ <sup>۵</sup>	۹/۷۲×۱۰ <sup>۵</sup>	۲۵۰	mc	کربنات پتاسیم
۵/۶۷×۱۰ <sup>۵</sup>	۸/۵۷×۱۰ <sup>۵</sup>	۲۵۰	mo	
۴/۹۱×۱۰ <sup>۵</sup>	۹/۶۷×۱۰ <sup>۵</sup>	۳۵۰	mc	
۵/۰۴×۱۰ <sup>۵</sup>	۸/۷۸×۱۰ <sup>۵</sup>	۳۵۰	mo	
۴/۶۸×۱۰ <sup>۵</sup>	۸/۷۸×۱۰ <sup>۵</sup>			SEM
اثرات اصلی				
۶/۵۲×۱۰ <sup>۵</sup>	۶/۴۲×۱۰ <sup>۵b</sup>	KCS		منبع پتاسیم
۸/۳۲×۱۰ <sup>۵</sup>	۱/۱۱×۱۰ <sup>۶a</sup>	KC		
۶/۷۴×۱۰ <sup>۵</sup>	۱/۰۰×۱۰ <sup>۶</sup>	MC		
۸/۰۹×۱۰ <sup>۵</sup>	۷/۴۹×۱۰ <sup>۵</sup>	MO		منبع منیزیم
۱/۲۱×۱۰ <sup>۶β</sup>	۱/۱۸×۱۰ <sup>۶β</sup>	۱۵۰		DCAD
۵/۴۳×۱۰ <sup>۵γ</sup>	۶/۳۴×۱۰ <sup>۵γ</sup>	۲۵۰		
۴/۷۷×۱۰ <sup>۵γ</sup>	۸/۱۳×۱۰ <sup>۵γ</sup>	۳۵۰		
P- value				
۰/۵۱۱۶	۰/۰۱۶۹			منبع پتاسیم
۰/۶۲۱۴	۰/۱۷۷۷			منبع منیزیم
۰/۰۷۱۱	۰/۰۶۲۵			DCAD
۰/۸۴۶۹	۰/۶۸۶۵			منبع پتاسیم × منبع منیزیم
۰/۷۷۴۵	۰/۶۳۳۴			DCAD × منبع پتاسیم
۰/۸۴۶۹	۰/۸۳۶۲			منبع منیزیم × DCAD
۰/۱۲۳۶	۰/۵۰۴۷			منبع پتاسیم × منبع منیزیم × DCAD

\* میانگین‌های با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. علایم لاتین (α و β) غیر مشابه تمایل به معنی‌داری را نشان می‌دهند (p<0.09). منابع: کربنات پتاسیم بدون آب (kc)، کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات (kcs)، اکسید منیزیم (mo) و کربنات منیزیم (mc).

## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس یافته‌های این تحقیق نوع منبع کاتیون مورد استفاده در جیره گاوهای شیری که اثر مستقیم بر تعادل آنیون - کاتیون جیره دارد؛ می‌تواند پارامترهای تخمیر

شکمه و اکوسیستم میکروبی شکمبه را تحت تأثیر قرار دهد. غلظت نیتروژن آمونیاکی تولیدی در شکمبه یکی از شاخص‌هایی است که برای مطالعه شرایط تخمیر شکمبه مورد بررسی قرار می‌گیرد. جیره مناسب

امروزه به دلیل افزایش روز افزون دمای کره زمین و جهت اهمیت کاهش اتلاف انرژی خوراک دام، اهمیت کنترل تولید متان در دستگاه گوارش نشخوارکنندگان بیش از پیش مطرح شده است. طی فرآیند تخمیر برخی از میکروارگانیسم‌ها تولید هیدروژن می‌کنند. غالب این تولیدکنندگان هیدروژن، پروتوزوآها هستند. در مورد ضرورت وجود پروتوزوآها در اکوسیستم شکمبه نظرات متفاوتی وجود دارد و بنابراین جهت کاهش تولید متان می‌توان از تعداد پروتوزوآها یا نسبت آنها به میکروارگانیسم‌هایی که هیدروژن تولید نمی‌کنند کاست. مسیرهای شیمیایی وجود دارد که از هیدروژن به عنوان پذیرنده الکترون استفاده می‌کنند و با مصرف دی اکسید کربن تولید متان می‌کنند (۶). تولید متان در دام ناشی از فرآیند متانوژنسیس و متابولیسم آرکی‌ها است (۲۵). بیشترین متان تولیدی مربوط به تیمار حاوی اختلاف آنیون - کاتیون ۱۵۰+ میلی‌اکی‌والان بوده که از منابع کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و اکسید منیزیم تأمین شده است. کمترین درصد متان در همین منابع هنگامی که DCAD از ۱۵۰+ به ۲۵۰+ میلی‌اکی‌والان افزایش مشاهده شد. همانطور که در بالا اشاره شد افزایش DCAD از طریق بهبود شرایط بافری شکمبه باعث شده که جمعیت پروتوزوآها تمایل به کاهش از خود نشان دهند و از آنجایی که پروتوزوآها به صورت همزیست به متانوژن‌ها می‌باشند، می‌توان اینگونه بیان نمود که کاهش پروتوزوآها، کاهش متانوژن‌ها را به دنبال داشته و با توجه به اینکه متانوژن‌ها تولیدکننده‌های اصلی متان در شکمبه هستند، با افزایش DCAD تولید متان کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش تولید متان باعث افزایش تولید استات و کاهش پروپیونات و افزایش چربی شیر می‌شود. هر چند که مرغای و همکاران (۲۵) گزارش کردند که جمعیت کل پروتوزوآی شکمبه بر تولید

جیره‌ای است که نیتروژن مورد نیاز برای حداکثر پروتئین میکروبی را فراهم ساخته و از ضایعات مربوط به آمونیاک اضافی جلوگیری کرده و پروتئین غیر قابل تجزیه کافی را فراهم سازد. نیتروژن آمونیاکی یکی از ترکیبات نیتروژن‌دار مورد مصرف میکروب‌های موجود در شکمبه به منظور سنتز پروتئین می‌باشد. نیتروژن آمونیاکی موجود در شکمبه از مواد نیتروژن‌دار موجود در جیره، اوره موجود در بزاق و اوره نفوذی از طریق دیواره شکمبه تولید می‌گردد (۲۴). از آنجایی که با افزایش سطح DCAD از ۱۵۰+ به ۲۵۰+ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش یافته می‌توان اینگونه بیان کرد که احتمالاً افزایش DCAD باعث افزایش شاخص اسیدیته شکمبه می‌شود. از آنجایی که تولید نیتروژن آمونیاکی به شدت تحت تأثیر تجزیه پروتئین خام جیره توسط میکروارگانیسم‌ها و تجزیه جمعیت میکروبی به دلیل بازیافت نیتروژن در شرایط نامساعد می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که این افزایش شاخص اسیدیته باعث ایجاد تعادل شرایط محیط کشت به نفع سنتز بیشتر پروتئین میکروبی شده که به دنبال آن تولید نیتروژن آمونیاکی کاهش می‌یابد. دووداروا و همکاران (۱۶) بیان کردند که کاهش تولید آمونیاک در شکمبه به لحاظ افزایش تولید پروتئین میکروبی یا کاهش تجزیه پروتئین خوراک در شکمبه مفید است. دوپل و هایرلی (۱۵) گزارش کردند که افزودن بی‌کربنات سدیم به جیره تأثیری بر سطوح نیتروژن آمونیاکی شکمبه ندارد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت. کاهش و یا حذف پروتوزوآ از شکمبه از چرخه نیتروژن بین باکتری‌ها و پروتوزوآی جلوگیری می‌کند که منجر به کاهش تجزیه پروتئین باکتریایی می‌شود. در نتیجه این امر جریان نیتروژن میکروبی از شکمبه افزایش و به تبع آن غلظت نیتروژن آمونیاکی کاهش می‌یابد (۴).

متان اهمیت کمتری دارد. هاریسون و همکاران (۱۹) گزارش کردند که کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات می‌تواند به عنوان یک بافر مؤثر برای تثبیت pH شکمبه، افزایش مصرف ماده خشک، افزایش تولید اسید چرب فرار و همچنین افزایش نسبت استات به پروپیونات استفاده می‌شود که با نتایج ما مطابقت داشت. ایوانیوک و اردمان (۲۱) بیان کردند که اگر چه DCAD نسبت استات به پروپیونات را تحت تأثیر قرار می‌دهد ولی بر روی درصد مولی پروپیونات اثر معنی‌داری ندارد. شهزاد و همکاران (۳۰) بیان کردند که افزایش سطح اختلاف آنیون - کاتیون جیره باعث حفظ الگوی تخمیر در جهت تولید متعادل استات و بوتیرات می‌شود که خود افزایش سنتز اسیدهای چرب با منشأ داخلی را که تا ۶۰ درصد چربی شیر از این راه تأمین می‌گردد، در پی دارد. پس ملاحظه می‌گردد که افزایش DCAD تأثیر مثبتی بر کاهش آلودگی‌های زیست محیطی مربوط به تولید متان که نکته مهمی در تغذیه عملی نوین می‌باشد، دارد.

مطالعات قبلی نشان داده که افزایش DCAD از طریق کربنات پتاسیم مصرف ماده خشک را به صورت خطی افزایش می‌دهد (۸). از آنجایی که بیشترین قابلیت هضم ظاهری ماده خشک و سطح زیر منحنی قابلیت هضم (نوسانات قابلیت هضم ماده خشک در زمان‌های مختلف) مربوط به تیمار حاوی کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و کربنات منیزیم با سطح DCAD +۳۵۰ میلی‌اکی‌والان می‌باشد، می‌توان نتیجه گرفت که اضافه نمودن کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات به جیره گاو شیری از طریق بهبود شرایط تخمیر شکمبه و تأمین پتاسیم برای جمعیت میکروبی می‌باشد، قابلیت هضم ماده خشک را افزایش داده است که با نتایج وست و همکاران (۳۲) که گزارش کردند کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات ظرفیت بافری و پاسخ تولیدی

بالاتری در مقایسه با بی‌کربنات پتاسیم و بی‌کربنات سدیم دارد مطابقت دارد. همچنین ایوانیوک و اردمان (۲۱) با افزایش DCAD افزایش قابلیت هضم ماده خشک را گزارش کردند. احتمالاً افزایش سطح تعادل آنیون - کاتیون جیره از طریق منبع کربنات پتاسیم باعث افزایش هضم سلولز شده و در نتیجه بهبود شرایط محیط کشت و در نتیجه بهبود جمعیت باکترهای سلولولولایتیک شده که به نوبه خود منجر به افزایش قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی و افزایش قابلیت هضم ماده خشک می‌شود. ایوانیوک و اردمان (۲۱) افزایش DCAD از ۱۳۰ به ۳۶۴ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی را از ۳۵/۷ درصد به ۴۴/۲ درصد افزایش می‌دهد. فانک و همکاران (۱۷) اثر افزودن پتاسیم به همراه لازالوسید را بر قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی بررسی کردند و به این نتیجه رسیدند که استفاده هم‌زمان از این دو باعث افزایش قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی می‌شود. مارتینز و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که با افزایش DCAD اسیدیته شکمبه افزایش یافته که خود منجر به افزایش هضم فیبر نامحلول در شوینده خنثی و بدنبال آن افزایش قابلیت هضم ماده خشک می‌شود که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت.

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که نوع منبع کاتیون جیره و سطوح مختلف تعادل آنیون - کاتیون جیره بر اکوسیستم میکروبی شکمبه مؤثر است. بطوریکه منابع کربنات پتاسیم سسکوئی هیدرات و کربنات منیزیم به همراه سطح تعادل آنیون - کاتیون جیره +۲۵۰ میلی‌اکی‌والان بر کیلوگرم ماده خشک از طریق تأثیر بر جمعیت پروتوزوآها و متانوژن‌های شکمبه باعث کاهش متان، کاهش نیتروژن آمونیاکی و افزایش



9. Ball, H. C., Holmes, R. K., Londraville, R. L., Thewissen, J. G., Duff, R. J. (2013). Leptin in whales: validation and measurement of mRNA expression by absolute quantitative real-time PCR. *PLoS one*, **8**: 54277.

10. Block, E. (1994). Manipulation of Dietary Cation-Anion Difference on Nutritionally Related Production Diseases, Productivity, and Metabolic Responses of Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, **77**: 1437-1450.

11. Blümmel, M., Makkar, H. P. S., Becker, K. (1997). In vitro gas production: a technique revisited. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **77**: 24-34.

12. Broderick, G. A., Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, **63**: 64-75.

13. Chan, P. S., West, J. W., Bernard, J. K., Fernandez, J. M. (2005). Effects of dietary cation-anion difference on intake, milk yield, and blood components of the early lactation cow. *Journal of Dairy Science*, **88**: 4384-4392.

14. Charbonneau, E., Pellerin, D., Oetzel, G. R. (2006). Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, **89**: 537-548.

15. Doepel, L., Hayirli, A. (2011). Exclusion of dietary sodium bicarbonate from a wheat-based diet: Effects on milk production and ruminal fermentation. *Journal of Dairy Science*, **94**: 370-375.

16. Dudareva, N., Pichersky, E., Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant Physiology*, **135**: 1893-1902.

17. Funk, M. A., Galyean, M. L., Ross, T. T. (1986). Potassium and lasalocid effects on performance and digestion in lambs. *Journal of Animal Science*, **63**: 685-691.

18. Goff, J. P., Horst, R. L. (1997). Effects of the Addition of Potassium or Sodium, but Not Calcium, to Parturition Rations on Milk Fever in Dairy Cows<sup>1</sup>. *Journal of Dairy Science*, **80**: 176-186.

19. Harrison, J., White, R., Kincaid, R., Block, E., Jenkins, T., St-Pierre, N. (2012). Effectiveness of potassium carbonate sesquihydrate to increase dietary cation-anion

قابلیت هضم ماده خشک می‌شود. بنابراین مکمل مناسبی در جیره گاو شیری می‌باشد.

## منابع

۱. دانش مسگران، م.، وکیلی، س. ع. ر.، طهماسبی، ع. م. (۱۳۹۰). هضم و سوخت و ساز در نشخوارکنندگان. انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

۲. رزاقی، ع. (۱۳۸۸). اثر اختلاف کاتیون - آنیون جیره در دوره خشکی و اوایل شیر دهی بر عملکرد و برخی فراسنجه‌های خونی گاو شیری. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا.

۳. صارمی، ب.، ناصریان، ع.، نصیری، م. ر.، محمدی، الف. (۱۳۸۷). تشخیص و شمارش باکتری‌های سلولولیتیک فیبروباکتر سوکسینوجنز و رومینوکوکوس فلاو فینیس شکمبه گوساله های تغذیه شده با سطوح مختلف مخمر با استفاده از تکنیک Quantitative-PCR. *مجله دانش کشاورزی*، سال ۱۸، شماره ۱، صفحات ۱۷۰-۱۶۱.

۴. طاهری نیا، م. ح.، چاجی، م.، محمدآبادی، ط.، ایلامی، م.، ساری، م. (۱۳۹۳). تأثیر استفاده از پور سیر در جیره گوسفند بر قابلیت هضم، تخمیر و جمعیت پروتوزوایی شکمبه. *نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران*، سال ۶، شماره ۴، صفحات ۳۲۴-۳۳۲.

۵. غیاثی، س. الف.، ولی زاده، ر.، ناصریان، ع. (۱۳۹۴). تأثیر تغذیه ای روغن سویای اکسید شده در تقابل با نقش آنتی اکسیدانی هسته انار بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای به روش آزمایشگاهی. *نشریه پژوهش‌های علوم دامی ایران*، سال ۷، شماره ۳، صفحات ۲۵۶-۲۴۴.

۶. نعمتی شیرزی، ف.، روزبهان، ی.، کریمی ترشیزی، م. الف.، رضائی، ج. (۱۳۹۱). بررسی اثر برخی گیاهان دارویی بر پارامترهای هضم شکمبه ای در شرایط آزمایشگاهی. *نشریه علوم دامی ایران*، سال ۴۳، شماره ۲، صفحات ۱۹۳-۲۰۶.

7. AOAC. (2015). Official Methods of Analysis. Vol. I. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.

8. Apper-Bossard, E., Faverdin, P., Meschy, F., Peyraud, J. L. (2010). Effects of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism and blood acid-base regulation in dairy cows receiving 2 contrasting levels of concentrate in diets. *Journal of Dairy Science*, **93**: 4196-4210.

27. Owens FN, Basalan M (2016) Ruminant Fermentation. In: Millen DD, De Beni Arrigoni M, Lauritano Pacheco RD (eds) Rumenology. Springer, Cham, pp 63–102
28. SAS Institute. (2009). SAS User's Guide. Version 9.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.
29. Sekhavati, M. H., Mesgaran, M. D., Nassiri, M. R., Mohammadabadi, T., Rezaii, F., Maleki, A. F. (2009). Development and use of quantitative competitive PCR assays for relative quantifying rumen anaerobic fungal populations in both in vitro and in vivo systems. *Mycological Research*, **113**: 1146-1153.
30. Shahzad, M. A., Sarwar, M. (2008). Influence of altering dietary cation anion difference on milk yield and its composition by early lactating Nili Ravi buffaloes in summer. *Livestock Science*, **113**: 133-143.
31. Welkie, D. G., Stevenson, D. M., Weimer, P. J. (2010) 2010. ARISA analysis of ruminal bacterial community dynamics in lactating dairy cows during the feeding cycle. *Anaerobe* **16**: 94-100.
32. West, J. W., Coppock, C. E., Nave, D. H., Labore, J. M., Greene, L. W., Odom, T. W. (1987). Effects of Potassium Carbonate and Sodium Bicarbonate on Rumen Function in Lactating Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*, **70**: 81-90.
33. Yu, Z., Morrison, M. (2004). Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*, **36**: 808-813.
34. Zentilin, L., Giacca, M. (2007). Competitive PCR for precise nucleic acid quantification. *Nature protocols*, **2**: 2092-2104
- difference in early lactation cows. *Journal of Dairy Science*, **95**: 3919-3925.
20. Hu, W., Murphy, M. R. (2004). Dietary cation-anion difference effects on performance and acid-base status of lactating dairy cows: A meta-analysis. *Journal of Dairy Science*, **87**: 2222-2229.
21. Iwaniuk, M. E., Erdman, R. A. (2015). Intake, milk production, ruminal, and feed efficiency responses to dietary cation-anion difference by lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **98**: 8973-8985.
22. Kato, K., Yamashita, R., Matoba, R., Monden, M., Noguchi, S., Takagi, T., Nakai, K. (2005). Cancer gene expression database (CGED): a database for gene expression profiling with accompanying clinical information of human cancer tissues. *Nucleic Acids Research*, **33**: 533-536.
23. Martins, C. M. M. R., Arcari, M. A., Welter, K. C., Gonçalves, J. L., Santos, M. V. (2016). Effect of dietary cation-anion difference on ruminal metabolism, total apparent digestibility, blood and renal acid-base regulation in lactating dairy cows. *Animal*, **10**: 64-74.
24. Mathieson, G. W., Milligan, L. P. (1971). Nitrogen metabolism in sheep. *British Journal of Nutrition* **25**: 351-366.
25. Morgavi, D. P., Forano, E., Martin, C., Newbold, C. J. (2010). Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal*, **4**: 1024-1036.
26. National Research Council. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle: Seventh Revised Edition, 2001. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/9825>.

## **Effect of cationic source and anion-cation difference of dairy cow ration in early lactation on ruminal digestibility, methane gas production and ruminal microbial population by competitive polymerase chain reaction method**

**Yaser Feizdar brabady<sup>1</sup>, seyyed Ehsan ghiasi, Mohammad Bagher montazer torbati<sup>2</sup>**

1-PhD student of Department of Animal Science, University of Birjand

2-Professor Assistant of Department of Animal Science, University of Birjand

Received: 07 April 2019

Accepted: 23 October 2019

---

### **Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of source and balance of dietary anion-cation (DCAD) of dairy cows on protozoa and methanogens populations, ammonia nitrogen concentration, methane gas and digestibility of dry matter *in vitro*. Competitive polymerase chain reaction (cPCR) techniques were used to count the protozoan and methanogens population. This design for dairy cow in early lactation with an average body weight of 580 kg, age 25 months and daily production of 35 kg was carried out in the form of a 2 × 2 × 3 factorial experiment. Effective factors included DCAD (+150 meq / kgDM, +250 and +350 meq / kgDM), potassium sources (potassium carbonate (KC) and Potassium carbonate sesquihydrate (KCS)) and magnesium sources (magnesium oxide (MO) and magnesium carbonate (MC)). The effect of experimental treatments on ammonia nitrogen concentration was not significant. In all treatments, DCAD increased cause reduced ammonia nitrogen concentration in the rumen. The effect of experimental treatments on gas production, dry matter digestibility, protozoan and methanogens population was significant. The results of this study showed that the treatment containing DCAD +250 meq / kgDM provided by Potassium carbonate sesquihydrate and magnesium carbonate is reduced the protozoa and methanogens population, production of methane and increasing the digestibility of dry matter. Considering that there was no significant difference between DCAD +250 and +350, it seems that the sources of Potassium carbonate sesquihydrate and magnesium carbonate plus the anion-cation balance level of +250 meq / kgDM through the rumen buffering conditions improve, improves the parameters of rumen fermentation. Therefore, these two sources are probably appropriate supplements in the dietary of dairy cows.

**Key words: Microbial population, digestibility, methane, ammonia nitrogen, competitive PCR**

---

\* Corresponding Author: seyyed Ehsan ghiasi

Address: Department of Animal Science, University of Birjand, Iran

Email: s.e.ghiasi@birjand.ac.ir