تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۸
صفحه‌های ۴۹۷-۴۸۷

بررسی تأثیر استفاده از چند مخلوط بافری در جیره بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی

سید مرتضی وقار سیدین[۱]، محسن مجتهدی[۲*]، محمدحسن فتحی نسری[۳]، سید احسان غیاثی[۲]
۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۲. استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
۳. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند، بیرجند، ایران.
تاریخ وصول مقاله: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۰۵

چکیده

هدف از این آزمایش، بررسی ظرفیت بافری چند مخلوط بافری و تأثیر آن‌ها بر فراسنجه‌های تخمیر و هضم شکمبه‌ای در شرایط برون‌تنی بود. به همین منظور پنج مخلوط بافری شامل: ۱) ترکیب حاوی ۱۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۱۵ درصد اکسیدمنیزیم + ۳۵ درصد کربنات‌منیزیم + ۳۵ درصد بنتونیت‌سدیم؛ ۲) ترکیب حاوی ۳۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسیدمنیزیم + ۱۵ درصد کربنات‌منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت‌سدیم؛ ۳) ترکیب حاوی ۲۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۴۰ درصد اکسیدمنیزیم + ۲۰ درصد کربنات‌منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت‌سدیم؛ ۴) ترکیب حاوی ۴۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۲۰ درصد اکسیدمنیزیم + ۲۰ درصد کربنات‌منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت‌سدیم؛ ۵) ترکیب حاوی ۱۶ درصد کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسیدمنیزیم + ۲۲ درصد کربنات‌منیزیم + ۵ درصد بنتونیت‌سدیم و ۲۲ درصد پتاسیم فسفات منوبازیک تهیه شد. ظرفیت بافری و شاخص ارزش بافری اندازه‌گیری شد. سپس تأثیر مخلوط‌های بافری بر پتانسیل تولید گاز، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی و ماده خشک ناپدیدشده در شرایط آزمایشگاهی (IVDMD) بررسی گردید. مقدار ظرفیت و شاخص ارزش بافری ترکیب ۲ بیش‌تر از سایر ترکیبات بافری بود (P<۰/۰۵). ترکیب بافری ۴ سبب افزایش تولید گاز شد (P<۰/۰۵). مقدار IVDMD در بین ترکیبات بافری یکسان بود و تنها ترکیب بافری ۴ و ۱ با یکدیگر اختلاف داشتند (P<۰/۰۵). استفاده از ترکیب بافری ۲ سبب افزایش pH محیط کشت شد (P<۰/۰۵). در کل نتایج این آزمایش نشان داد که استفاده از ترکیب بافری ۲ می‌تواند نقش مؤثری در جلوگیری از افت pH و به تبع آن کاهش اسیدوز داشته باشد.

کلیدواژه‌ها: اسیدوز، اسیدیته شکمبه، تخمیر برون‌تنی، ظرفیت بافری، قابلیت هضم، مخلوط بافری.

Buffering capacity of some buffer mixtures and the effect of their inclusion in the diet on *in vitro* ruminal fermentation parameters

Seyed Morteza Vaghar Seyedin[1], Mohsen Mojtahedi[2*], Mohammad Hasan Fathi Nasri[3], Seyed Ehsan Ghiasi[2]
1. Ph.D. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
3. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran.
Received: March 13, 2019 Accepted: July 27, 2019

Abstract

This study aimed to evaluate the buffering capacity of some buffer mixtures and the effect of their inclusion in the diet on *in vitro* ruminal fermentation parameters. For this purpose, five buffer mixtures were prepared as: 1) containing 15% sodium bicarbonate + 15% magnesium oxide + 35% magnesium carbonate + 35% sodium bentonite; 2) containing 35% sodium bicarbonate + 35% magnesium oxide + 15% magnesium carbonate + 15% sodium bentonite; 3) containing 20% sodium bicarbonate + 40% magnesium oxide + 20% magnesium carbonate + 20% sodium bentonite; 4) containing 40% sodium bicarbonate + 20% magnesium oxide + 20% magnesium carbonate + 20% sodium bentonite; and 5) containing 16% sodium carbonate + 35% magnesium oxide +22% magnesium carbonate + 5% sodium bentonite and 22% monobasic potassium phosphate. Buffering capacity and buffer value index were measured. Then the effect of buffer mixtures on gas production potential, pH, ammonia nitrogen concentration and *in vitro* dry matter disappearance (IVDMD) was investigated. Buffering capacity and buffer value index of buffer mixture 2 was higher than other buffer compounds (P<0.05). Buffer mixture 4 increased gas production (P<0.05). IVDMD was the same between the buffer mixtures and only buffer mixture 4 and 1 were different (P<0.05). The use of buffer mixture 2 increased the pH of the batch culture (P<0.05). Overall, the results of this experiment showed that the use of buffer mixture 2 could have an effective role in preventing pH drop and consequently reducing acidosis.

Keywords: Acidosis, buffering capacity, buffer mixture, digestibility, *In vitro* fermentation, Rumen pH.

* نویسنده مسئول Email: mojtahedi@birjand.ac.ir

مقدمه

میلیون‌ها سال پیش نشخوارکنندگان برای هضم و متابولیسم جیره‌های غالباً علوفه‌ای تکامل یافتند [۸]، بنابراین، تغذیه گاوهای شیری با جیره‌های حاوی مقادیر زیاد کنسانتره (به‌همراه مقدار محدودی از فیبر 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 فیبر، کاهش چربی شیر، لنگش و آبسه کبدی می‌شود و حتی مرگ حیوان را به‌دنبال دارد [۵ و ۲۰]. بافرها، آنتی‌بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها به‌طور گسترده‌ای در جیره‌های حاوی مواد متراکم بالا به‌منظور پیش‌گیری از اثرات زیان‌بار اسیدیته زیاد و بهبود سلامت دام از طریق پایداری pH شکمبه استفاده می‌شوند [۲۰].

بافر از یک اسید ضعیف و نمک آن یا یک باز ضعیف و نمک آن ساخته می‌شود، که به ثبات و مقاومت شکمبه در برابر تغییر ناگهانی pH حاصل از تغذیه جیره‌های حاوی غلات زیاد، علوفه کم یا علوفه خیلی خردشده و سیلاژ کمک می‌کند [۹]. بی‌کربنات‌سدیم، سزکویی‌کربنات‌سدیم، کربنات‌منیزیم، اکسید منیزیم و بنتونیت‌سدیم افزودنی‌های رایج در تغذیه دام هستند. استفاده از بافر می‌تواند سبب افزایش نسبت استات به پروپیونات شود و بهبود هضم فیبر را به‌همراه داشته باشد که به‌تبع آن مصرف خوراک افزایش و متعاقباً تولید شیر و درصد چربی شیر نیز افزایش می‌یابد [۲۲]. دو سازوکار برای عمل بافرها در شکمبه بیان شده است که عبارتند از خنثی‌کردن اسید و ثبات pH شکمبه و افزایش نرخ عبور محتویات مایع شکمبه [۶ و ۹]. به‌طورکلی، بافرها نه‌تنها سبب حفظ پایداری شکمبه می‌شوند بلکه تولید حیوان را نیز افزایش می‌دهند [۲۱].

افزودن برخی مواد قلیایی‌کننده مانند اکسید منیزیم (که به اشتباه بافر نامیده می‌شوند) به مایع شکمبه، در زمان‌های مختلف انکوباسیون سبب افزایش pH و جذب یون هیدروژن می‌شود. درحالی‌که بی‌کربنات سدیم در زمان‌های آغاز انکوباسیون قدرت خنثی‌کنندگی بالایی از خود نشان داده ولی به‌مرور زمان این ویژگی را از دست می‌دهد [۱۱ و ۲۴]. هم‌چنین خاصیت بافری‌کردن مایع شکمبه توسط بنتونیت سدیم با افزایش زمان انکوباسیون بهبود می‌یابد و می‌تواند سبب تعدیل pH محیط کشت شود [۱۸ و ۲۴]. به‌علاوه مشخص شده است که مکمل‌کردن کربنات منیزیم و بنتونیت سدیم در شرایط برون‌تنی سبب افزایش حجم گاز تولیدی و استفاده از اکسید منیزیم کاهش تولید گاز را به‌همراه دارد [۲۴ و ۲۵]. در شرایط درون‌تنی نیز اکسید منیزیم در مقایسه با بی‌کربنات سدیم سبب جلوگیری از کاهش مصرف خوراک در گاوهای مبتلا به اسیدوز مزمن شده است [۱].

برخی پژوهش‌گران تأثیر ترکیب بافر و قلیایی‌کننده‌ها را بررسی و استفاده از مخلوط آن‌ها را در جیره پیشنهاد کرده‌اند [۱۰ و ۱۲]. در آزمایشی، ۳۵ نوع ماده معدنی به‌عنوان بافر مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد اکسیدها و هیدروکسیدها به‌تنهایی و در ترکیب، بافرهای ضعیفی هستند، چرا که سبب تغییرپذیری شدید pH بلافاصله پس از افزودن به مایع شکمبه می‌شوند. از طرفی گزارش شده که سدیم و بافرهای حاوی سدیم بهترین نوع بافرها هستند [۱۰]. هم‌چنین، گزارش‌های قبلی نشان می‌دهد که مقدار استفاده از بی‌کربنات سدیم در مخلوط‌های بافری با مقدار pH و ظرفیت بافری رابطه مستقیم دارد [۱۱]. از طرف دیگر، ترکیب سزکویی‌کربنات‌سدیم و بی‌کربنات‌سدیم با نسبت یک به یک سبب افزایش pH در شرایط آزمایشگاهی و افزایش حجم اسید هیدروکلریک مصرفی به‌روش تیتراسیون در مقایسه با بافرهایی از قبیل اکسید منیزیم، بی‌کربنات سدیم و بنتونیت سدیم به‌تنهایی می‌شود [۱۶].

در ایران تعداد محدودی از بافرها که متداول‌ترین آن‌ها بی‌کربنات سدیم است، استفاده می‌شود که این موضوع سبب افزایش قیمت این بافر شده است. شاید بتوان از بافرهای ترکیبی با کارایی همسان اما ارزان‌تر در تغذیه دام بهره برد. برای این منظور باید اطلاعات مقایسه‌ای از ویژگی‌های رفتاری مانند مدت زمان اثربخشی، ظرفیت و شاخص ارزش بافری در نسبت‌های مختلف بافرها و قلیاکننده‌ها وجود داشته باشد و اثرات هم‌افزایی یا هم‌ستیزی آن‌ها بر فراسنجه‌های تخمیری و هضم شکمبه مورد ارزیابی قرار گیرد. بنابراین این آزمایش به‌منظور تعیین ظرفیت و شاخص ارزش بافری چند مخلوط بافری و بررسی اثر آن‌ها بر فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های معدنی کربنات‌منیزیم، اکسید منیزیم، بنتونیت‌سدیم از معادن خراسان جنوبی و یک نمونه بی‌کربنات‌سدیم از منابع تجاری موجود (شرکت سهند تبریز- ایران) تهیه شد که قیمت هر یک از نمونه‌ها در زمان شروع آزمایش به‌ترتیب ۳۵۰۰، ۱۱۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۵۲۰۰۰ ریال به‌ازای هر کیلوگرم بود. به‌منظور یکنواختی کامل نمونه‌ها توسط آسیاب (**مدل** MF10 B **ساخت آلمان**) پودر و با استفاده از الک با مش ۱۸ (با قطر منافذ یک میلی‌متر) غربال شدند. ازآنجایی‌که اکسیدها و هیدروکسیدها به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، بافرهای ضعیفی هستند و بافرهای حاوی سدیم به‌عنوان بهترین نوع بافر شناسایی شده‌اند، مخلوطی از بنتونیت‌سدیم، فسفات پتاسیم منو بازیک، کربنات‌منیزیم، اکسید منیزیم و کربنات‌سدیم با نسبت‌های ۱۶:۳۵:۲۲:۲۲:۵ به‌عنوان مخلوط بافری ایده‌آل معرفی شده است [۱۰]، که در این آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین ۴ مخلوط بافری براساس مقادیر توصیه‌شده در مقالات [۷ و ۲۴] و هم‌چنین مقادیر کاربردی مورد استفاده در کارخانه‌های خوراک دام تهیه شد (جدول ۱).

در بخش اول آزمایش مقدار pH، ظرفیت بافری و شاخص ارزش بافری مخلوط‌های بافری تعیین شد (۳ تکرار برای هر فراسنجه). برای اندازه‌گیری pH، مقدار ۸ گرم از هر مخلوط بافری، در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر در دمای محیط اضافه گردید و به‌مدت ۵ دقیقه مخلوط شد تا یک سوسپانسیون یکنواخت تشکیل گردد. سپس، pH توسط pHمتر (Metrohm 744, Switzerland) اندازه‌گیری شد.

به‌منظور اندازه‌گیری ظرفیت بافری، نیم گرم از هر مخلوط بافری (براساس ماده خشک) در ۳۰ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر اضافه و توسط مگنت به‌آرامی مخلوط شد.

جدول ۱. ترکیب مخلوط‌های بافری مورد استفاده در این آزمایش

ترکیب بافری	بی‌کربنات سدیم (درصد)	اکسید منیزیم (درصد)	کربنات منیزیم (درصد)	بنتونیت سدیم (درصد)	کربنات سدیم (درصد)	پتاسیم فسفات منوبازیک (درصد)
۱	۱۵	۱۵	۳۵	۳۵	-	-
۲	۳۵	۳۵	۱۵	۱۵	-	-
۳	۲۰	۴۰	۲۰	۲۰	-	-
۴	۴۰	۲۰	۲۰	۲۰	-	-
۵	-	۳۵	۲۲	۵	۱۶	۲۲

سپس، تیتراسیون توسط اسید هیدروکلریک و هیدروکسید سدیم یک نرمال تا رسیدن به pHهای پنج و هفت انجام شد. ظرفیت بافری (BC) هر نمونه براساس مقدار اسید و باز مصرفی به‌کمک رابطه ۱ محاسبه شد [۲۳].

رابطه ۱)
$$BC = \frac{(\text{ml of 1 N HCl}) + (\text{ml of 1 N NaOH}) \times 10^3}{30}$$

شاخص ارزش بافری برای ارزیابی اثرات بافرها در حالت اسید- باز شکمبه به‌کار می‌رود و وابستگی مستقیم با ظرفیت بافری دارد. شاخص ارزش بافری به‌کمک رابطه ۲ محاسبه شد [۲۳].

رابطه ۲)
$$BVI = 100 + (10 \times ((((\text{antilog}_{10}(-STPH)) - (\text{antilog}_{10}(-SAPH))) / (\text{antilog}_{10}(-STPH)) + ((SABC - STBC / STBC))$$

که در این رابطه، BVI، شاخص ارزش بافر؛ STPH، pH استاندارد شش؛ SAPH، اسیدیته اولیه محلول نمونه؛ STBC، ظرفیت بافری استاندارد ۵۰ میلی‌اکی‌والان در لیتر و SABC، ظرفیت بافری محلول نمونه است. لازم به‌ذکر است که استانداردهای مذکور از بررسی میانگین داده‌های چند مطالعه در زمینه pH مایع شکمبه و ظرفیت بافری مایع شکمبه حاصل شده‌اند. به‌عبارتی pH و ظرفیت بافری مایع شکمبه در شرایط استاندارد به‌ترتیب برابر شش و ۵۰ میلی‌اکی‌والان است.

در بخش دوم آزمایش تأثیر مخلوط‌های بافری بر شاخص‌هایی از قبیل پتانسیل تولید گاز، نرخ تولید گاز، pH مایع شکمبه، غلظت نیتروژن آمونیاکی و ماده خشک ناپدیدشده با روش کشت ثابت (آزمون تولید گاز) بررسی شد. برای اندازه‌گیری تولید گاز در شرایط آزمایشگاهی، هر یک از مخلوط‌های بافری به میزان دو درصد ماده خشک به جیره پایه (شامل ۷۰ درصد کنسانتره و ۳۰ درصد علوفه) اضافه شد (جدول ۲).

جدول ۲. اجزا و ترکیب شیمیایی جیره پایه (درصد ماده خشک)

مواد خوراکی	مقدار (درصد)
سیلاژ ذرت	۲۰
کاه گندم	۱۰
ذرت آسیاب شده	۳۲
جو آسیاب شده	۲۰
کنجاله سویا	۱۱/۲
سبوس گندم	۶/۲
نمک	۰/۲
مکمل- ویتامین	۰/۴
ترکیب شیمیایی جیره	
چربی خام	۲/۹۹
پروتئین خام	۱۴/۳۲
خاکستر	۷/۸
فیبر نامحلول در شوینده خنثی (NDF)	۲۷/۱۲
فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (ADF)	۱۳/۴۸
کربوهیدرات‌های غیر فیبری (NFC)	۴۷/۷۶

مایع شکمبه از دو رأس گاو فیستولاگذاری‌شده قبل از خوراک‌دهی صبح گرفته شد و توسط ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید. مقدار ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک جیره (با اندازه ذرات یک میلی‌متر) حاوی مخلوط بافری در شیشه‌های ۱۲۰ میلی‌لیتری قرار گرفت و ۵۰ میلی‌لیتر مخلوط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (به نسبت یک به دو) تحت شرایط بی‌هوازی، به آن اضافه شد. سپس شیشه‌ها در بن‌ماری شیکردار ۱۲۰ لیتری در دمای ۳۸/۶ درجه سانتی‌گراد تحت انکوباسیون قرار گرفتند و تولید گاز در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت با استفاده از فشارسنج (CPG 2400, mensor) قرائت و به معادل حجمی در شرایط فشار و دمای استاندارد (۱ اتمسفر و دمای صفر درجه سانتی‌گراد) تبدیل شد [۲]. انکوباسیون در دو نوبت با نه تکرار برای هر گروه

آزمایشی در هر نوبت انجام شد. در هر نوبت، جهت تصحیح گاز تولیدی سه شیشه بلنک نیز مورد انکوباسیون قرار گرفت. تعیین نرخ تولید گاز (c) و پتانسیل تولید گاز (b) با استفاده از رابطه ۳ انجام شد [۱۹].

رابطه ۳) $P= b (1-e^{-ct})$

که در این رابطه، P، تولید گاز در زمان t؛ b، تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)؛ c، نرخ ثابت تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت) و t، زمان انکوباسیون بود.

در شرایط برون‌تنی پس از گذشت ۸ ساعت از آغاز انکوباسیون تخمیر و تولید محصولات به حداکثر می‌رسد و تا زمان ۲۴ ساعت پس از آغاز انکوباسیون نیز ادامه می‌یابد، به‌همین منظور دو زمان ۸ و ۲۴ ساعت جهت اندازه‌گیری pH و ماده خشک ناپدیدشده در شرایط برون‌تنی (In vitro dry mater disappearance) انتخاب شدند. مقدار pH محتویات تخمیری هر ویال توسط pH متر دیجیتال، اندازه‌گیری شد. به‌منظور تعیین ماده خشک ناپدیدشده در شرایط برون‌تنی ابتدا نمونه‌ها با صافی با منافذ ۴۲ میکرومتر فیلتر شدند و مواد باقی‌مانده در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در داخل آون قرار گرفتند و طبق رابطه ۴ محاسبه شد [۱۳].

رابطه ۴) $IVDMD = [A-(B-C)/A] \times 100$

در این رابطه IVDMD، ماده خشک ناپدیدشده؛ A، وزن ماده خشک اولیه؛ B، وزن بعد از انکوباسیون و C، وزن ظرف خالی فاقد رطوبت بود (واحدها برحسب گرم ماده خشک). غلظت نیتروژن آمونیاکی با استفاده از روش فنول هیپوکلریت اندازه‌گیری شد [۴]. تجزیه آماری داده‌های تولید گاز طبق رویه NLIN و برای سایر داده‌ها از رویه GLM نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۴) در قالب طرح کاملاً تصادفی (رابطه ۵) استفاده شد و میانگین‌ها توسط آزمون توکی- کرامر در سطح پنج درصد خطا مقایسه شدند.

رابطه ۵) $Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$

در این رابطه، Y_{ij}، متغیر وابسته؛ μ، میانگین کل؛ T_i، اثر گروه آزمایشی و ε_{ij}، اثر خطای آزمایش می‌باشد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به pH، ظرفیت بافری و شاخص ارزش بافری محلول‌های بافری در (جدول ۳) ارائه شده است. بالاترین مقدار pH مربوط به ترکیب بافری ۵ و پایین‌ترین مقدار را مربوط به ترکیب ۴ بود (P<۰/۰۵). ظرفیت بافری و شاخص ارزش بافری بین مخلوط‌های بافری مختلف، متفاوت بود؛ به‌طوری‌که بالاترین ظرفیت بافری مربوط به ترکیب ۲ و کم‌ترین مقدار این فراسنجه در ترکیب ۱ مشاهده شد. ظرفیت بافری ترکیبات بافری ۲، ۳ و ۴ از ترکیب ۵ بیش‌تر بود (P<۰/۰۵). بیش‌ترین و کم‌ترین شاخص ارزش بافری به‌ترتیب مربوط به ترکیب ۲ و ۱ بود.

پژوهش جامعی در زمینه بررسی اثرات ترکیبات بافری بر ظرفیت و شاخص ارزش بافری در دسترس نیست. ظرفیت بافری بیانگر میزان توانایی یک بافر برای مقاومت در برابر تغییرات pH است و ظرفیت بافری با افزایش غلظت آن در محیط افزایش می‌یابد. هرچه pH بافر به pka نزدیک‌تر باشد توانایی بافر بیش‌تر است یا به اصطلاح ظرفیت بافری بیش‌تری دارد [۲۳]. با توجه به این‌که بنتونیت سدیم و کربنات‌منیزیم از ظرفیت و شاخص ارزش بافری بسیار کم‌تری در مقایسه با بی‌کربنات سدیم و اکسید منیزیم برخوردار هستند [۲۴]، احتمالاً هنگامی‌که در یک ترکیب بافری قرار می‌گیرند نیز سبب کاهش این فراسنجه‌ها می‌گردند و این مسأله در ترکیب بافری ۱ که بیش‌ترین مقدار بنتونیت‌سدیم و کربنات‌منیزیم را دارا بود به‌خوبی مشهود است.

جدول ۳. مقایسه اسیدیته، ظرفیت بافری و شاخص ارزش بافری بین نمونه‌های مورد آزمایش

ترکیب بافری	pH	ظرفیت بافری (میلی‌اکی‌والان در لیتر)	شاخص ارزش بافری
۱	۱۰/۵۹^{c}	۴۰/۵۶^{e}	۱۰۸/۱۱^{e}
۲	۱۰/۸۳^{b}	۱۵۳/۸۹^{a}	۱۳۰/۷۸^{a}
۳	۱۰/۸۸^{b}	۱۴۳/۳۳^{b}	۱۲۸/۶۷^{b}
۴	۱۰/۳۹^{d}	۱۳۱/۰۰^{c}	۱۲۶/۲۰^{c}
۵	۱۱/۰۳^{a}	۷۱/۷۸^{d}	۱۱۴/۳۶^{d}
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
SEM	۰/۰۰۹	۱/۱۳۲	۰/۲۲۵

ترکیب بافری ۱ (۱۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۱۵ درصد اکسید منیزیم + ۳۵ درصد کربنات منیزیم + ۳۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۲ (۳۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۳ (۲۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۴۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۴ (۴۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۲۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات‌منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت‌سدیم)، ترکیب بافری ۵ یا هرود (۱۶ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۲۲ درصد کربنات‌منیزیم + ۵ درصد بنتونیت‌سدیم و ۲۲ درصد منوبازیک پتاسیم فسفات) و ترکیب بافری ۶ (فاقد بافر).

a-d: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در تأیید نتایج حاضر مشخص شده است که بی‌کربنات سدیم و اکسیدمنیزیم به نسبت‌های دو به یک و یک به یک می‌توانند ظرفیت بافری بالاتری را در مقایسه با ترکیب بی‌کربنات سدیم و کربنات‌منیزیم به نسبت دو به یک از خود نشان دهند [۱۰ و ۱۲].

با بررسی آزمایشگاهی ظرفیت بافری و ارزش اسیدزایی جیره‌های حاوی مقادیر مختلف بافرها گزارش شده که ترکیب‌های بافری که حاوی بیش‌ترین مقدار بی‌کربنات‌سدیم باشند بالاترین میزان pH و ظرفیت بافری را از خود نشان می‌دهند [۱۱]. در مطالعه حاضر، ترکیبات بافری حاوی مقدار بیش‌تری از بی‌کربنات‌سدیم، ظرفیت بافری بالاتری را نشان دادند. هم‌چنین ترکیب بافری ۲ و ۳ در مقایسه با ترکیب ۵ (بافر هرود)، به‌دلیل توانایی بالاتر در مصرف اسید، ظرفیت بافری بیش‌تری داشتند. می‌توان گفت ترکیب‌های بافری که ثابت تفکیک بالاتری دارند بیش‌تر به‌عنوان عوامل قلیایی‌کننده در pH مایع شکمبه عمل می‌کنند و در حقیقت سبب افزایش مقاومت به تغییرپذیری pH خواهند شد [۲۴].

نتایج مربوط به آزمایش تولید گاز در (جدول ۴) ارائه شده است. پتانسیل تولید گاز بین ترکیبات بافری متفاوت و بیش‌ترین میزان آن مربوط به ترکیب ۴ بود (P<۰/۰۵). نرخ تولید گاز با افزودن ترکیبات بافری ۱، ۲، ۳ و ۵ در مقایسه با ترکیب بافری ۶ (ترکیب فاقد بافر) به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). در بین ترکیبات بافری مورد استفاده، ترکیب بافری ۴ سبب کاهش معنی‌دار نرخ تولید گاز شد (P<۰/۰۵).

مشخص شده است که افزودن اکسید منیزیم سبب کاهش پتانسیل و نرخ تولید گاز می‌گردد [۲۵ و ۲۴] و این مسأله در ترکیبات بافری حاوی بیش‌ترین مقدار اکسید منیزیم (ترکیب بافری ۲ با ۳۵ درصد و ترکیب بافری ۳ با ۴۰ درصد اکسید منیزیم) مشهود است. علاوه بر این، در مطالعات مختلف استفاده از بی‌کربنات‌سدیم سبب افزایش

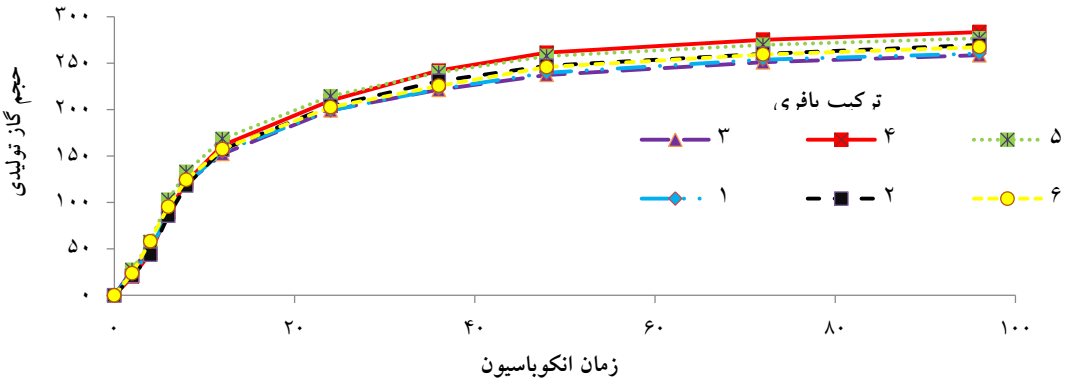
تولید گاز در شرایط برون‌تنی شده است [۲۴ و ۱۷]. احتمالاً ترکیب بافری ۴ به‌دلیل داشتن بیش‌ترین مقدار بی‌کربنات‌سدیم نسبت به سایر ترکیبات بافری سبب افزایش تولید گاز شده است. مکانیسم پیشنهادی در افزایش تولید گاز، ممکن است افزایش تعداد میکروب‌های شکمبه با افزودن این ماده باشد، زیرا مشخص شده است افزودن بی‌کربنات‌سدیم با افزایش pH مایع شکمبه سبب افزایش رشد و زنده‌مانی جمعیت‌های میکروبی‌شده و شمار کل باکتری‌های شکمبه، باکتری‌های سلولولایتیک و آمیلولایتیک را در بوفالو افزایش داده است [۱۵].

جدول ۴. تأثیر گنجاندن ترکیبات بافری مختلف در جیره بر فراسنجه‌های تولید گاز پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون

ترکیب بافری	پتانسیل تولید گاز (b) (میلی‌لیتر بر گرم ماده خشک)	نرخ تولید گاز (c) (میلی‌لیتر بر ساعت)
۱	۲۵۱/۵^{d}	۰/۰۶۳^{c}
۲	۲۵۳/۲^{d}	۰/۰۶۱^{c}
۳	۲۵۶/۲^{c}	۰/۰۶۴^{b}
۴	۲۶۶/۸^{a}	۰/۰۵۶^{e}
۵	۲۶۲/۳^{b}	۰/۰۶۶^{a}
۶	۲۵۲/۳^{d}	۰/۰۵۸^{d}
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱
SEM	۴/۵۵۱	۰/۰۰۱

ترکیب بافری ۱ (۱۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۱۵ درصد اکسید منیزیم + ۳۵ درصد کربنات منیزیم + ۳۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۲ (۳۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت‌سدیم)، ترکیب بافری ۳ (۲۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۴۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت‌سدیم)، ترکیب بافری ۴ (۴۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۲۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۵ یا هرود (۱۶ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۲۲ درصد کربنات منیزیم + ۵ درصد بنتونیت‌سدیم و ۲۲ درصد منوبازیک پتاسیم فسفات) و ترکیب بافری ۶ (فاقد بافر).

a-d: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).



شکل ۱. حجم گاز تولیدی گروه‌های آزمایشی در طول ۹۶ ساعت انکوباسیون

ترکیب بافری ۱ (۱۵ درصد بی‌کربنات سدیم + ۱۵ درصد اکسید منیزیم + ۳۵ درصد کربنات منیزیم + ۳۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۲ (۳۵ درصد بی‌کربنات سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۳ (۲۰ درصد بی‌کربنات سدیم + ۴۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۴ (۴۰ درصد بی‌کربنات سدیم + ۲۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۵ یا هرود (۱۶ درصد بی‌کربنات سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۲۲ درصدکربنات منیزیم + ۵ درصد بنتونیت سدیم و ۲۲ درصد منوبازیک پتاسیم فسفات) و ترکیب بافری ۶ (فاقد بافر).

طبق (جدول ۵)، بالاترین مقدار pH محیط کشت مایع شکمبه در زمان‌های هشت و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون مربوط به ترکیب بافری ۲ و کم‌ترین مقدار pH مربوط به ترکیب بافری ۶ (ترکیب فاقد بافر) بود (P<۰/۰۵). نتایج به‌دست‌آمده از این بخش از آزمایش با نتایج به‌دست‌آمده از ظرفیت بافری هم‌خوانی داشت. ترکیب بافری ۲ بیش‌ترین ظرفیت بافری را داشت که طی ۲۴ ساعت انکوباسیون در مقایسه با دیگر ترکیبات، pH محیط کشت آن بیش‌تر بود. موافق با نتایج این بخش از آزمایش، استفاده از مخلوط بی‌کربنات‌سدیم، اکسید منیزیم و ترکیب تجاری اسید باف (Acid Buf) در پژوهش دیگری سبب افزایش pH محیط کشت در مقایسه با ترکیب بافری ۶ شده است [۷]. این‌گونه به‌نظر می‌رسد که نسبت برابر اکسید منیزیم و بی‌کربنات سدیم در زمان‌های بالاتر انکوباسیون عملکرد بهتری دارد. احتمالاً افزایش معنی‌دار pH محیط کشت در ترکیبات بافری ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ در مقایسه با ترکیب بافری ۶ (فاقد بافر) می‌تواند به‌دلیل کاتیون‌های قابل تعویض با یون هیدروژن، به‌عنوان تعدیل‌کننده یون هیدروژن در محیط کشت باشد که از کاهش pH شکمبه و به‌تبع آن از ایجاد اسیدوز جلوگیری نمایند [۱۸]. لازم به‌ذکر است علی‌رغم معنی‌داری، اسیدیته تمامی گروه‌های آزمایشی در حد فیزیولوژیکی مناسب شکمبه قرار داشت و اختلافات بسیار جزیی بود.

ماده خشک ناپدیدشده در شرایط برون‌تنی شاخصی است که می‌تواند با میزان هضم دستگاه گوارش نشخوارکنندگان مرتبط باشد. هشت ساعت پس از انکوباسیون ماده خشک ناپدیدشده در ترکیب بافری ۵ و ۶ بیش‌تر از سایر ترکیبات بود (P<۰/۰۵).

جدول ۵. اثر سطوح مختلف مخلوط‌های بافری بر فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم ماده خشک در زمان‌های ۸ و ۲۴ ساعت

ترکیب بافری	pH		ماده خشک ناپدیدشده (درصد)		غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	
	۸	۲۴	۸	۲۴	۸	۲۴
۱	۶/۶۵^{d}	۶/۴۲^{d}	۴۵/۵^{d}	۵۶/۶^{b}	۱۵/۱^{ab}	۱۵/۳^{a}
۲	۶/۷۰^{a}	۶/۴۹^{a}	۴۷/۸^{bc}	۵۷/۵^{ab}	۱۴/۷^{b}	۱۳/۴^{b}
۳	۶/۶۸^{b}	۶/۴۸^{b}	۴۷/۴^{c}	۵۷/۴^{ab}	۱۵/۷^{a}	۱۵/۴^{a}
۴	۶/۶۵^{d}	۶/۴۳^{c}	۴۶/۳^{d}	۵۸/۰^{a}	۱۵/۲^{ab}	۱۴/۲^{b}
۵	۶/۶۷^{c}	۶/۴۲^{d}	۴۸/۶^{ab}	۵۷/۶^{ab}	۱۵/۳^{ab}	۱۵/۳^{a}
۶	۶/۶۳^{e}	۶/۴۱^{d}	۴۹/۵^{a}	۵۷/۶^{ab}	۱۴/۶^{b}	۱۵/۶^{a}
P-Value	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۰۱
SEM	۰/۰۰۳	۰/۰۰۴	۰/۲۱۳	۰/۲۲۸	۰/۰۹۵	۰/۱۸۱

ترکیب بافری ۱ (۱۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۱۵ درصد اکسید منیزیم + ۳۵ درصد کربنات منیزیم + ۳۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۲ (۳۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۳ (۲۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۴۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۴ (۴۰ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۲۰ درصد اکسید منیزیم + ۲۰ درصد کربنات منیزیم + ۲۰ درصد بنتونیت سدیم)، ترکیب بافری ۵ یا هرود (۱۶ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۲۲ درصد کربنات منیزیم + ۵ درصد بنتونیت‌سدیم و ۲۲ درصد منوبازیک پتاسیم فسفات) و ترکیب بافری ۶ (فاقد بافر).

a-d: تفاوت میانگین‌ها در هر ستون با حروف غیرمشابه معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در این زمان کم‌ترین مقدار ماده خشک ناپدیدشده مربوط به ترکیب بافری ۱ و ۴ بود. در زمان ۲۴ ساعت، مقدار ماده خشک ناپدیدشده کم‌تر تحت تأثیر ترکیبات بافری قرار گرفت به‌طوری‌که مقدار این فراسنجه از نظر آماری بین ترکیب بافری ۲، ۳، ۴، ۵ و کنترل برابر بود و تنها ترکیب بافری ۱ و ۴ از نظر آماری با یکدیگر اختلاف داشتند (P<۰/۰۵). این نتایج تأییدکننده گزارش‌های قبلی است که نشان داده استفاده از ترکیبات بافری و قلیایی‌کننده اثری بر قابلیت هضم ماده خشک ندارد [۱۸]. هم‌چنین در راستای نتایج این آزمایش افزودن بی‌کربنات‌سدیم و زئولیت به جیره قابلیت هضم ماده خشک، فیبر و پروتئین را تحت تأثیر قرار نمی‌دهد [۳] و احتمالاً اختلاف جزیی بین ترکیبات بافری ۱ و ۴ بیانگر تغییر جمعیت‌های میکروبی مایع شکمبه تحت تأثیر مخلوط‌های بافری می‌باشد [۲۴]. به‌طورکلی پاسخ به بافرها متغیر و غیرقابل پیش‌بینی است [۹]، لذا یکی از علل تفاوت بین نتایج آزمایش‌های مختلف را بتوان به تفاوت در ترکیب جیره‌هایی که بافر یا مخلوط بافری در آن‌ها استفاده می‌شود، مرتبط دانست.

اختلاف غلظت نیتروژن آمونیاکی در بین ترکیبات بافری بسیار جزیی بود. هشت ساعت پس از انکوباسیون، غلظت نیتروژن آمونیاکی در بین ترکیبات بافری مختلف، متفاوت بود؛ به‌طوری‌که بیش‌ترین غلظت آمونیاک مربوط به ترکیب بافری ۳ بود که تنها با ترکیب بافری ۶ (ترکیب فاقد بافر) و ۲ اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). پس از گذشت ۲۴ ساعت از شروع انکوباسیون، مقدار نیتروژن آمونیاکی در ترکیب بافری ۲ و ۴ به‌ترتیب ۱۳/۴ و ۱۴/۲ میلی‌گرم در دسی‌لیتر بود که به‌طور معنی‌داری از سایر ترکیبات بافری کم‌تر بود (P<۰/۰۵). مقدار این فراسنجه در بین سایر ترکیبات بافری یکسان بود (P>۰/۰۵). به‌طورکلی اختلافات غلظت نیتروژن آمونیاکی در بین ترکیبات بافری بسیار جزیی بود و استفاده از مخلوط‌های بافری باعث کاهش نوسانات و افزایش یکنواختی نسبی غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با ترکیب بافری ۶ (ترکیب فاقد بافر) شد. احتمالاً وجود خاصیت تعویض کاتیونی در برخی ترکیبات از جمله بنتونیت، سبب می‌شود تا یون آمونیوم با کاتیون‌های موجود در ساختمان بنتونیت مبادله و از این طریق سبب کاهش غلظت نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با ترکیب بافری ۶ شد [۱۸]. نتایج این بخش از آزمایش موافق با اکثر گزارش‌های قبلی است که نشان داده‌اند استفاده از بافرها اثر معنی‌داری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی نداشته است [۱۸ و ۲۴]. برخلاف نتایج این آزمایش، افزدون بافر سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شده است که علت آن، افزایش pH به‌دنبال استفاده از بافر و متعاقباً افزایش قابلیت هضم به ویژه هضم سلولز عنوان شده است [۱۴].

در مجموع، یافته‌های این پژوهش نشان داد که افزودن ترکیب بافری ۲ حاوی ۳۵ درصد بی‌کربنات‌سدیم + ۳۵ درصد اکسید منیزیم + ۱۵ درصد کربنات‌منیزیم + ۱۵ درصد بنتونیت‌سدیم در جیره‌هایی با مواد متراکم زیاد به‌دلیل داشتن ظرفیت بافری بالا می‌تواند سبب حفظ و پایداری pH مایع شکمبه گردد و از بروز اسیدوز جلوگیری نماید. پیشنهاد می‌شود اثر ترکیبات بافری مورد آزمایش در این مطالعه روی حیوان زنده بررسی شود و با نتایج تحقیق حاضر مقایسه گردد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. 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.

2. Blümmel M, Makkar HPS and Becker K (1997) In vitro gas production: a technique revisited. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 77: 24-34.
3. Bougouin A, Ferlay A, Doreau M and Martin C (2018) Effects of carbohydrate type or bicarbonate addition to grass silagebased diets on enteric methane emissions and milk fatty acid composition in dairy cows. Journal of dairy science, 101(7): 6085-6097.
4. Broderick GA and Kang JH (1980) Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. Journal of Dairy Science, 63: 64-75.
5. Calsimiglia S, Cardozo PW, Ferrer A and Bach A (2008) Changes in rumen microbial fermentation are due to combined effect of type of diet and pH. Journal Animal of Science, 86: 702-711.
6. Cruywagen CW, Taylor S, Beya MM and Calitz T (2015) The effect of buffering dairy cow diets with limestone, calcareous marine algae or sodium bicarbonate on ruminal pH profiles, production responses and rumen fermentation. Journal of dairy Science, 98: 5506-5514.
7. Danesh Mesgaran M, Amini J and 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.
8. Dryden GM (2008) Nutritional ecology In Animal Nutrition Science, International, Oxfordshire, UK.
9. Erdman RA (1988) Dietary buffering requirements of the lactating dairy cow: A review. Journal of Dairy Science, 71: 3246-3266.
10. Herod EL, Bechtle RM, Bartley EE and Dayton D (1978) Buffering ability of several compounds in vitro and the effect of a selected buffer combination on ruminal acid production in vivo. Journal of Dairy Science, 61: 1114-1122.
11. Hoor A (2014) To determine buffering capacity and buffering value index of various inorganic compound and its in vitro effect on rumen acid load of diets contanting different amounts of alfalfa hay. Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, MSc Thesis. (In Persian)
12. Hutjens MF (1998) Strategic use of feed additives in dairy cattle nutrition. University of Illinois, Illini DairyNet Papers.
13. Jahani AH, Danesh Mesgaran M, Vakili A, Rezayazdi K and Hashemi M (2011) Effect of various medicinal plant essential oils obtained from semi-arid climate on rumen fermentation characteristics of a high forage diet using in vitro batch culture. African Journal Microbial Research, 5: 4812-4819.
14. Kang S and Wanapat M (2018) Rumen-buffering capacity using dietary sources and in vitro gas fermentation. Animal Production Science, 58(5): 862-870.
15. Koul Y, Kumar U, Sareen K and Singh S (1998) Effect of sodium bicarbonate supplementation on ruminal microbial populations and metabolism in buffalo calves. Indian Journal Animal Science, 68 (7): 629-631.
16. Mahdavirad N, Chaji M, Bojarpour M and Dehghanbanadaki M (2018) Investigation the buffering capacity of several conventional buffer compounds in feeding of ruminant animals by acid titration method and their effect on gas production parameters. Iranian Journal of Animal Science, 48(4): 559-571. (In Persian)
17. 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.
18. 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. (In Persian)
19. Ørskov ER and McDonald I (1979) The estimation of protein degradation in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. Journal of Agriculture Science, 92: 499-503.
20. Plaizier JC, Danesh Mesgaran D, Derakhshani H, Golder H, Khafipour E, Kleen JL, Lean I, Loor J, Penner G and Zebeli Q (2018) Enhancing gastrointestinal health in dairy cows: A review. Animal. 12(2): 399-418.
21. Sharma H, Pal RP, Mir SH, Mani V and Ojha L (2018) Effect of feeding buffer on feed intake, milk production and rumen fermentation pattern in lactating animals: A review. Journal of Entomology and Zoology Studies, 6(4): 916-922.
22. Sulzberger SA, Kalebich CC, Melnichenko S and Cardoso FC (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.
23. Tucker WB, Hogue JF, Aslam M, Lema M, Martin M, Owens FN, Shin LS, Le Ruyet P and Adams GD (1992) A buffer value index to

evaluate effects of buffers on ruminal milieu in cows fed high or low concentrate silage or hay diets. Journal of Dairy Science, 75: 1069-1077.

24. Vaghar Seyedin SM, Mojtahedi M, Ghiasi SA and Fathi Nasri MH (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 (4). (In Persian)
25. Váradyová Z, Kisidayov SK, Mihalikov K and Baran M (2006) Influence of natural magnesium sources on the in vitro fermentation and protozoan population in the rumen fluid collected from sheep. Small Ruminant Research, 61: 63-71.