

## تأثیر مونسین و متافیکس بر قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی، تولید و ترکیب شیر و الگوی اسیدهای چرب شیر گاوهای شیرده هلشتاین

احمد قاسمی<sup>۱</sup>، آرش آذر فر<sup>۲\*</sup>، علی کیانی<sup>۳</sup> و حشمت‌اله خسروی‌نیا<sup>۴</sup>

۱، ۲، ۳ و ۴. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار، استادیار و دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۰/۲۴ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۸/۳۰)

### چکیده

به منظور بررسی تأثیر مکمل جیره‌ای مونسین با متافیکس یا بدون متافیکس (ترکیبی از اسیدهای دی کربوکسیلیک آلی مالات و فومارات) بر قابلیت هضم مواد مغذی، تولید و ترکیب شیر و الگوی اسیدهای چرب شیر، از ۴ رأس گاو شیرده هلشتاین چند شکم‌زا با میانگین وزنی  $657 \pm 12$  کیلوگرم و روزهای شیردهی  $133 \pm 41$  روز در قالب یک طرح مربع لاتین  $4 \times 4$  استفاده شد. گاوها به‌طور تصادفی به تیمارهای آزمایشی اختصاص داده شدند. تیمارهای آزمایشی شامل جیره پایه بدون افزودنی (به‌عنوان شاهد)، جیره پایه به علاوه ۲۴ میلی‌گرم مونسین در هر کیلوگرم ماده خشک، جیره پایه به علاوه ۵ گرم متافیکس در هر کیلوگرم ماده خشک و جیره پایه به علاوه ۲۴ میلی‌گرم در کیلوگرم مونسین و ۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک متافیکس بودند. افزودن مونسین با متافیکس یا بدون متافیکس به‌طور معناداری ماده خشک مصرفی را کاهش و تولید و بازده شیر را افزایش داد ( $P < 0.05$ ). میانگین درصد چربی، پروتئین، لاکتوز، مواد جامد بدون چربی و کل مواد جامد تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت. افزودن مکمل مونسین به‌تنهایی یا همراه با متافیکس قابلیت هضم ظاهری پروتئین خام، الیاف نامحلول در شوینده خشی، کربوهیدرات‌های غیرالیافی و ماده آلی را به‌طور معناداری کاهش داد ( $P < 0.05$ ). افزودن مونسین به‌تنهایی یا همراه با مکمل متافیکس به جیره گاوهای شیری محتوی اسید لینولئیک کونژوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) شیر را به‌طور معناداری افزایش داد ( $P < 0.05$ ). نتایج این تحقیق نشان داد که افزودن مکمل مونسین و متافیکس به جیره‌های گاوهای شیرده در اواسط دوره شیردهی باعث افزایش تولید شیر شد ولی تأثیر معناداری بر ترکیبات شیر نداشت. افزودن مکمل مونسین و متافیکس به‌تنهایی یا به صورت مخلوط تأثیری بر ترکیب بیشتر اسیدهای چرب شیر نداشت، ولی محتوی اسید لینولئیک کونژوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) چربی شیر در نتیجه افزودن مونسین افزایش یافت.

**واژه‌های کلیدی:** الگوی اسیدهای چرب شیر، تولید شیر، متافیکس، مونسین.

Ipharraguerro & Jimmy Clark, 2003; Phipps *et al.*)

(*al.*, 2000). یونوفرها علاوه بر تأثیرات مفید بر تولید شیر و توان ایمنی بدن، بر ترکیب شیر، و الگوی اسیدهای

### مقدمه

یونوفرها<sup>۱</sup> در تغذیه گاوهای شیرده جهت افزایش عملکرد تولید شیر و توان ایمنی بدن استفاده می‌شوند

چرب شیر و توان تولیدمثلی گاوهای شیری نیز مؤثرند (Ipharraguerro & Jimmy Clark, 2003; Alzahal et al., 2008). چربی شیر نشخوارکنندگان به دلیل غلظت زیاد اسیدهای چرب اشباع از قبیل اسید میریستیک (۱۴:۰) و اسید پالمیتیک (۱۶:۰) با افزایش غلظت کلاسترول کل و کلاسترول لیپوپروتئین‌های با دانسیته کم در پلاسما، مشکلات قلبی-عروقی را در انسان افزایش می‌دهد (Mansbridge & Blake, 1997). متابولیسم اسیدهای چرب در شکمبه، به ویژه بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه، تأثیر بسزایی بر ترکیب اسیدهای چرب شیر نشخوارکنندگان دارد. عوامل بسیاری همچون غلظت اسیدهای چرب غیراشباع، شکل یا مکمل چربی استفاده‌شده (دانه‌های کامل روغنی، نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب ...)، درجه غیراشباع‌بودن اسیدهای چرب، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های یونوفوری همچون مونسین، نسبت علفه به کنسانتره و شرایط شکمبه (pH شکمبه) بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Jenkins, 1993). مونسین یک یونوفر کربوکسیلیک اتری است که به‌وسیله تخمیر مواد قندی توسط باکتری *Streptomyces cinnamonesis* تولید می‌شود (Duffield & Bagg, 2000). استفاده از مونسین در جیره نشخوارکنندگان با مزایای مختلفی از جمله کاهش تولید متان، کاهش دامیناسیون اسیدهای آمینه و کاهش تجمع آمونیاک در شکمبه، افزایش تولید شیر و بهبود توازن انرژی و کاهش اسیدوز تحت حاد همراه است (Duffield & Bagg, 2000). همچنین استفاده از مونسین باعث کاهش بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شرایط آزمایشگاهی (Van Nevel & Demeyer, 1995) می‌شود و بنابراین می‌تواند باعث افزایش غلظت ایزومرهای اسیدهای چرب کونژوگه‌شده در شیر شود. این نوع اسیدهای چرب در سلامتی انسان اهمیت دارند (Fellner et al., 1997). به هر حال با توجه به مزایای زیاد استفاده از یونوفرها در جیره نشخوارکنندگان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در صنعت دام و طیور، به دلیل ایجاد گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و باقی‌ماندن بقایای آن‌ها در تولیدات دامی، نگرانی‌هایی را به وجود آورده است.

### مواد و روش‌ها

تعداد ۴ رأس گاو شیری هلستاین چندشکم‌زا با میانگین وزنی  $657 \pm 12$  (کیلوگرم)، امتیاز وضعیت بدنی  $3/32 \pm 0/32$  با روزهای شیردهی  $133 \pm 41$  با متوسط تولید اولیه  $20/5 \pm 1/5$  روز انتخاب شدند. گاوها به‌طور تصادفی به چهار جیره آزمایشی شامل: ۱. جیره شاهد، ۲. جیره حاوی ۲۴ میلی‌گرم در

چرب شیر و توان تولیدمثلی گاوهای شیری نیز مؤثرند (Ipharraguerro & Jimmy Clark, 2003; Alzahal et al., 2008). چربی شیر نشخوارکنندگان به دلیل غلظت زیاد اسیدهای چرب اشباع از قبیل اسید میریستیک (۱۴:۰) و اسید پالمیتیک (۱۶:۰) با افزایش غلظت کلاسترول کل و کلاسترول لیپوپروتئین‌های با دانسیته کم در پلاسما، مشکلات قلبی-عروقی را در انسان افزایش می‌دهد (Mansbridge & Blake, 1997). متابولیسم اسیدهای چرب در شکمبه، به ویژه بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه، تأثیر بسزایی بر ترکیب اسیدهای چرب شیر نشخوارکنندگان دارد. عوامل بسیاری همچون غلظت اسیدهای چرب غیراشباع، شکل یا مکمل چربی استفاده‌شده (دانه‌های کامل روغنی، نمک‌های کلسیمی اسیدهای چرب ...)، درجه غیراشباع‌بودن اسیدهای چرب، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های یونوفوری همچون مونسین، نسبت علفه به کنسانتره و شرایط شکمبه (pH شکمبه) بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شکمبه را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Jenkins, 1993). مونسین یک یونوفر کربوکسیلیک اتری است که به‌وسیله تخمیر مواد قندی توسط باکتری *Streptomyces cinnamonesis* تولید می‌شود (Duffield & Bagg, 2000). استفاده از مونسین در جیره نشخوارکنندگان با مزایای مختلفی از جمله کاهش تولید متان، کاهش دامیناسیون اسیدهای آمینه و کاهش تجمع آمونیاک در شکمبه، افزایش تولید شیر و بهبود توازن انرژی و کاهش اسیدوز تحت حاد همراه است (Duffield & Bagg, 2000). همچنین استفاده از مونسین باعث کاهش بیوهیدروژناسیون اسیدهای چرب غیراشباع در شرایط آزمایشگاهی (Van Nevel & Demeyer, 1995) می‌شود و بنابراین می‌تواند باعث افزایش غلظت ایزومرهای اسیدهای چرب کونژوگه‌شده در شیر شود. این نوع اسیدهای چرب در سلامتی انسان اهمیت دارند (Fellner et al., 1997). به هر حال با توجه به مزایای زیاد استفاده از یونوفرها در جیره نشخوارکنندگان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در صنعت دام و طیور، به دلیل ایجاد گونه‌های میکروبی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و باقی‌ماندن بقایای آن‌ها در تولیدات دامی، نگرانی‌هایی را به وجود آورده است.

بود. نسبت علوفه به کنسانتره در هر چهار جیره، ۴۳ به ۵۷ درصد بود. مونسین بر اساس حداکثر مقدار توصیه شده برای استفاده در جیره گاوهای شیری و به میزان ۲۴ میلی گرم در هر کیلوگرم ماده خشک استفاده شد (Canadian Food Inspection Agency, 2011). مکمل متافیکس بر اساس توصیه کارخانه سازنده به میزان ۵ گرم در هر کیلوگرم ماده خشک به جیرهها افزوده شد. تمامی جیرهها بر اساس توصیههای احتیاجات غذایی گاوهای شیری فرموله شدند (NRC, 2001). علوفه استفاده شده در آزمایش به صورت یکسان در تمام جیرهها، سیلاژ ذرت شده و یونجه بود. گاوها به آب دسترسی آزاد داشتند. شیردوشی دو بار در روز در ساعت ۷:۰۰ و ۱۹:۰۰ انجام گرفت.

کیلوگرم مکمل مونسین، ۳. جیره حاوی ۵ گرم در کیلوگرم مکمل متافیکس و ۴. جیره حاوی ۲۴ میلی گرم در کیلوگرم مونسین و ۵ گرم در کیلوگرم متافیکس، در قالب طرح مربع لاتین ۴×۴ اختصاص داده شدند. گاوها در سالن مسقف در جایگاههای انفرادی توسط یک زنجیر به آخور بسته شدند. طول هر دوره آزمایش ۲۱ روز بود که ۱۴ روز اول برای سازش پذیری گاوها به جیرههای آزمایشی و ۷ روز آخر برای جمع آوری دادهها در نظر گرفته شد. جیرههای آزمایشی (جدول ۱) به صورت کاملاً مخلوط شده بودند و دو بار در روز در ساعت های ۸:۰۰ و ۱۴:۰۰ در اختیار گاوها قرار گرفتند؛ به نحوی که باقیمانده خوراک آنها حداکثر ۱۰ درصد خوراک عرضه شده

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی تشکیل دهنده جیرههای آزمایشی (بر اساس ۱۰۰ درصد ماده خشک)

مواد خوراکی		تیمار		شاهد	(درصد در ماده خشک)
مونسنین+متافیکس	متافیکس	مونسنین	متافیکس		
۲۷	۲۷	۲۷	۲۷	۲۷	علف خشک یونجه
۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	۱۶	سیلاژ ذرت
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	دانه جو آسیاب شده
۷	۷	۷	۷	۷	دانه ذرت آسیاب شده
۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	۱۳	تخم پنبه
۹	۹	۹	۹	۹	کنجاله تخم پنبه
۲	۲	۲	۲	۲	کنجاله سویا
۵/۸	۵/۸	۶/۳	۶/۳	۶/۳	تفال چغندر قند
۷	۷	۷	۷	۷	سبوس گندم
۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۵	نمک
۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	۰/۷	سدیم بی کربنات
۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	مکمل ویتامینی معدنی <sup>۱</sup>
۰/۰۲۴	۰	۰/۰۲۴	۰	۰	مونسنین <sup>۲</sup>
۰/۵	۰/۵	۰	۰	۰	متافیکس <sup>۳</sup>
<u>ترکیب شیمیایی (درصد از ماده خشک)</u>					
۶۳/۲۱	۶۳/۲۱	۶۲/۳۷	۶۳/۲۱	۶۳/۲۱	ماده خشک
۱۶/۸۷	۱۶/۸۷	۱۶/۹۵	۱۶/۸۷	۱۶/۸۷	پروتئین خام
۶/۸۲	۶/۸۲	۶/۹۲	۶/۸۲	۶/۸۲	چربی خام
۳۱/۲	۳۱/۲	۳۱/۶	۳۱/۲	۳۱/۲	الیاف نامحلول در شوینده خنثی
۳۶/۶۱	۳۶/۶۷	۳۵/۵۳	۳۶/۶۱	۳۶/۶۱	کربوهیدرات های غیرالیافی
۸/۵	۸/۵	۹	۸/۵	۸/۵	خاکستر
۶/۵۷	۶/۵۷	۶/۵۷	۶/۵۷	۶/۵۷	انرژی خالص شیردهی (مگاژول بر کیلوگرم)

۱. هر کیلوگرم مکمل مواد ویتامینی - معدنی دارای ۱۸۰ گرم کلسیم، ۷۰ گرم فسفر، ۳۵ گرم پتاسیم، ۵۰ گرم سدیم، ۵۸ گرم کلسیم، ۳۰ گرم منیزیم، ۲۲ گرم سولفور، ۵ گرم منگنز، ۴ گرم آهن، ۳ گرم روی، ۳۰۰ میلی گرم مس، ۱۰۰ میلی گرم ید، ۱۰۰ میلی گرم کبالت، ۲۰ میلی گرم سلنیوم، ۵۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D3، ۱۰۰ واحد بین المللی ویتامین E و ۳ گرم آنتی اکسیدان است.

۲. هر کیلوگرم مکمل مونسین دارای ۱۰۰۰۰۰ میلی گرم رومنسین است.

۳. مکمل متافیکس شامل ترکیبی از اسیدهای دی کربوکسیلیک آلی همچون مالیک اسید و فوماریک اسید بود.

= انرژی خالص شیر (مگاژول به ازای هر کیلوگرم)  
 (۰/۰۳۹۵ × محتوی لاکتوز شیر) + (۰/۰۵۴۷ × محتوی  
 پروتئین شیر) + (۰/۰۹۲۹ × محتوی چربی شیر)

محتوی پروتئین خام شیر از ضرب محتوی  
 نیتروژن در ۶/۳۸ محاسبه شد. مقدار مصرف انرژی  
 ویژه شیردهی و نیتروژن هر یک از جیره‌ها از  
 حاصل ضرب محتوی انرژی ویژه و ازت آن‌ها در مقدار  
 ماده خشک مصرفی به دست آمد (NRC, 2001).  
 بازدهی استفاده از ازت و انرژی ویژه شیردهی برای  
 تولید شیر با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد  
 (Abdi et al., 2013):

$$= \text{بازده استفاده از نیتروژن} \\
= \frac{\text{نیتروژن شیر (کیلوگرم در روز)}}{\text{نیتروژن مصرفی (کیلوگرم در روز)}} \times 100$$

$$= \text{بازده استفاده از انرژی خالص ویژه تولید شیر} \\
= \frac{\text{انرژی خالص شیر (مگاکالری)}}{\text{انرژی خالص مصرفی (مگاکالری)}}$$

پروپیل اسیدهای چرب شیر بر اساس روش  
 Sukhija & Palmquist (1988) و با استفاده از دستگاه  
 کروماتوگرافی گازی (model Varian3400, WalnutCreek, CA, USA)  
 اندازه‌گیری شد. دمای  
 تزریق‌کننده<sup>۱</sup> و تشخیص‌دهنده<sup>۲</sup> دستگاه به ترتیب  
 ۲۸۰ و ۳۰۰ درجه سانتی‌گراد بود. گاز ناقل در این  
 دستگاه هلیوم و تشخیص‌دهنده<sup>۳</sup> آن از نوع FID بود.  
 دمای ستون دستگاه در آغاز در طول ۵ دقیقه به ۱۶۰  
 درجه سانتی‌گراد رسانده شد و برای ۱۵ دقیقه در این  
 دما باقی ماند. سپس با سرعت ۲۰ درجه سانتی‌گراد  
 در دقیقه به ۱۹۰ درجه سانتی‌گراد رسانده شد و تا  
 پایان زمان مورد نیاز (۳۰ دقیقه) در این دما باقی ماند  
 (Qui et al., 2004). ستون استفاده‌شده از نوع مویینه  
 به طول ۱۰۰ متر بود (100 m, 0.25 mm i.d., film thickness 0.25 μm)  
 بود. پیک اسیدهای چرب با

نمونه خوراک و باقیمانده خوراک هر یک از گاوها  
 در طول دوره جمع‌آوری داده‌ها، روزانه جمع‌آوری و به  
 مدت ۴۸ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون  
 خشک شد. نمونه‌های خشک‌شده با استفاده از آسیاب  
 دارای الک ۱ میلی‌متری آسیاب شدند. نمونه‌های هر  
 گاو در هر دوره با هم مخلوط شدند.

ماده خشک مصرفی روزانه در طول دو هفته اول  
 یک روز در میان و هفته سوم، روزانه اندازه‌گیری شد و  
 داده‌های هفته سوم در آنالیز آماری استفاده شد.  
 نمونه‌های خوراک و باقیمانده خوراک برای ماده  
 خشک، خاکستر، پروتئین خام، چربی خام (AOAC,  
 2000) و الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF,  
 بدون آلفا-امیلاز و سولفیت سدیم) (Van Soest et al., 1991)  
 آنالیز شدند. کربوهیدرات‌های غیرالیافی  
 (NFC) به روش تفاوت از کسر کردن مجموع خاکستر،  
 چربی، پروتئین و الیاف نامحلول در شوینده خنثی از  
 صد محاسبه شد (NRC, 2001).

تولید شیر در دو هفته اول به صورت یک روز در  
 میان و در هفته آخر هر روز ثبت شد. در روزهای ۱۶ و  
 ۱۷ هر دوره آزمایشی نمونه‌های شیر از چهار  
 شیردوشی متوالی گرفته شد و برای هر دوره و هر گاو  
 با هم مخلوط شد تا یک نمونه برای هر گاو در هر  
 دوره حاصل شود. نمونه‌های شیر با افزودن ۲-برومو-  
 ۲-نیتروپروپین-۱-۲ دیول در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد  
 تا زمان آنالیزهای بعدی ذخیره شد. مقدار چربی،  
 پروتئین، لاکتوز، نیتروژن اوره‌ای و شمارش سلول‌های  
 بدنی شیر با استفاده از دستگاه میلکواسکن (133B,  
 Foss Electric, Hillerod, Denmark) اندازه‌گیری شد.  
 مقدار شیر تولیدی تصحیح‌شده بر اساس ۴ درصد  
 چربی بر اساس فرمول ارائه‌شده توسط احتیاجات  
 غذایی گاوهای شیری (NRC, 2001) محاسبه شد.  
 شیر تصحیح‌شده برای انرژی بر اساس فرمول ارائه‌شده  
 توسط Tyrrel & Reid (1965) محاسبه شد. انرژی  
 ویژه شیر بر اساس فرمول ارائه‌شده برای تعیین  
 احتیاجات غذایی گاوهای شیری توسط انجمن  
 تحقیقات ملی آمریکا (NRC, 2001) و به‌صورت زیر  
 محاسبه شد:

1. Injector
2. Detector
3. Flame Ionized Detector

مصرفی را در مقایسه با گروه شاهد کاهش داد ( $P < 0.01$ ). تأثیر مونسین در کاهش خوراک مصرفی می‌تواند به دلیل بهبود بازده تخمیر در شکمبه، افزایش تولید پروبیونات، افزایش بازده انرژی و بازده هضمی و کاهش عبور مواد هضمی از شکمبه باشد (Nagaraja, 1995). برخلاف نتایج این تحقیق برخی مطالعات گزارش کرده‌اند که افزودن مکمل مونسین تأثیر معناداری بر ماده خشک مصرفی نداشت (Martinez et al., 2009; Ghorbani et al., 2010). دلیل تناقض در نتایج مطالعات با سطوح مختلف مونسین را به عواملی همانند نوع جایگاه نگهداری، مرحله شیردهی، تعداد شکم زایش، نژاد دام‌ها و طول دوره آزمایش نسبت داده‌اند (Mullins et al., 2012). به‌طور کلی نشان داده شده است که افزودن یونوفرها به جیره غذایی، ماده خشک مصرفی را تا ۶ درصد کاهش و انرژی خالص نگهداری را تا ۱۲ درصد افزایش می‌دهد (NRC, 1996). به نظر می‌رسد بیشترین اثر مونسین، ناشی از کاهش مصرف خوراک و در نتیجه افزایش بازده خوراکی باشد (Lana et al., 1997). Foley et al. (2009) گزارش کردند افزودن ملات به جیره گاوهای شیری به طور معناداری ماده خشک مصرفی را کاهش داد. گزارش شده است که اسیدهای دی‌کربوکسیلیک آلی می‌توانند تخمیر شکمبه‌ای و قابلیت هضم الیاف را کاهش دهند و بنابراین موجب انباشتگی مواد فیبری در شکمبه شده و با کاهش سرعت عبور مواد از شکمبه، ماده خشک مصرفی را کاهش دهند (Yu et al., 2010). مصرف روزانه پروتئین خام در گاوهایی که با جیره‌های حاوی مونسین و متافیکس به تنهایی یا به صورت مخلوط تغذیه شدند، با گاوهای تغذیه‌شده با جیره شاهد یکسان بود (جدول ۲). به هر حال میانگین مصرف روزانه پروتئین در گاوهایی تغذیه‌شده با جیره حاوی متافیکس به دلیل مصرف کمتر ماده خشک (به لحاظ عددی) به طور معناداری کمتر از جیره حاوی مونسین و متافیکس بود (جدول ۲). افزودن مونسین و متافیکس به‌تنهایی یا به صورت مخلوط به جیره غذایی تأثیری بر میانگین مصرف روزانه NDF، NFC و عصاره اتری نداشت (جدول ۲).

مقایسه زمان ابقای آن‌ها با زمان ابقای استاندارد خالص استرهای اسیده‌های چرب که با دما و شرایط مشابه به دستگاه گاز کروماتوگرافی تزریق شدند، شناسایی گردیدند. غلظت هریک از اسیده‌های چرب از تقسیم سطح زیر پیک آن اسید چرب بر سطح زیر پیک مجموع اسیده‌های چرب، محاسبه و به صورت گرم در هر صد گرم استر متیله اسید چرب بیان شد. نمونه‌برداری از مدفوع دوبار در روز (در حدود ۲۵۰ گرم وزن تر)، به مدت ۵ روز و از روز ۱۶ هر دوره به‌صورت برداشت مستقیم از راست‌روده، ۴ و ۸ ساعت پس از تغذیه صبحگاهی انجام گرفت. نمونه‌های مدفوع برای هر گاو در هر دوره با هم مخلوط شد و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آن خشک گردید و سپس برای عبور از الک ۱ میلی‌متری آسیاب شد. ترکیب شیمیایی نمونه‌های مدفوع بر اساس روش‌هایی که اشاره شد، تعیین گردید. قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی در هفته آخر هر دوره با استفاده از خاکستر نامحلول در اسید به عنوان نشانگر داخلی اندازه‌گیری شد (Mc Geough et al., 2010). داده‌های آزمایش با استفاده از رویه MIXED نرم‌افزار SAS (2003) با استفاده از مدل زیر آنالیز شدند:

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + C_j + P_k + e_{ijkl}$$

که در آن  $Y_{ijkl}$ ، متغیر وابسته؛  $\mu$ ، میانگین جامعه (کل)؛  $T_i$ ، اثر ثابت تیمار؛  $C_j$ ، اثر تصادفی حیوان؛  $P_k$ ، اثر ثابت دوره و  $e_{ijkl}$ ، اثر تصادفی خطای باقیمانده بود. به دلیل نداشتن تأثیر معنادار، اثر باقیمانده از دوره پیش‌آزمایشی (carry over effect) از مدل حذف شد. مقایسه چنددامنه‌ای میانگین حداقل مربعات با استفاده از آزمون حداقل تفاوت معنادار محافظت‌شده فیشر انجام گرفت. برای تمامی مقایسه‌ها معناداری در سطح  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

## نتایج و بحث

اثر افزودن مونسین و متافیکس بر مقدار ماده خشک، ماده آلی و پروتئین خام مصرفی در جدول ۲ نشان داده شده است. افزودن مونسین و متافیکس به جیره، به‌طور معناداری میانگین ماده خشک و ماده آلی

جدول ۲. تأثیر افزودن مونسین و متافیکس بر میانگین مصرف و قابلیت هضم ظاهری مواد مغذی

P-value <sup>۵</sup>	خطای		جیره			عوامل
	معیار	تیمار	مونسنین و متافیکس <sup>۴</sup>	متافیکس <sup>۳</sup>	مونسنین <sup>۲</sup>	
						ماده مغذی مصرفی (کیلوگرم در روز)
						ماده خشک
۰/۰۲	۰/۲۸		۱۹/۰۱ <sup>b</sup>	۱۸/۹۴ <sup>b</sup>	۱۸/۸۵ <sup>b</sup>	۱۹/۲۳ <sup>a</sup>
۰/۰۲	۰/۲۷		۱۶/۸۶ <sup>b</sup>	۱۶/۷۴ <sup>b</sup>	۱۶/۷۳ <sup>b</sup>	۱۷/۰۶ <sup>a</sup>
۰/۰۷	۰/۰۵		۳/۲۷ <sup>a</sup>	۳/۱۷ <sup>b</sup>	۳/۱۹ <sup>ab</sup>	۳/۲۵ <sup>ab</sup>
۰/۸۸	۰/۱۹		۵/۵۲	۵/۶۲	۵/۳۵	۵/۶۱
۰/۳۹	۰/۱۵		۶/۹۱	۶/۸۶	۶/۸۱	۷/۰۰
۰/۴۴	۰/۰۱		۱/۲۴	۱/۲۳	۱/۲۳	۱/۲۴
						قابلیت هضم (درصد)
						ماده آلی
۰/۰۰۱	۱/۵۵		۷۳/۹۸ <sup>c</sup>	۹۰/۹۴ <sup>a</sup>	۷۹/۲۵ <sup>b</sup>	۸۷/۹۸ <sup>a</sup>
۰/۰۰۶	۱/۷۶		۷۷/۴۴ <sup>b</sup>	۹۱/۹۰ <sup>a</sup>	۷۹/۰۱ <sup>b</sup>	۸۸/۴۷ <sup>a</sup>
۰/۰۰۴	۴/۳۶		۵۷/۹۵ <sup>c</sup>	۸۸/۲۲ <sup>a</sup>	۶۳/۰۸ <sup>bc</sup>	۷۵/۸۳ <sup>ab</sup>
۰/۰۴	۲/۱۶		۸۵/۸۳ <sup>b</sup>	۹۳/۰۲ <sup>a</sup>	۹۲/۷۱ <sup>ab</sup>	۹۵/۱۲ <sup>a</sup>
۰/۵۷	۳/۷۳		۹۰/۶۸	۸۹/۴۳	۸۸/۲۴	۹۵/۲۹

۱. جیره شاهد بدون افزودن مکمل مونسین یا متافیکس / ۲. جیره با ۲۴۰ میلی گرم در کیلوگرم مکمل مونسین / ۳. جیره با ۵ گرم در کیلوگرم مکمل متافیکس / ۴. جیره با ۲۴۰ میلی گرم مونسین و ۵ گرم در کیلوگرم متافیکس / ۵. سطح معناداری \* در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که با حروف غیرمشابه نشان داده شده‌اند اختلاف معناداری دارند ( $P < 0.05$ ).

نارگیل در جیره گاوهای شیری بررسی شد (Reveneau *et al.*, 2012). نتایج این آزمایش نشان داد که جیره حاوی مونسین، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی را به‌طور معناداری کاهش داد. با توجه به اثر مهارکنندگی مونسین بر باکتری‌های تجزیه‌کننده سلولز و کاهش غلظت اسید استیک در مایع شکمبه گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی مونسین (Ipharraguerre *et al.*, 2003) انتظار این بود که در پژوهش حاضر نیز جیره‌های حاوی مونسین باعث کاهش قابلیت هضم ظاهری الیاف نامحلول در شوینده خنثی شوند. گزارش شده است که مکمل فومارات (۲۵ گرم در کیلوگرم ماده خشک) تأثیر معناداری بر قابلیت هضم ظاهری دیواره سلولی نداشت (van Zijderveldh *et al.*, 2011). Sniffen *et al.* (2006) برای بررسی اثر تغذیه با دو سطح مکمل ملات (۵۰ گرم و ۱۰۰ گرم در روز) بر عملکرد گاوهای شیری در اواسط دوره شیردهی نشان دادند که افزودن مکمل ملات به جیره در هر دو سطح مصرفی، بر قابلیت هضم ماده آلی، پروتئین خام و کربوهیدرات‌های غیرساختمانی تأثیری نداشت، اما قابلیت هضم پروتئین خام را به‌طور عددی افزایش داد. به علاوه قابلیت هضم ظاهری دیواره سلولی در جیره حاوی ۱۰۰ گرم ملات از

قابلیت هضم ماده آلی و پروتئین خام در جیره‌های حاوی مونسین به‌تنهایی یا همراه با متافیکس به‌طور معناداری کمتر از جیره شاهد و جیره حاوی متافیکس به‌تنهایی بود ( $P < 0.05$ ). برخلاف نتایج آزمایش حاضر، مکمل مونسین در آزمایش‌های Benchaar *et al.* (2006) و Plaizier *et al.* (2000) بر قابلیت هضم ظاهری ماده آلی تأثیری نداشت. در آزمایش حاضر کاهش قابلیت هضم ظاهری ماده آلی برای جیره‌های حاوی مکمل مونسین را می‌توان تا حدودی به کاهش قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی در این جیره‌ها ارتباط داد (جدول ۲). در آزمایش حاضر، استفاده از مخلوط مونسین و متافیکس قابلیت هضم ظاهری NDF را به‌طور معناداری در مقایسه با جیره شاهد کاهش داد ( $P < 0.01$ ). به‌علاوه استفاده از مکمل متافیکس به مقدار ۵ گرم در هر کیلوگرم از ماده خشک جیره، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی را به لحاظ عددی در مقایسه با جیره شاهد افزایش داد. درحالی‌که با افزودن ۲۴ میلی‌گرم مونسین به هر کیلوگرم از جیره، قابلیت هضم الیاف نامحلول در شوینده خنثی به لحاظ عددی در مقایسه با جیره شاهد کاهش یافت (جدول ۲). در آزمایشی اثر متقابل بین مونسین، چربی حیوانی و روغن

این افزودنی‌های خوراکی در جیره، بازده تولید شیر را به‌طور معناداری در مقایسه با جیره شاهد افزایش داد (جدول ۳) که می‌تواند توجیهی برای افزایش تولید شیر مشاهده‌شده در نتیجه مصرف این افزودنی‌ها در پژوهش حاضر باشد. افزودن مونسنین به جیره غذایی با کاهش تولید متان و افزایش نسبت مولار پروپیونات به استات در شکمبه می‌تواند بازده استفاده از انرژی را در دام‌های نشخوارکننده بهبود بخشیده و از این طریق سبب افزایش تولیدات دام شود (McGuffey et al., 2001). Sniffen et al. (2006) مشاهده کردند که تولید شیر با افزودن ۵۰ گرم مکمل اسید مالیک جیره گاوهای شیرده افزایش یافت. O'Mara et al. (2008) نشان دادند که افزایش در عملکرد حیوان به هنگام افزودن اسیدهای آلی دی‌کربوکسیلیک به جیره، عمدتاً ناشی از کاهش تولید متان به ازای هر کیلوگرم فرآورده تولیدی است.

نظر عددی بیشتر از جیره شاهد بود. آن‌ها گزارش کردند بهبود pH شکمبه با افزودن ملات به جیره سبب بهبود قابلیت هضم الیاف شد (Sniffen et al., 2006). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن مونسنین و متافیکس به‌تنهایی یا به صورت مخلوط، میانگین تولید روزانه را به‌طور معناداری در گاوهای شیری افزایش داد ( $P < 0.05$ ؛ جدول ۳). در رابطه با تأثیر مونسنین بر تولید شیر نتایج متناقضی گزارش شده است. در برخی پژوهش‌ها استفاده از مونسنین در جیره گاوهای شیرده (Abdi et al., 2013; Fatahnia et al., 2010) تولید شیر را افزایش داد و در سایر مطالعات تأثیری بر آن نداشت (Grainger et al., 2008; Odongo et al., 2007). در آزمایش حاضر اگرچه ماده خشک مصرفی به‌طور معناداری در نتیجه استفاده از مونسنین و متافیکس به‌تنهایی یا به‌صورت همراه کاهش یافت، اما استفاده از

جدول ۳. میانگین حداقل مربعات تولید و ترکیب شیر گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی

P-value	خطای معیار	جیره‌های آزمایشی			شاهد	ترکیبات شیر
		مونسنین و متافیکس	متافیکس	مونسنین		
< 0.001	1.02	23/82 <sup>b</sup>	24/84 <sup>a</sup>	23/43 <sup>b</sup>	22/63 <sup>c</sup>	تولید شیر (کیلوگرم در روز)
0.30	1.07	20/76	23/24	21/09	21/75	FCM <sup>۱</sup> درصد
0.29	1.16	21/77	24/43	22/21	22/75	ECM <sup>۲</sup>
						ترکیبات شیر (درصد)
0.30	0.30	3/15	3/87	3/35	3/75	چربی
0.64	0.10	2/48	2/73	2/64	2/68	پروتئین
0.45	0.22	3/88	4/27	4/33	4/34	لاکتوز
0.21	0.01	0/07	0/11	0/12	0/09	نیترژن اوره‌ای شیر
0.54	0.37	7/53	8/18	8/13	8/19	کل مواد جامد بدون چربی
0.55	0.61	10/68	11/27	11/64	11/89	کل مواد جامد
0.13	251	265	782	877	1098	SCC <sup>۳</sup> (x 1000 سلول در هر میلی‌لیتر)
						تولید ترکیبات شیر (کیلوگرم در روز)
0.34	0.05	0/75	0/88	0/78	0/85	چربی
0.46	0.04	0/59	0/67	0/61	0/60	پروتئین
0.47	0.06	0/93	1/05	1/01	0/98	لاکتوز
0.86	0.15	3/36	3/28	3/33	3/32	BCS <sup>۴</sup>
0.33	0.13	2/43	2/71	2/62	2/79	انرژی خالص شیر (مگاژول/کیلوگرم)
0.34	3/78	58/13	67/15	61/16	63/14	انرژی خالص تولیدی (مگاژول در هر روز)
0.001	0.37	1/25 <sup>b</sup>	1/31 <sup>a</sup>	1/24 <sup>b</sup>	1/18 <sup>c</sup>	بازده تولید شیر (ماده خشک مصرفی/تولید شیر)
0.33	0.52	0/46	0/53	0/49	0/50	بازدهی انرژی ویژه مصرفی
0.42	1/17	18/47	20/86	19/31	18/73	بازدهی پروتئین خام مصرفی

۱. (کیلوگرم) تولید چربی (15 ×) + (کیلوگرم) × تولید شیر (0.4 ×) = FCM (کیلوگرم)

۲. (کیلوگرم) تولید پروتئین (7/2 ×) + (کیلوگرم) تولید چربی (12/95 ×) + (کیلوگرم) تولید شیر (0/3 ×) = ECM

۳. شمارش سلول‌های بدنی، ۴. نمره وضعیت بدنی، ۵. سطح معناداری

\* در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که با حروف غیرمشابه نشان داده شده‌اند، دارای اختلاف معناداری هستند ( $P < 0.05$ ).

کونژوگه (CLA c9, t11) الگوی اسیدهای چرب شیر تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت (جدول ۴). تغذیه گاوها با جیره حاوی مونسنین به‌تنهایی یا همراه با متافیکس، مقدار اسید لینولئیک کونژوگه (CLA c9, t11) را در مقایسه با گاوهای تغذیه‌شده با جیره شاهد افزایش داد ( $P < 0.05$ )، ولی افزودن متافیکس به‌تنهایی تأثیری بر محتوی این اسید چرب در شیر نداشت (جدول ۴).

در مطالعه حاضر، افزودن مونسنین و متافیکس به‌تنهایی یا به‌صورت مخلوط تأثیر معناداری بر ترکیبات و تولید ترکیبات شیر، بازدهی استفاده از انرژی ویژه و پروتئین خام جیره نداشت ولی بازدهی استفاده از ماده خشک را برای تولید شیر افزایش معناداری داد که می‌تواند ناشی از کاهش مصرف ماده خشک در نتیجه افزودن این افزودنی‌ها به جیره باشد (جدول ۳). نتایج نشان داد که به استثنای اسید لینولئیک

جدول ۴. میانگین حداقل مربعات الگوی اسیدهای چرب شیر گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی

P-value	خطای معیار	جیره‌های آزمایشی				شاهد	اسید چرب (درصد از مجموع اسیدهای چرب به‌صورت استر متیل)
		مونسنین و متافیکس	متافیکس	مونسنین	شاهد		
۰/۹۲	۰/۱۱	۱/۰۹	۱/۰۷	۱/۰۸	۱/۰۰	۴:۰	
۰/۶۲	۰/۰۸	۱/۰۵	۰/۹۲	۰/۹۷	۰/۹۶	۶:۰	
۰/۲۰	۰/۱۴	۱/۰۹	۰/۷۳	۰/۷۱	۰/۶۹	۸:۰	
۰/۹۸	۰/۳۵	۱/۷۷	۱/۸۸	۱/۶۹	۱/۸۶	۱۰:۰	
۰/۵۹	۰/۲۸	۰/۲۲	۰/۲۶	۰/۲۴	۰/۲۳	۱۰:۱	
۰/۶۵	۰/۳۹	۲/۱۲	۱/۶۷	۲/۱۳	۲/۳۷	۱۲:۰	
۰/۵۰	۱/۳۳	۷/۹۸	۷/۸۸	۹/۳۰	۹/۸۹	۱۴:۰	
۰/۳۹	۱/۳۴	۱/۰۷	۴/۰۴	۱/۲۰	۱/۱۰	۱۴:۱	
۰/۲۸	۰/۱۳	۰/۹۱	۱/۲۴	۱/۲۷	۱/۱۴	۱۵:۰	
۰/۴۳	۳/۹۴	۸/۲۴	۰/۶۴	۰/۲۶	۰/۲۹	۱۵:۱	
۰/۴۹	۴/۶۵	۲۴/۹۴	۲۲/۶۷	۳۰/۷۱	۳۱/۴۵	۱۶:۰	
۰/۴۲	۰/۲۸	۲/۸۳	۲/۵۹	۲/۶۷	۲/۳۲	۱۶:۱	
۰/۵۸	۰/۰۴	۰/۶۹	۰/۶۷	۰/۷۴	۰/۶۹	۱۷:۰	
۰/۷۷	۰/۰۶	۰/۳۱	۰/۲۹	۰/۳۸	۰/۳۲	۱۷:۱	
۰/۳۷	۱/۱۵	۱۱/۹۶	۱۳/۱۱	۱۲/۷۵	۱۴/۰۵	۱۸:۰	
۰/۹۳	۰/۳۷	۲/۳۵	۲/۳۷	۲/۶۰	۲/۴۳	۱۸:۱ (ترانس-۱۱)	
۰/۴۱	۱/۵۷	۲۲/۹۰	۲۴/۳۳	۲۵/۴۰	۲۳/۴۰	۱۸:۱ (سیس-۹)	
۰/۴۷	۰/۰۶	۰/۴۸	۰/۵۸	۰/۶۲	۰/۵۸	۱۸:۲ (ترانس)	
۰/۳۴	۰/۱۵	۱/۷۰	۱/۱۰	۱/۷۳	۲/۰۰	۱۸:۲ (سیس)	
۰/۰۱	۰/۰۸	۰/۶۳ <sup>ab</sup>	۰/۶۰ <sup>bc</sup>	۰/۸۰ <sup>a</sup>	۰/۴۷ <sup>c</sup>	CLA <sup>†</sup> (سیس-۹، ترانس-۱۱)	
۰/۷۵	۰/۰۲	۰/۲۰	۰/۲۱	۰/۲۱	۰/۲۲	۱۸:۳ (سیس)	
۰/۲۸	۰/۰۱	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۲۲	۲۰:۰	
۰/۹۰	۰/۰۱	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۲	۰/۱۳	۲۰:۱	
۰/۶۸	۰/۰۶	۰/۲۰	۰/۲۰	۰/۱۵	۰/۲۷	۲۲:۰	
۰/۳۲	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۳	۲۴:۰	

۱. سطح معناداری / ۲. Conjugated linoleic acid

\* در هر ردیف میانگین حداقل مربعاتی که با حروف غیرمشابه نشان داده شده‌اند، اختلاف معنادار دارند ( $P < 0.05$ ).

که استفاده از مونسنین تأثیری بر ترکیب اسیدهای چرب شیر نداشت (Khodamoradi et al., 2013). در پژوهشی دیگر نیز الگوی اسیدهای چرب شیر تحت

در مطالعه‌ای به‌منظور بررسی تأثیر افزودن مونسنین و ویتامین E به جیره‌های حاوی تخم پنبه کامل به‌عنوان منبع اصلی اسیدهای چرب مشخص شد



با جیره‌های آزمایشی، ناچیز و تشخیص‌ناپذیر بود که می‌تواند عاملی برای تأثیرنداشتن جیره‌ها بر غلظت اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر باشد. در آزمایش حاضر، افزایش معنادار غلظت اسید لینولئیک کونزوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) در شیر گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی مونسنین را تا حدودی می‌توان به افزایش عددی غلظت اسید واکسینیک (۱۸:۱ ترانس-۱۱) در شیر آن‌ها ارتباط داد، زیرا این اسید چرب در سلول‌های پستانی به وسیله آنزیم دلتا-۹ دسچوراز به اسید لینولئیک کونزوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) تبدیل می‌شود (Griinari et al., 2000). مشابه با نتایج حاضر، افزودن ترکیبی از افزودنی‌های خوراکی حاوی فومارت کلسیم محتوی اسید لینولئیک کونزوگه (سیس-۹، ترانس-۱۱) شیر را در آزمایش van Zijderveld et al. (2011) افزایش داد.

تأثیر مکمل‌سازی جیره‌های حاوی سویای خام و سویای برشته‌شده با مونسنین قرار نگرفت (Abdi et al., 2013). مشابه با نتایج حاضر، استفاده از مکمل مونسنین در مطالعه Fatahnia et al. (2010) نیز تأثیری بر محتوی اسیدهای چرب ۱:۱۴، ۱:۱۵، ۱:۱۶، ۱:۱۶، ۱:۱۷، ۱:۱۸، اسیدهای چرب متوسط و بلند زنجیر چربی شیر نداشت. یکی از عوامل مؤثر برالگوی اسیدهای چرب شیر که در سال‌های اخیر به آن پرداخته شده است، تولید اسیدهای چرب ترانس در شکمبه است. اسید لینولئیک کونزوگه (ترانس-۱۰، سیس-۱۲)، مهم‌ترین اسید چرب ترانس است که با مهار آنزیم‌های دخیل در سنتز اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیر، غلظت آن‌ها را در چربی شیر کاهش می‌دهد (Baumgard et al., 2000). در آزمایش حاضر غلظت این اسید چرب در چربی شیر گاوهای تغذیه‌شده

جدول ۵. میانگین حداقل مربعات اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، متوسط زنجیر، بلند زنجیر، اشباع، غیر اشباع، با یک پیوند دوگانه و با چند پیوند دوگانه گاوهای تغذیه‌شده با جیره‌های آزمایشی

P-value	خطای معیار	جیره‌های آزمایشی				شاهد	اسید چرب (درصد از مجموع اسیدهای چرب به صورت استر متیل)
		مونسنین و متافیکس	متافیکس	مونسنین	مونسنین و متافیکس		
۰/۳۸۳۸	۰/۵۲۷	۷/۸۳	۸/۲۲	۶/۸۲	۷/۱۰	اسیدهای چرب کوتاه <sup>۲</sup> زنجیر	
۰/۳۵۶۲	۳/۴۲۵	۴۷/۰۰	۳۹/۳۴	۴۶/۴۹	۴۷/۲۰	اسیدهای چرب متوسط زنجیر <sup>۳</sup>	
۰/۶۶۳۷	۴/۰۳۳	۴۱/۷۰	۴۴/۶۵	۴۵/۳۶	۳۸/۸۲	اسیدهای چرب بلند زنجیر <sup>۴</sup>	
۰/۴۷۸۸۷	۶/۵۸۶	۵۴/۰۳	۵۱/۵۵	۶۱/۷۹	۶۴/۷۲	اسیدهای چرب اشباع	
۰/۲۷۴۸	۴/۸۵۴	۴۲/۴۹	۳۸/۹۵	۳۶/۸۸	۲۸/۴۰	اسیدهای چرب غیر اشباع	
۰/۲۶۵۶	۴/۸۵۹	۳۹/۵۲	۳۵/۶۲	۳۳/۵۵	۲۵/۱۵	اسیدهای چرب با یک پیوند دوگانه	
۰/۴۶۹۵	۰/۲۲۱	۲/۹۷	۳/۳۲	۳/۳۳	۳/۲۶	اسیدهای چرب با چند پیوند دوگانه	

۱. سطح معناداری ۲ / مجموع اسیدهای چرب ۴:۰، ۶:۰، ۸:۰، ۱۰:۰، ۱۰:۱ و ۱۲:۰ / ۳. مجموع اسیدهای چرب ۱۴:۰، ۱۴:۱، ۱۵:۰، ۱۵:۱، ۱۶:۰، ۱۶:۱ و ۱۷:۰ / ۱۷:۱ / ۴. مجموع اسیدهای چرب ۱۸:۰، ۱۸:۱، ۱۸:۲، ۱۸:۳، ۱۸:۴، ۱۸:۵، ۱۸:۶، ۱۸:۷، ۱۸:۸، ۱۸:۹، ۱۸:۱۰، ۱۸:۱۱، ۱۸:۱۲، ۱۸:۱۳، ۱۸:۱۴، ۱۸:۱۵، ۱۸:۱۶، ۱۸:۱۷، ۱۸:۱۸، ۱۸:۱۹، ۱۸:۲۰، ۱۸:۲۱، ۱۸:۲۲، ۱۸:۲۳، ۱۸:۲۴، ۱۸:۲۵، ۱۸:۲۶، ۱۸:۲۷، ۱۸:۲۸، ۱۸:۲۹، ۱۸:۳۰، ۱۸:۳۱، ۱۸:۳۲، ۱۸:۳۳، ۱۸:۳۴، ۱۸:۳۵، ۱۸:۳۶، ۱۸:۳۷، ۱۸:۳۸، ۱۸:۳۹، ۱۸:۴۰، ۱۸:۴۱، ۱۸:۴۲، ۱۸:۴۳، ۱۸:۴۴، ۱۸:۴۵، ۱۸:۴۶، ۱۸:۴۷، ۱۸:۴۸، ۱۸:۴۹، ۱۸:۵۰، ۱۸:۵۱، ۱۸:۵۲، ۱۸:۵۳، ۱۸:۵۴، ۱۸:۵۵، ۱۸:۵۶، ۱۸:۵۷، ۱۸:۵۸، ۱۸:۵۹، ۱۸:۶۰، ۱۸:۶۱، ۱۸:۶۲، ۱۸:۶۳، ۱۸:۶۴، ۱۸:۶۵، ۱۸:۶۶، ۱۸:۶۷، ۱۸:۶۸، ۱۸:۶۹، ۱۸:۷۰، ۱۸:۷۱، ۱۸:۷۲، ۱۸:۷۳، ۱۸:۷۴، ۱۸:۷۵، ۱۸:۷۶، ۱۸:۷۷، ۱۸:۷۸، ۱۸:۷۹، ۱۸:۸۰، ۱۸:۸۱، ۱۸:۸۲، ۱۸:۸۳، ۱۸:۸۴، ۱۸:۸۵، ۱۸:۸۶، ۱۸:۸۷، ۱۸:۸۸، ۱۸:۸۹، ۱۸:۹۰، ۱۸:۹۱، ۱۸:۹۲، ۱۸:۹۳، ۱۸:۹۴، ۱۸:۹۵، ۱۸:۹۶، ۱۸:۹۷، ۱۸:۹۸، ۱۸:۹۹، ۱۸:۱۰۰، ۱۸:۱۰۱، ۱۸:۱۰۲، ۱۸:۱۰۳، ۱۸:۱۰۴، ۱۸:۱۰۵، ۱۸:۱۰۶، ۱۸:۱۰۷، ۱۸:۱۰۸، ۱۸:۱۰۹، ۱۸:۱۱۰، ۱۸:۱۱۱، ۱۸:۱۱۲، ۱۸:۱۱۳، ۱۸:۱۱۴، ۱۸:۱۱۵، ۱۸:۱۱۶، ۱۸:۱۱۷، ۱۸:۱۱۸، ۱۸:۱۱۹، ۱۸:۱۲۰، ۱۸:۱۲۱، ۱۸:۱۲۲، ۱۸:۱۲۳، ۱۸:۱۲۴، ۱۸:۱۲۵، ۱۸:۱۲۶، ۱۸:۱۲۷، ۱۸:۱۲۸، ۱۸:۱۲۹، ۱۸:۱۳۰، ۱۸:۱۳۱، ۱۸:۱۳۲، ۱۸:۱۳۳، ۱۸:۱۳۴، ۱۸:۱۳۵، ۱۸:۱۳۶، ۱۸:۱۳۷، ۱۸:۱۳۸، ۱۸:۱۳۹، ۱۸:۱۴۰، ۱۸:۱۴۱، ۱۸:۱۴۲، ۱۸:۱۴۳، ۱۸:۱۴۴، ۱۸:۱۴۵، ۱۸:۱۴۶، ۱۸:۱۴۷، ۱۸:۱۴۸، ۱۸:۱۴۹، ۱۸:۱۵۰، ۱۸:۱۵۱، ۱۸:۱۵۲، ۱۸:۱۵۳، ۱۸:۱۵۴، ۱۸:۱۵۵، ۱۸:۱۵۶، ۱۸:۱۵۷، ۱۸:۱۵۸، ۱۸:۱۵۹، ۱۸:۱۶۰، ۱۸:۱۶۱، ۱۸:۱۶۲، ۱۸:۱۶۳، ۱۸:۱۶۴، ۱۸:۱۶۵، ۱۸:۱۶۶، ۱۸:۱۶۷، ۱۸:۱۶۸، ۱۸:۱۶۹، ۱۸:۱۷۰، ۱۸:۱۷۱، ۱۸:۱۷۲، ۱۸:۱۷۳، ۱۸:۱۷۴، ۱۸:۱۷۵، ۱۸:۱۷۶، ۱۸:۱۷۷، ۱۸:۱۷۸، ۱۸:۱۷۹، ۱۸:۱۸۰، ۱۸:۱۸۱، ۱۸:۱۸۲، ۱۸:۱۸۳، ۱۸:۱۸۴، ۱۸:۱۸۵، ۱۸:۱۸۶، ۱۸:۱۸۷، ۱۸:۱۸۸، ۱۸:۱۸۹، ۱۸:۱۹۰، ۱۸:۱۹۱، ۱۸:۱۹۲، ۱۸:۱۹۳، ۱۸:۱۹۴، ۱۸:۱۹۵، ۱۸:۱۹۶، ۱۸:۱۹۷، ۱۸:۱۹۸، ۱۸:۱۹۹، ۱۸:۲۰۰، ۱۸:۲۰۱، ۱۸:۲۰۲، ۱۸:۲۰۳، ۱۸:۲۰۴، ۱۸:۲۰۵، ۱۸:۲۰۶، ۱۸:۲۰۷، ۱۸:۲۰۸، ۱۸:۲۰۹، ۱۸:۲۱۰، ۱۸:۲۱۱، ۱۸:۲۱۲، ۱۸:۲۱۳، ۱۸:۲۱۴، ۱۸:۲۱۵، ۱۸:۲۱۶، ۱۸:۲۱۷، ۱۸:۲۱۸، ۱۸:۲۱۹، ۱۸:۲۲۰، ۱۸:۲۲۱، ۱۸:۲۲۲، ۱۸:۲۲۳، ۱۸:۲۲۴، ۱۸:۲۲۵، ۱۸:۲۲۶، ۱۸:۲۲۷، ۱۸:۲۲۸، ۱۸:۲۲۹، ۱۸:۲۳۰، ۱۸:۲۳۱، ۱۸:۲۳۲، ۱۸:۲۳۳، ۱۸:۲۳۴، ۱۸:۲۳۵، ۱۸:۲۳۶، ۱۸:۲۳۷، ۱۸:۲۳۸، ۱۸:۲۳۹، ۱۸:۲۴۰، ۱۸:۲۴۱، ۱۸:۲۴۲، ۱۸:۲۴۳، ۱۸:۲۴۴، ۱۸:۲۴۵، ۱۸:۲۴۶، ۱۸:۲۴۷، ۱۸:۲۴۸، ۱۸:۲۴۹، ۱۸:۲۵۰، ۱۸:۲۵۱، ۱۸:۲۵۲، ۱۸:۲۵۳، ۱۸:۲۵۴، ۱۸:۲۵۵، ۱۸:۲۵۶، ۱۸:۲۵۷، ۱۸:۲۵۸، ۱۸:۲۵۹، ۱۸:۲۶۰، ۱۸:۲۶۱، ۱۸:۲۶۲، ۱۸:۲۶۳، ۱۸:۲۶۴، ۱۸:۲۶۵، ۱۸:۲۶۶، ۱۸:۲۶۷، ۱۸:۲۶۸، ۱۸:۲۶۹، ۱۸:۲۷۰، ۱۸:۲۷۱، ۱۸:۲۷۲، ۱۸:۲۷۳، ۱۸:۲۷۴، ۱۸:۲۷۵، ۱۸:۲۷۶، ۱۸:۲۷۷، ۱۸:۲۷۸، ۱۸:۲۷۹، ۱۸:۲۸۰، ۱۸:۲۸۱، ۱۸:۲۸۲، ۱۸:۲۸۳، ۱۸:۲۸۴، ۱۸:۲۸۵، ۱۸:۲۸۶، ۱۸:۲۸۷، ۱۸:۲۸۸، ۱۸:۲۸۹، ۱۸:۲۹۰، ۱۸:۲۹۱، ۱۸:۲۹۲، ۱۸:۲۹۳، ۱۸:۲۹۴، ۱۸:۲۹۵، ۱۸:۲۹۶، ۱۸:۲۹۷، ۱۸:۲۹۸، ۱۸:۲۹۹، ۱۸:۳۰۰، ۱۸:۳۰۱، ۱۸:۳۰۲، ۱۸:۳۰۳، ۱۸:۳۰۴، ۱۸:۳۰۵، ۱۸:۳۰۶، ۱۸:۳۰۷، ۱۸:۳۰۸، ۱۸:۳۰۹، ۱۸:۳۱۰، ۱۸:۳۱۱، ۱۸:۳۱۲، ۱۸:۳۱۳، ۱۸:۳۱۴، ۱۸:۳۱۵، ۱۸:۳۱۶، ۱۸:۳۱۷، ۱۸:۳۱۸، ۱۸:۳۱۹، ۱۸:۳۲۰، ۱۸:۳۲۱، ۱۸:۳۲۲، ۱۸:۳۲۳، ۱۸:۳۲۴، ۱۸:۳۲۵، ۱۸:۳۲۶، ۱۸:۳۲۷، ۱۸:۳۲۸، ۱۸:۳۲۹، ۱۸:۳۳۰، ۱۸:۳۳۱، ۱۸:۳۳۲، ۱۸:۳۳۳، ۱۸:۳۳۴، ۱۸:۳۳۵، ۱۸:۳۳۶، ۱۸:۳۳۷، ۱۸:۳۳۸، ۱۸:۳۳۹، ۱۸:۳۴۰، ۱۸:۳۴۱، ۱۸:۳۴۲، ۱۸:۳۴۳، ۱۸:۳۴۴، ۱۸:۳۴۵، ۱۸:۳۴۶، ۱۸:۳۴۷، ۱۸:۳۴۸، ۱۸:۳۴۹، ۱۸:۳۵۰، ۱۸:۳۵۱، ۱۸:۳۵۲، ۱۸:۳۵۳، ۱۸:۳۵۴، ۱۸:۳۵۵، ۱۸:۳۵۶، ۱۸:۳۵۷، ۱۸:۳۵۸، ۱۸:۳۵۹، ۱۸:۳۶۰، ۱۸:۳۶۱، ۱۸:۳۶۲، ۱۸:۳۶۳، ۱۸:۳۶۴، ۱۸:۳۶۵، ۱۸:۳۶۶، ۱۸:۳۶۷، ۱۸:۳۶۸، ۱۸:۳۶۹، ۱۸:۳۷۰، ۱۸:۳۷۱، ۱۸:۳۷۲، ۱۸:۳۷۳، ۱۸:۳۷۴، ۱۸:۳۷۵، ۱۸:۳۷۶، ۱۸:۳۷۷، ۱۸:۳۷۸، ۱۸:۳۷۹، ۱۸:۳۸۰، ۱۸:۳۸۱، ۱۸:۳۸۲، ۱۸:۳۸۳، ۱۸:۳۸۴، ۱۸:۳۸۵، ۱۸:۳۸۶، ۱۸:۳۸۷، ۱۸:۳۸۸، ۱۸:۳۸۹، ۱۸:۳۹۰، ۱۸:۳۹۱، ۱۸:۳۹۲، ۱۸:۳۹۳، ۱۸:۳۹۴، ۱۸:۳۹۵، ۱۸:۳۹۶، ۱۸:۳۹۷، ۱۸:۳۹۸، ۱۸:۳۹۹، ۱۸:۴۰۰، ۱۸:۴۰۱، ۱۸:۴۰۲، ۱۸:۴۰۳، ۱۸:۴۰۴، ۱۸:۴۰۵، ۱۸:۴۰۶، ۱۸:۴۰۷، ۱۸:۴۰۸، ۱۸:۴۰۹، ۱۸:۴۱۰، ۱۸:۴۱۱، ۱۸:۴۱۲، ۱۸:۴۱۳، ۱۸:۴۱۴، ۱۸:۴۱۵، ۱۸:۴۱۶، ۱۸:۴۱۷، ۱۸:۴۱۸، ۱۸:۴۱۹، ۱۸:۴۲۰، ۱۸:۴۲۱، ۱۸:۴۲۲، ۱۸:۴۲۳، ۱۸:۴۲۴، ۱۸:۴۲۵، ۱۸:۴۲۶، ۱۸:۴۲۷، ۱۸:۴۲۸، ۱۸:۴۲۹، ۱۸:۴۳۰، ۱۸:۴۳۱، ۱۸:۴۳۲، ۱۸:۴۳۳، ۱۸:۴۳۴، ۱۸:۴۳۵، ۱۸:۴۳۶، ۱۸:۴۳۷، ۱۸:۴۳۸، ۱۸:۴۳۹، ۱۸:۴۴۰، ۱۸:۴۴۱، ۱۸:۴۴۲، ۱۸:۴۴۳، ۱۸:۴۴۴، ۱۸:۴۴۵، ۱۸:۴۴۶، ۱۸:۴۴۷، ۱۸:۴۴۸، ۱۸:۴۴۹، ۱۸:۴۵۰، ۱۸:۴۵۱، ۱۸:۴۵۲، ۱۸:۴۵۳، ۱۸:۴۵۴، ۱۸:۴۵۵، ۱۸:۴۵۶، ۱۸:۴۵۷، ۱۸:۴۵۸، ۱۸:۴۵۹، ۱۸:۴۶۰، ۱۸:۴۶۱، ۱۸:۴۶۲، ۱۸:۴۶۳، ۱۸:۴۶۴، ۱۸:۴۶۵، ۱۸:۴۶۶، ۱۸:۴۶۷، ۱۸:۴۶۸، ۱۸:۴۶۹، ۱۸:۴۷۰، ۱۸:۴۷۱، ۱۸:۴۷۲، ۱۸:۴۷۳، ۱۸:۴۷۴، ۱۸:۴۷۵، ۱۸:۴۷۶، ۱۸:۴۷۷، ۱۸:۴۷۸، ۱۸:۴۷۹، ۱۸:۴۸۰، ۱۸:۴۸۱، ۱۸:۴۸۲، ۱۸:۴۸۳، ۱۸:۴۸۴، ۱۸:۴۸۵، ۱۸:۴۸۶، ۱۸:۴۸۷، ۱۸:۴۸۸، ۱۸:۴۸۹، ۱۸:۴۹۰، ۱۸:۴۹۱، ۱۸:۴۹۲، ۱۸:۴۹۳، ۱۸:۴۹۴، ۱۸:۴۹۵، ۱۸:۴۹۶، ۱۸:۴۹۷، ۱۸:۴۹۸، ۱۸:۴۹۹، ۱۸:۵۰۰، ۱۸:۵۰۱، ۱۸:۵۰۲، ۱۸:۵۰۳، ۱۸:۵۰۴، ۱۸:۵۰۵، ۱۸:۵۰۶، ۱۸:۵۰۷، ۱۸:۵۰۸، ۱۸:۵۰۹، ۱۸:۵۱۰، ۱۸:۵۱۱، ۱۸:۵۱۲، ۱۸:۵۱۳، ۱۸:۵۱۴، ۱۸:۵۱۵، ۱۸:۵۱۶، ۱۸:۵۱۷، ۱۸:۵۱۸، ۱۸:۵۱۹، ۱۸:۵۲۰، ۱۸:۵۲۱، ۱۸:۵۲۲، ۱۸:۵۲۳، ۱۸:۵۲۴، ۱۸:۵۲۵، ۱۸:۵۲۶، ۱۸:۵۲۷، ۱۸:۵۲۸، ۱۸:۵۲۹، ۱۸:۵۳۰، ۱۸:۵۳۱، ۱۸:۵۳۲، ۱۸:۵۳۳، ۱۸:۵۳۴، ۱۸:۵۳۵، ۱۸:۵۳۶، ۱۸:۵۳۷، ۱۸:۵۳۸، ۱۸:۵۳۹، ۱۸:۵۴۰، ۱۸:۵۴۱، ۱۸:۵۴۲، ۱۸:۵۴۳، ۱۸:۵۴۴، ۱۸:۵۴۵، ۱۸:۵۴۶، ۱۸:۵۴۷، ۱۸:۵۴۸، ۱۸:۵۴۹، ۱۸:۵۵۰، ۱۸:۵۵۱، ۱۸:۵۵۲، ۱۸:۵۵۳، ۱۸:۵۵۴، ۱۸:۵۵۵، ۱۸:۵۵۶، ۱۸:۵۵۷، ۱۸:۵۵۸، ۱۸:۵۵۹، ۱۸:۵۶۰، ۱۸:۵۶۱، ۱۸:۵۶۲، ۱۸:۵۶۳، ۱۸:۵۶۴، ۱۸:۵۶۵، ۱۸:۵۶۶، ۱۸:۵۶۷، ۱۸:۵۶۸، ۱۸:۵۶۹، ۱۸:۵۷۰، ۱۸:۵۷۱، ۱۸:۵۷۲، ۱۸:۵۷۳، ۱۸:۵۷۴، ۱۸:۵۷۵، ۱۸:۵۷۶، ۱۸:۵۷۷، ۱۸:۵۷۸، ۱۸:۵۷۹، ۱۸:۵۸۰، ۱۸:۵۸۱، ۱۸:۵۸۲، ۱۸:۵۸۳، ۱۸:۵۸۴، ۱۸:۵۸۵، ۱۸:۵۸۶، ۱۸:۵۸۷، ۱۸:۵۸۸، ۱۸:۵۸۹، ۱۸:۵۹۰، ۱۸:۵۹۱، ۱۸:۵۹۲، ۱۸:۵۹۳، ۱۸:۵۹۴، ۱۸:۵۹۵، ۱۸:۵۹۶، ۱۸:۵۹۷، ۱۸:۵۹۸، ۱۸:۵۹۹، ۱۸:۶۰۰، ۱۸:۶۰۱، ۱۸:۶۰۲، ۱۸:۶۰۳، ۱۸:۶۰۴، ۱۸:۶۰۵، ۱۸:۶۰۶، ۱۸:۶۰۷، ۱۸:۶۰۸، ۱۸:۶۰۹، ۱۸:۶۱۰، ۱۸:۶۱۱، ۱۸:۶۱۲، ۱۸:۶۱۳، ۱۸:۶۱۴، ۱۸:۶۱۵، ۱۸:۶۱۶، ۱۸:۶۱۷، ۱۸:۶۱۸، ۱۸:۶۱۹، ۱۸:۶۲۰، ۱۸:۶۲۱، ۱۸:۶۲۲، ۱۸:۶۲۳، ۱۸:۶۲۴، ۱۸:۶۲۵، ۱۸:۶۲۶، ۱۸:۶۲۷، ۱۸:۶۲۸، ۱۸:۶۲۹، ۱۸:۶۳۰، ۱۸:۶۳۱، ۱۸:۶۳۲، ۱۸:۶۳۳، ۱۸:۶۳۴، ۱۸:۶۳۵، ۱۸:۶۳۶، ۱۸:۶۳۷، ۱۸:۶۳۸، ۱۸:۶۳۹، ۱۸:۶۴۰، ۱۸:۶۴۱، ۱۸:۶۴۲، ۱۸:۶۴۳، ۱۸:۶۴۴، ۱۸:۶۴۵، ۱۸:۶۴۶، ۱۸:۶۴۷، ۱۸:۶۴۸، ۱۸:۶۴۹، ۱۸:۶۵۰، ۱۸:۶۵۱، ۱۸:۶۵۲، ۱۸:۶۵۳، ۱۸:۶۵۴، ۱۸:۶۵۵، ۱۸:۶۵۶، ۱۸:۶۵۷، ۱۸:۶۵۸، ۱۸:۶۵۹، ۱۸:۶۶۰، ۱۸:۶۶۱، ۱۸:۶۶۲، ۱۸:۶۶۳، ۱۸:۶۶۴، ۱۸:۶۶۵، ۱۸:۶۶۶، ۱۸:۶۶۷، ۱۸:۶۶۸، ۱۸:۶۶۹، ۱۸:۶۷۰، ۱۸:۶۷۱، ۱۸:۶۷۲، ۱۸:۶۷۳، ۱۸:۶۷۴، ۱۸:۶۷۵، ۱۸:۶۷۶، ۱۸:۶۷۷، ۱۸:۶۷۸، ۱۸:۶۷۹، ۱۸:۶۸۰، ۱۸:۶۸۱، ۱۸:۶۸۲، ۱۸:۶۸۳، ۱۸:۶۸۴، ۱۸:۶۸۵، ۱۸:۶۸۶، ۱۸:۶۸۷، ۱۸:۶۸۸، ۱۸:۶۸۹، ۱۸:۶۹۰، ۱۸:۶۹۱، ۱۸:۶۹۲، ۱۸:۶۹۳، ۱۸:۶۹۴، ۱۸:۶۹۵، ۱۸:۶۹۶، ۱۸:۶۹۷، ۱۸:۶۹۸، ۱۸:۶۹۹، ۱۸:۷۰۰، ۱۸:۷۰۱، ۱۸:۷۰۲، ۱۸:۷۰۳، ۱۸:۷۰۴، ۱۸:۷۰۵، ۱۸:۷۰۶، ۱۸:۷۰۷، ۱۸:۷۰۸، ۱۸:۷۰۹، ۱۸:۷۱۰، ۱۸:۷۱۱، ۱۸:۷۱۲، ۱۸:۷۱۳، ۱۸:۷۱۴، ۱۸:۷۱۵، ۱۸:۷۱۶، ۱۸:۷۱۷، ۱۸:۷۱۸، ۱۸:۷۱۹، ۱۸:۷۲۰، ۱۸:۷۲۱، ۱۸:۷۲۲، ۱۸:۷۲۳، ۱۸:۷۲۴، ۱۸:۷۲۵، ۱۸:۷۲۶، ۱۸:۷۲۷، ۱۸:۷۲۸، ۱۸:۷۲۹، ۱۸:۷۳۰، ۱۸:۷۳۱، ۱۸:۷۳۲، ۱۸:۷۳۳، ۱۸:۷۳۴، ۱۸:۷۳۵، ۱۸:۷۳۶، ۱۸:۷۳۷، ۱۸:۷۳۸، ۱۸:۷۳۹، ۱۸:۷۴۰، ۱۸:۷۴۱، ۱۸:۷۴۲، ۱۸:۷۴۳، ۱۸:۷۴۴، ۱۸:۷۴۵، ۱۸:۷۴۶، ۱۸:۷۴۷، ۱۸:۷۴۸، ۱۸:۷۴۹، ۱۸:۷۵۰، ۱۸:۷۵۱، ۱۸:۷۵۲، ۱۸:۷۵۳، ۱۸:۷۵۴، ۱۸:۷۵۵، ۱۸:۷۵۶، ۱۸:۷۵۷، ۱۸:۷۵۸، ۱۸:۷۵۹، ۱۸:۷۶۰، ۱۸:۷۶۱، ۱۸:۷۶۲، ۱۸:۷۶۳، ۱۸:۷۶۴، ۱۸:۷۶۵، ۱۸:۷۶۶، ۱۸:۷۶۷، ۱۸:۷۶۸، ۱۸:۷۶۹، ۱۸:۷۷۰، ۱۸:۷۷۱، ۱۸:۷۷۲، ۱۸:۷۷۳، ۱۸:۷۷۴، ۱۸:۷۷۵، ۱۸:۷۷۶، ۱۸:۷۷۷، ۱۸:۷۷۸، ۱۸:۷۷۹، ۱۸:۷۸۰، ۱۸:۷۸۱، ۱۸:۷۸۲، ۱۸:۷۸۳، ۱۸:۷۸۴، ۱۸:۷۸۵، ۱۸:۷۸۶، ۱۸:۷۸۷، ۱۸:۷۸۸، ۱۸:۷۸۹، ۱۸:۷۹۰، ۱۸:۷۹۱، ۱۸:۷۹۲، ۱۸:۷۹۳، ۱۸:۷۹۴، ۱۸:۷۹۵، ۱۸:۷۹۶، ۱۸:۷۹۷، ۱۸:۷۹۸، ۱۸:۷۹۹، ۱۸:۸۰۰، ۱۸:۸۰۱، ۱۸:۸۰۲، ۱۸:۸۰۳، ۱۸:۸۰۴، ۱۸:۸۰۵، ۱۸:۸۰۶، ۱۸:۸۰۷، ۱۸:۸۰

2. AlZahal, O., Odongo, N. E., Mustvangwa, T., Or-Rashid, M.M., Duffield, T.F., Bagg, R., Dick, P., Vessie, G. & McBride, B.W. (2008). Effect of monensin and dietary soybeans oil on milk fat percentage and milk fatty acid profile in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91, 1166-1174.
3. Association of Official Analytical Chemists. (2000) *Official Methods of Analysis*. (17<sup>th</sup> ed.). AOAC International, Arlington, VA.
4. Benchaar, C., Petit, H. V., Berthiaume, R., Whyte, T. D. & Chouinard, P. Y. (2006). Effects of addition of essential oils and monensin premix on digestion, ruminal fermentation, milk production, and milk composition in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 4352-4364.
5. Bergen, W.G. & Bates, D.B. (1984). Ionophores: their effect on production efficiency mode of action. *Journal of Animal Science*, 58, 1465-1483.
6. Bauman, D. E. & Griinari, J. M. (2001). Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat syndrome. *Livestock Production Science*, 70, 15-29.
7. Baumgard, L.H., Corl, B.A., Dwyer, D.A. & Bauman, D. (2000). Identification of CLA isomer that inhibits milk fat synthesis. *American Journal of Physiology*, 278, R179-R184.
8. Canadian Food Inspection Agency. (2011). *Compendium of medicating ingredient brochures*. Retrieved January 24, 2013, from: <http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/medicating-ingredients/mib/mib-57/eng/1331053867503/1331053926592S>.
9. Griinari, J.M., Corl, B. A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K V. & Bauman, D.E. (2000). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta$ -9 desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.
10. Baumgard, L.H., Matitashvili, E., Corl, B.A. & Bauman, D.E. (2002). Trans-10, Cis-12 CLA decreases lipogenic rates and expression of genes involved in milk lipid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 85, 2155-2163.
11. Castillo, C., Beneditio, J. L., Méndez, J., Pereira, V., López-Alonso M., Miranda, M. & Hernández, J. (2004). Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 115, 101-116.
12. Carro, M. D. & Ranilla, M. J. (2003). Effect of the addition of malate on in vitro rumen fermentation of cereal grains. *British Journal of Nutrition*, 89, 181-188.
13. Duffield, T.F. & Bagg, R.N. (2000). Use of ionophores in lactating dairy cattle: A review. *Canadian Veterinary Journal*, 41, 388-394.
14. da Silva, D. C., Santos, G. T., Branco, A. F., Damasceno, J. C., Kazama, R., Matsushita, M., Horst, J. A., Dassantos, W. B. R. & Petit, H. V. (2007). Production performance and milk composition of dairy cows fed whole or ground flaxseed with or without Monensin. *Journal of Dairy Science*, 90, 2928-2936.
15. Fairfield, A. M., Plaizier, J. C., Duffield, T. F., Lindinger, M. I., Bagg, R., Dick, P. & McBride, B. W. (2007). Effects of prepartum administration of a monensin controlled release capsule on rumen pH, feed intake and milk production of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 937-945.
16. Fatahnia, F., Rowghani, E., Hosseini, A. R., Darmani Kohi, H. & Zamiri, M. J. (2010). Effect of different level of monensin in diets containing whole cottonseed on milk production and composition of lactating dairy cows. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 11, 206-213.
17. Fellner, V., Sauer, F.D. & Kramer, K.G. (1997). Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *Journal of Dairy Science*, 80, 921-928.
18. Foley, P.A., Kenny, D.A., Lovett, D.K., Callan, J.J., Boland, T.M. & O'Mara, F.P. (2009). Effect of nigericin, monensin, and tetronasin on biohydrogenation in continuous flow-through ruminal fermenters. *Journal of Dairy Science*, 92, 3258-3264.
19. Gehman, A.M., Kononoff, P.J., Mullins, C.R. & Janicek, B.N. (2008). Evaluation of nitrogen utilization and the effects of monensin in dairy cows fed brown midrib corn silage. *Journal of Dairy Science*, 91, 288-300.
20. Ghorbani, B., Ghoorch, T., Amanlou, H. & Zerehdaran, S. (2011). Effects of using monensin and different levels of crude protein on milk production, blood metabolites and digestion of dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 24, 65-72.
21. Gonzalez-Momita, M.L., Kawas, J.R., Garcia-Castillo, R., Gonzalez-Morteo, C., Aguirre-Ortega, J., Hernandez-Vidal, G., Fimbres-Durazo, H., Picon-Rubio, F.J. & Lu, C.D. (2009). Nutrient intake, digestibility, mastication and ruminal fermentation of Pelibuey lambs fed finishing diets with ionophore (monensin or lasalocid) and sodium malate. *Small Ruminant Research*, 83, 1-6.
22. Grainger, C., Auldist, M. J., Clarke, T., Beauchemin, K. A., McGinn, S. M. & Hannah, M. C. (2008). Use of Monensin Controlled-Release Capsules to Reduce Methane Emissions and Improve Milk Production of Dairy Cows Offered Pasture Supplemented with Grain. *Journal of Dairy Science*, 91, 1159-1165.
23. Griinari, J.M., Corl, B.A., Lacy, S.H., Chouinard, P.Y., Nurmela, K.V.V. & Bauman, D.E. (2012). Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by  $\Delta$ <sup>9</sup>-desaturase. *Journal of Nutrition*, 130, 2285-2291.

24. Herna'dez. (2004). Organic acids as a substitute for monensin in diets for beef cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 115, 101-116.
25. Hayes, D. P., Pfeiffer, D. U. & Williamson, N. B. (1996). Effect of intraruminal monensin capsule on reproductive performance and milk production of dairy cows fed pasture. *J. Dairy Sci*, 79, 1000-1006.
26. Ipharraguerre, I. & Jimmy Clark, H. (2003). Usefulness of ionophores for lactating dairy cows: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 39-57.
27. Jenkins, T.C. (1993). Lipid metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 76, 3851-3863.
28. Juchem, S.O., Santos, F.A.P., Imaizumi, H., Pires, A.V. & Barnabe, E.C. (2004). Production and blood parameters of Holstein cows treated prepartum with sodium monensin or propylene glycol. *Journal of Dairy Science*, 87, 680-689.
29. Khodamoradi, S.H., Fatahnia, F., Taherpour, K., Pirani, V., Rashidi, L. & Azarfar, A. (2013). Effect of monensin and vitamin E on milk production and composition of lactating dairy cows. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97, 666-674.
30. Mansbridge, R.J. & Blake, J.S. (1997). Nutritional factors affecting the fatty acid composition of bovine milk. *British Journal of Nutrition*, 78 (Suppl. 1), S37-S47.
31. Martin, S.A., Streeter, M.N., Nisbet, D.J., Hill, G.M. & Williams, S.E. (1999). Effects of DL-malate on ruminal metabolism and performance of cattle fed a high-concentrate diet. *Journal of Animal Science*, 77, 1008-1015.
32. Martineau, R., Benchaar, C., Petit, H. V., Lapierre, H., Ouellet, D. R., Pellerin, D. & Berthiaume, R. (2007). Effect of lasalosis or monensin supplementation on digestion, ruminal fermentation, blood metabolites, and milk production of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 5714-5725.
33. Martinez, C. M., Chung, Y. H., Ishler, V. A., Bailey, K. M. & Varga, G. A. (2009). Effects of dietary forage level and monensin on lactation performance, digestibility and fecal excretion of nutrients, and efficiency of feed nitrogen utilization of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 3211-3221.
34. Mc Geough, E.L., Okiely, P. & Kenny, D.A. (2010). A note on the evaluation of the acid-insoluble ash technique as a method for determining apparent diet digestibility in beef cattle. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, 49, 159-164.
35. McGuffey, R.K., Richardson, L.F. & Wilkinson, J.D. (2001). Ionophores for dairy cattle: Current status and future outlook. *Journal of Dairy Science*, 84, E194-E203.
36. Mullins, C.R., Mamedova, L.K., Brouk, M.J., Moore, C.E., Green, H.B., Perfield, K.L., Smith, J.F., Harner, J.P. & Bradford, B.J. (2012). Effects of monensin on metabolic parameters, feeding behavior, and productivity of transition dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95, 1323-1336.
37. Nagaraja, T.G. (1995) Ionophores and antibiotics in ruminants. In R.J. Wallace, A. Chesson (Eds.), *Biotechnology in animal feeding*. A. VCH Publishers, New York. pp: 173-204.
38. National Research Council. (2001). *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. (7<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: National Academy Press.
39. National Research Council. (1996). *Nutrient Requirements of Beef Cattle*. (7<sup>th</sup> ed.). Washington, DC: National Academy Press.
40. Neville, M. C. & Picciano, M. F. (1997). Regulation of milk lipid secretion and composition. *Ann. Rev. Nutr*, 17, 159-184.
41. Odongo, N. E., Or-Rashid, M. M., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Kebreab, E., France, J. & McBride, B.W. (2007). Long-term effect of feeding monensin on milk fatty acid composition in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 90, 5126-5133.
42. O'Mara, F.P., Beauchemin, K.A., Kreuzer, M. & McAllister, T.A. (2008). Reduction of greenhouse gas emissions of ruminants through nutritional strategies. In: *Proceedings of British Society of Animal Science, International Conference, Livestock and Global Climate Change*. pp 40-43.
43. Palmquist, D.L. & Beaulieu, A.D. (1993). Feed and animal factors influencing milk fat composition. *Journal of Dairy Science*, 76, 1753-1771.
44. Phipps, R. H., Wilkinson, J. I. D., Jonker, L. J., Tarrant, M., Jones, A. K. & Hodge, A. (2000). Effect of monensin on milk production of Holstein-Friesian dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 83, 2789-2794.
45. Plaizier, J.C., Krause, D.O. Gozho, G.N. & McBride, B.W. (2009). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Veterinary Journal*, 176, 21-31.
46. Qui, X., Estridge, M.L., Firkins, J.L. (2004). Effects of dry matter intake, addition of buffer and source of fat on duodenal flow and concentration of conjugated linoleic acid and trans-11 C18:1 in milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 4278-4286.
47. Reveneau, C., Karnati, S.K.R., Oelker, E.R. & Firkins, J.L. (2012). Interaction of unsaturated fat or coconut oil with monensin in lactating dairy cows fed 12 times daily. I. Protozoal abundance, nutrient digestibility, and microbial protein flow to the omasum. *Journal of Dairy Science*, 95, 2046-2060.
48. Ruiz, R., Albrecht, G. L., Tedeschi, L. O., Jarvis, G., Russell, J. B. & Fox, D. G. (2001). Effect of monensin on the performance and nitrogen utilization of lactating dairy cows consuming fresh forage. *Journal of Dairy Science*, 84, 1717-1727.

49. SAS. (2003). *User's Guide: Statistics*. Version 9.2 Edition. SAS Inst., Inc., Cary, North Carolina.
50. Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Dann, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M. & Martin, S.A. (2006). Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 13-31.
51. Tyrrell, H.F. & Reid, J.T. (1965). Prediction of the energy value of cow milk. *Journal of Dairy Science*, 48, 1215-1223.
52. Turpeinen, A.M., Mutanen, M., Antti, A., Salminen, I., Basu, S., Palmquist, D.L., Griinari, J.M., 2002. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 75, 504-510.
53. Sniffen, C.J., Ballard, C.S., Carter, M.P., Cotanch, K.W., Dann, H.M., Grant, R.J., Mandebvu, P., Suekawa, M. & Martin, S.A. (2006). Effects of malic acid on microbial efficiency and metabolism in continuous culture of rumen contents and on performance of mid-lactation dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 127, 13-31.
54. Van Nevel, C.J. & Demeyer, D.I. (1995). Lipolysis and biohydrogenation of soybean oil in the rumen in vitro: inhibition by antimicrobials. *Journal of Dairy Science*, 78, 2797-2806.
55. Van Soest, P. J., Robertson, J. B. & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597.
56. Van der werf, J. H. J., Jonker, L., Jonker, J. & Oldenbroek, J. K. (1998). Effect of monensin on milk production by Holsten and Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 81, 427- 438.
57. Yu, C.W., Chen, Y.S., Cheng, Y.H., Cheng, Y.S., Yang, C.M. & Chang, C.T. (2010) Effects of fumarate on ruminal ammonia accumulation and fiber digestion in vitro and nutrient utilization in dairy does. *Journal of Dairy Science*, 93, 701-710.
58. van Zijderveld, S.M., Fonken, B., Dijkstra, J., Gerrits, W.J.J., Perdok, H.B. Fokink, W. & Newbold, J.R. (2011). Effects of a combination of feed additives on methane production, diet digestibility, and animal performance in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 94, 1445-1454.

## Effects of monensin supplementation alone or in combination with Methafix on nutrient digestibility, milk production and composition of milking Holstein cows

Ahmad Ghasemi<sup>1</sup>, Arash Azarfar<sup>2\*</sup>, Ali Kiani<sup>3</sup> and Heshmatolah Khosravinia<sup>4</sup>

1, 2, 3, 4. M. Sc. Student, Associate Professor, Assistant Professor and Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoram Abad, Iran

(Received: Jan. 14, 2015 - Accepted: Nov. 21, 2015)

### ABSTRACT

This study was conducted to evaluate the effect of supplementing diets of milking cows monensin supplementation alone or in combination with Methafix (a commercial product containing malate and fumarate) on nutrient digestibility, milk production and composition and milk fatty acids profile. Using four multiparous Holstein milking cows ( $657 \pm 12$  kg of live weight;  $133 \pm 41$  days in milk) in a Latin square design. The cows were randomly assigned to one of the four dietary treatments. The first treatment was the control diet (C), second was control diet supplemented with 24 mg of monensin/kg of DM (M), the third was control diet supplemented with 5 g of Methafix/kg DM (ME) and the fourth treatment was C diet supplemented with 24 mg of monensin in combination with 5 g of Methafix/kg DM (MM). Dietary supplementation with Monensin alone or in combination with Methafix significantly decreased dry matter intake ( $P < 0.05$ ), while the intake of crude protein (CP), neutral detergent fiber (NDF) and non-fiber carbohydrates (NFC) were not affected. The digestibility of organic matter (OM) and CP were significantly lower in M and MM-fed cows than the other cow ( $P < 0.05$ ). Total tract apparent digestibility of NDF and NFC were lowest in the cows fed with MM diet. Dietary treatments had no effect on fat and energy corrected milk production, milk fat, protein and lactose concentrations, utilization efficiency of N and NEL ( $P > 0.05$ ). Utilization efficiency of dry matter for milk production was higher in monensin and Methafix-supplemented cows than in control cows ( $P < 0.05$ ). Supplementing milking cow rations with monensin alone or in combination with Methafix significantly ( $P < 0.05$ ) increased milk fat concentration of conjugated linoleic acid (*cis*9, *trans*11). In conclusion, the results of this study showed that supplementing mid-lactating cows with monensin or Methafix would increase milk yield, but had no effect on milk components. Dietary supplementation of milking cows with monensin and Methafix alone or together had no effect on majority of milk fatty acids, but elevated milk concentration of conjugated linoleic acid (*cis*-9, *trans* 11).

**Keywords:** methafix, milk production, milk fatty acids profile, monensin.