

SLF-projekt V1230042: V1330052: Analys av proteinnedbrytning in vitro med H<sub>2</sub>S som markör

Preliminär slutrapport 2016-06-30

Sökande: Torsten Eriksson och Bengt-Ove Rustas

*Detta är en preliminär slutrapport som bara presenterar mindre delar av resultaten. Kompletterande analyser kommer att göras under augusti-september 2016 för att kunna tolka och presentera huvuddelen av resultaten i en komplett slutrapport senast 1 oktober 2016.*

## Bakgrund

Foderproteinets vombrytning är en hörnsten i fodervärderingssystem för idisslare. Den mätmetod som oftast används är in sacco-tekniken där ett foderprov inkuberas i finmaskiga påsar i vommen och kvarvarande proteinmängd bestäms vid ett antal tidsintervall. Därifrån beräknas effektiv vombrytbarhet – EPD – (AAT-/PBV-systemet, Madsen, 1985) eller nedbrytningshastighet och potentiell vombrytbarhet (CNCPS, Fox m fl., 2004; Norfor, Volden, 2011). In sacco-metoden är behäftad med svagheten att protein som försvunnit ur påsen betraktas som nedbrutet. Det gör att protein som är lösligt klassas som direkt nedbrutet. I många av de hemmaproducerade proteinfoder, som kan odlas i Norden, är större delen av råproteinet lösligt men i form av äkta protein. Det gäller kallpressad rapskaka och baljväxter som ärter, lupiner och åkerbönor (Hedqvist & Udén, 2006; Udén & Eriksson, 2012). Den lösliga delen av foderproteinets kan inte värderas med in sacco-metoden utan får i NorFor-systemet en schablonmässig nedbrytningshastighet. Också vallfodrets proteinvärde kan vara svårt att fånga in. Förtorkning före ensilering kan minska andelen lösligt protein dramatiskt (Eriksson m fl., 2009) och det samma gäller kraftig syratillsats (Jaakkola m fl., 2006). Nedbrytningshastigheten för detta protein är dock sannolikt så hög (Huhtanen m. fl., 2008) att den är svår att fånga upp med in sacco-tekniken. In sacco tekniken är dessutom dyr – en analys kostar mellan 5 000kr – 10 000kr beroende på vilka komponenter som tas med i analysen.

För att kunna mäta nedbrytningshastighet av protein som antingen är lösligt eller av andra skäl inte lämpligt för in sacco-tekniken har en rad metoder utvecklats, där svårigheten oftast varit att hitta en markör som väl beskriver proteinnedbrytning. Den inbäddade in vitro-tekniken (Broderick, 1987) bygger på att mikrobproteinsyntesen blockeras så att ammoniak ackumuleras i takt med att foderproteinnedbrytningen fortgår. Det har nackdelen att nedbrytningen också riskerar att hämmas. Hedqvist & Udén (2006) modifierade tekniken genom att ta bort inhibitorerna och istället mäta kvarvarande foderprotein med bicinchoninic acid (BCA), som dock ger avvikande resultat från råproteinanalys med Kjeldahlmetoden. En annan teknik är mätning av total gasproduktion och ammoniakbildning för olika kolhydrattillsatser till ett proteinfoder (Raab m fl, 1983; Karlsson m fl., 2009), vilket gör att det går att extrapolera till vad ammoniakbildning (och därmed proteinnedbrytning) skulle vara utan tillsats. Extrapoleringen gör att metoden blir mycket känslig för bakgrundshalten av ammoniak i vomvätskan.

En förbättrad metod för att beskriva nedbrytningen av framförallt den lösliga proteinfraktionen är alltså mycket angelägen. I Norfor sätts nedbrytningshastigheten för den lösliga delen schablonmässigt till 150% per timme på samtliga fodermedel. Det skall jämföras med värden på mellan 18 och 46% per timme som

uppmättes av Hedqvist & Udén (2006) på linfrökaka, kallpressad rapskaka, lupin och ärter. Inhemska proteinfodermedel som kallpressad raps, ärter och åkerböna innehåller mellan 50 och 70 % lösligt protein, vilket kan jämföras med 13% i sojamjöl och 8% i värmebehandlat rapsmjöl. Den höga andelen lösligt protein, i kombination med den i Norfor höga, antagna, nedbrytningshastigheten för lösligt protein, gör att gårdsproducerade proteinfoder ”straffas ut” och endast kan utgöra en begränsad andel av en optimal foderstat. Om den verkliga nedbrytningshastigheten för lösligt protein ligger på 50% per timme, istället för schablonvärdet 150 % som används i NorFor, blir situationen en helt annan och mer åkerböna skulle passa in i utfodringen (Maria Åkerlind, Svensk Mjolk, personligt meddelande). Resultaten från Hedqvist & Udén (2006) antyder att den lösliga fraktionens nedbrytningshastighet är kraftigt överskattad i Norfor. Det stöds också av det faktum att ekologiska mjölkproducenter ofta har högre avkastning med enbart hemmaproducerade proteinfoder än vad foderstaten beräkningsmässigt borde tillåta.

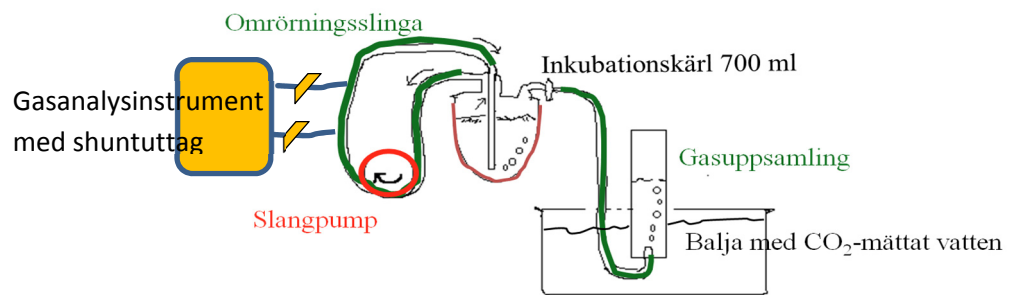
En alternativ metod för att skatta proteinnedbrytning är att mäta produktionen av vätesulfid, H<sub>2</sub>S, som bildas i vommen vid mikrobiell nedbrytning av svavelhaltiga föreningar. Svavel i foder finns främst i proteinfraktionen och där i de svavelhaltiga aminosyrorna metionin och cystein. Vätesulfid bildas i första hand från cystein som ger en snabb och tydlig respons vid inkubering som ren aminosyra (Bird, 1972; Dewhurst m fl., 2007). Vätesulfid som produceras i vommen försvinner snabbt från vomvätskan via diffusion genom vomväggen (Bray och Till, 1975) och avgång till gasfasen (Gould, 1997). En ökning av vätesulfidproduktionen påverkar därför i första hand koncentrationen i vomgaserna. Den korta halveringstiden i vommen gör vätesulfiden till en lämplig markör för snabba nedbrytningsförlopp och därmed för lösligt protein. I ett försök där stöddoser med åkerböna och rapsmjöl gavs till vomfistulerade kor (Eriksson och Rustas, SLF-projekt V1230042) kunde vi se en ökning av vätesulfidkoncentrationen i vomgaserna inom 20 minuter efter utfodring (Figur 1.). Motsvarande resultat har rapporterats från liknande försök med andra fodermedel och rena aminosyror (Fonseca m fl., 2013; Dewhurst m f., 2007). Vi kunde också se att vätesulfidkoncentrationen i vomgaserna blev betydligt högre med rapsmjöl, som innehöll drygt fem gånger så mycket svavel som åkerbönan (Eriksson och Rustas, opublicerat). Rapsmjölet orsakade en betydligt mer utdragen vätesulfidavgång än åkerbönan (Figur 1.) och det skulle kunna förklaras med den högre andelen metionin. Ett stöd för det är de höga halter metylmerkaptan och dimetylsulfid som vi uppmätte efter utfodring av rapsmjölet och som var betydligt högre än med åkerböna. Metionin ger betydligt lägre respons än åkerböna i vätesulfidproduktion men den vätesulfid som produceras avges under längre tid (Bird, 1972). Det beror förmodligen på att metionin metaboliseras på ett mer komplicerat sätt, där såväl metylmerkaptan som dimetylsulfid bildas (Salsbury och Merricks, 1975) och varifrån vätesulfid i sin tur avges (Bird, 1972; Bray och Till, 1975). Vidare fann vi att en högre proteingiva gav högre vätesulfidkoncentration på motsvarande sätt som Dewhurst m fl. (2007) rapporterade om en linjär ökning av vätesulfidkoncentrationen med stigande giva av cystein. Fonseca m fl. (2013) jämförde vätesulfidkoncentration i vommen och in sacco-nedbrytning hos majs-glutenfoder med olika grad av proteintillgänglighet. Författarna menade att metodik, som utnyttjar vätesulfidproduktion i vommen skulle kunna ge en bättre bild av nedbrytningsmönstret hos lösligt protein, som ofta har hög nedbrytningshastighet, än in sacco-metodik.

Syftet med detta projekt var att utarbeta en in vitro-metod som utnyttjar vätesulfid som markör för proteinnedbrytning.

## Material och metoder

### Utrustning

Inkubationerna har i huvudsak gjorts med en utrustning för korttidskultur i 8 kärler (Figur 1), modifierad från Czerkawski & Breckenridge (1969). Volymen hos inkubationskärlet är 700 ml men totalvolym inklusive lock, anslutningsrör och slangar är 1122 ml. Varje inkubationskärlet har ett separat uttag som används för uppsamling och avläsning av det överskott av fermentationsgas som bildats. Det finns också en omröringsslinga som kontinuerligt pumpar runt inkubationskärlets gasfas och bubblar ut den i kärlets botten. Den ursprungliga intentionen var att montera en sensor för H<sub>2</sub>S på varje omröringsslinga. Det visade sig dock att de elektrokemiska mätceller som är tillgängliga inte tolererar kondenserande fuktighet, som uppstår i omröringsslingan. Istället användes ett portabelt mätinstrument (GA2000, Geotech, Lemington Spa, UK) som kopplades in via shuntuttag på pumpslingan. Gas från omröringsslingan passerade vid mätningen genom instrumentet och återfördes till inkubationssystemet. Instrumentet fylldes med koldioxid före inkoppling och ventilerades efter varje mätserie med luft med hjälp av instrumentets inbyggda pump för att förhindra fuktproblem. Instrumentet hade också ett fuktfilter på inloppsledningen som byttes med täta mellanrum.



Figur 1. Den inkubationsutrustning som använts (vänster) och principskiss över funktionen (höger).

### Kolhydratkälla för inkubation

Syftet med den kolhydratkälla som användes var att underhålla en fermentation under ca 4 timmar med hjälp av relativt snabbt tillgängliga kolhydrater. Därför användes lika delar av laktos (BDH 10139) och äpplepektin (Fluka 76282), 1.25 g av vardera kolhydraten i varje inkubationskärlet.

### Proteinfoder för inkubation

Foderprover från SLF-projekten ”Närproducerat foder fullt ut” och ”Åkerböna till gris” användes. Proven maldes på hammarkvarn (Kamas) genom 1 mm såll. Värmebehandling av åkerböna med behandlingar motsvarande de som användes i full skala av Martinussen et al. (2013) gjordes på laboratoriet på följande sätt: Det omalade provet placerades på plåt i ugn vid faställd temperatur (100 - 200° C) under 1 timme och ångades därefter under lock på plåt ovanför vattenbad vid 100 ° C under 30 minuter. Slutligen torkades provet vid 50° C före malning.

Efter inledande inkubationer med olika provmängder användes prov motsvarande ca 3.8 mg cystein (1 g torrt prov av åkerböna) för att ge koncentrationer av H<sub>2</sub>S som inte överskred instrumentets mätområde (500 ppm). För inkubationer med rent cystein sattes 1.4 ml av en lösning med 4 g/L av cysteinhydrokloridmonohydrat (Merck 1.02839.0100) i avjonat vatten till inkubationskärlet.

Vid inkubationerna följdes i stora drag den metodik som tidigare beskrivits av Eriksson & Murphy (2004). De vattenbad som inkubationskärlen stod i värmdes upp till 39° C och systemet gasades med CO<sub>2</sub>. Den kolhydratkälla som användes vid inkubationen sattes till varje inkubationskärl. VOS-buffert (Lindgren, 1979) sattes till varje kärl med 250 ml under fortsatt gasning. Våmvätska hämtades från en fistulerad sinko på underhållsfoderstat vid Lövsta i ett CO<sub>2</sub>-gasat kärl som transporterades i värmeisolerad låda vid 39° C. Våmvätska togs dels före första utfodring, dels kl. 12.00. Våmvätska silades genom durkslag med 1 mm öppningar under gasning med CO<sub>2</sub> och 250 ml våmvätska sattes till inkubationskärlen. För att undvika effekter av en eventuell lagfas tillsattes inte det proteinfoder som skulle utvärderas förrän tydliga tecken på fermentation syntes genom att överskottsgas samlats i de mättrör som var anslutna till varje inkubationskärl. Det inträffade efter ca 50 min. Koncentrationen av H<sub>2</sub>S mättes sedan ca var 15:e minut i 75 min och därefter varje timme tills inkubationen avbröts 5 tim efter tillsats av proteinfoder. pH mättes vid avslut.

### *Analys*

Rutinmetoder användes för analys av Kjeldahlkväve och cystein. HS/H<sub>2</sub>S analyserades enligt Siegel (1965), både manuellt och med en AutoAnalyzer-applikation. Analyserna av HS/H<sub>2</sub>S i vätskefasen fungerade inte tillfredställande och måste göras om för att kunna avgöra hur stor andel av H<sub>2</sub>S-produktionen som inte mättes upp i gasfasen.

### *Beräkning*

Produktionen av H<sub>2</sub>S i tidsintervallet  $t_1 - t$  beräknades som:

(Koncentration (t) – koncentration (t<sub>1</sub>)) × headspacevolymen 622 ml +

((Koncentration (t) + koncentration (t<sub>1</sub>)/2) × gasproduktion i tidsintervallet

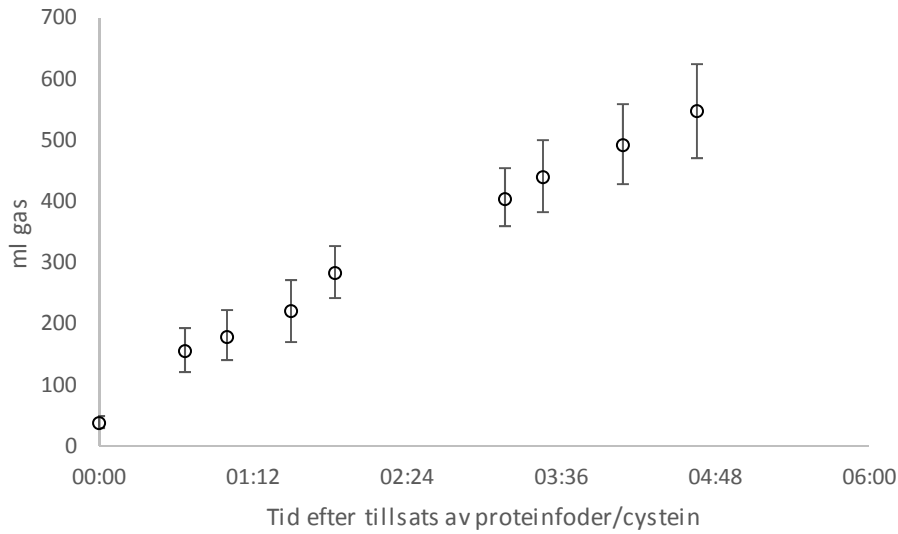
Resultatet multiplicerades med 10<sup>-6</sup> för konvertering till ml H<sub>2</sub>S och motsvarande blankvärde drogs bort för att ge en nettoproduktion.

## Resultat

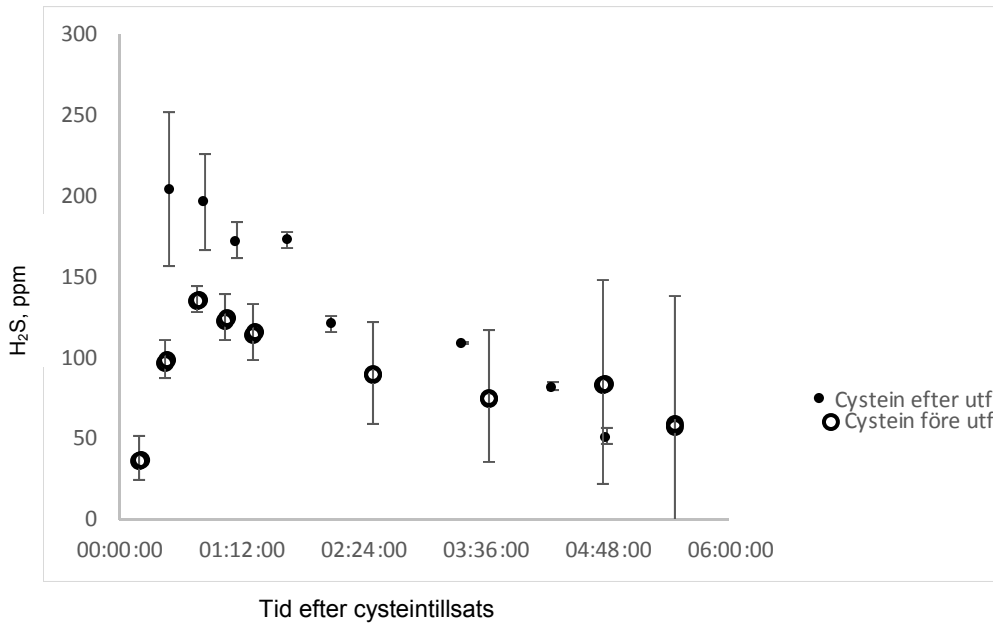
*De resultat som presenteras här utgör en mindre del av de totala resultaten. Fullständiga resultat kommer att presenteras när kompletterande analyser gjorts.*

Gasvolymen ökade linjärt från och med tillsatsen av proteinfoder/cystein och var i samma storleksordning som Eriksson & Murphy (2004) fann vid tidigare inkubation med samma metodik. pH var vid inkubationens slut 6.6 – 6.8. Producerad mängd H<sub>2</sub>S varierade från -0.04 ml till 0.24 ml (visas ej). Det uppträdde dock många negativa nettovärden för olika tidsintervall med det sättet att räkna. Därför presenteras istället nettokoncentrationer, som gav stabilare kurvor. Det rättfärdigas också av att koncentrationsförändringen i headspacevolymen i regel var en dominerande del i ekvationen som presenteras under ”Beräkningar”. Figur 3 visar koncentrationer av H<sub>2</sub>S in vitro för rent cystein inkuberat med våmvätska uttagen antingen före morgonutfodring eller 4 timmar efter första utfodring. Värdena är korregerade för blank (inkubation med våmvätska, buffert och kolhydratkälla men utan cystein). Högsta koncentration nåddes efter 30-40 min. Den mer aktiva våmvätskan uttagen ca 4 timmar efter första utfodring gav både snabbare ökning och högre topp än våmvätska hämtad innan donatorkons första utfodring. Figur 4 visar resultat för obehandlad och värmebehandlad åkerböna (140° C) uttryckt som andel av högsta koncentration med cystein. Detta för att kompensera för nivåeffekten av olika inkubationsomgångar. Den värmebehandlade åkerbönan gav en mycket långsammare, linjär ökning av

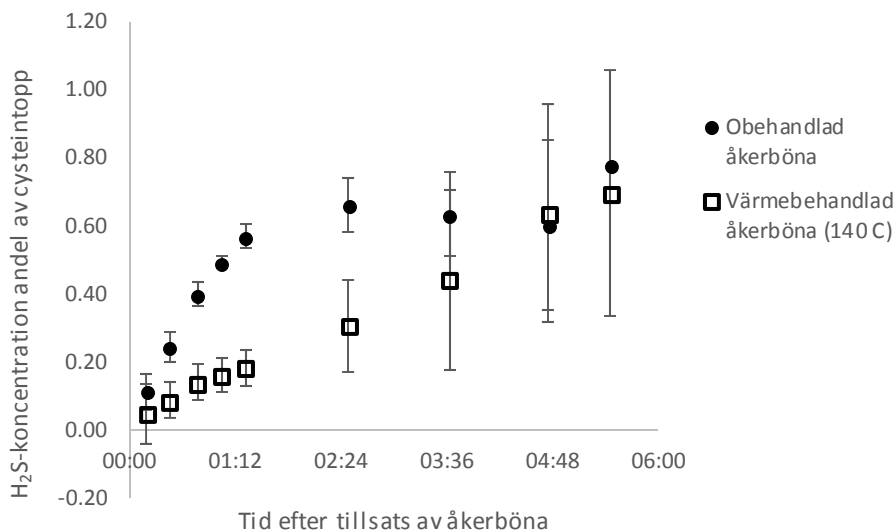
H<sub>2</sub>S-koncentrationen som inte förrän vid 5 timmar hunnit ifatt koncentrationen med den obehandlade bönan.



Figur 2. Gasvolym efter tillsats av proteinfoder/cystein.



Figur 3. Blankkorrigerad koncentration av H<sub>2</sub>S in vitro vid inkubation med 3.8 mg cystein med våmvätska uttagen före morgonutfodring eller 4 tim efter utfodring.



Figur 4. Koncentration av H<sub>2</sub>S in vitro vid inkubation av 1 g åkerböna, antingen obehandlad eller värmebehandlad. Koncentrationen är uttryckt i förhållande till den högsta koncentration som samtidigt inkubation av motsvarande mängd cystein gav.

## Diskussion

Förändringarna i H<sub>2</sub>S-koncentration under inkubation med cystein liknade de resultat in vivo som Dewhurst et al. (2007) rapporterade med en topp efter ca 30 min. Med obehandlad åkerböna var däremot utvecklingen långsammare än vad Rustas et al. (2013) observerade in vivo, toppen nåddes in vivo redan efter ca 40 min och efter 90 min var koncentrationen av H<sub>2</sub>S nere vid baslinjen igen. Toppen in vitro dröjde ca 2 tim och koncentrationen vände aldrig ner mot baslinjen på samma sätt som till exempel cystein gjorde i Figur 3. Det finns flera troliga orsaker. Vid inkubation in vitro blir förhållandena mindre gynnsamma än i våmmen även om bästa möjliga anaerobteknik tillämpas. Det ger ofta upphov till en lagfas och även till långsammare fermentation därefter. In vivo pågår också processer med uppstötning av vämgaser, resorption och utflöde ur våmmen, som ger effekter som inte kan ses in vitro. Den H<sub>2</sub>S som går att mäta speglar sannolikt inte heller hela proteinnedbrytningen, eftersom en mikrobproteinsyntes hela tiden pågår.

En annan orsak till ett mer utdraget förlopp in vitro kan vara pH-effekten. H<sub>2</sub>S har pK<sub>a</sub> 7.04 (Handbook of Chemistry and Physics, 62<sup>nd</sup> edition), där alltså lika delar finns som HS<sup>-</sup> och som gasformen H<sub>2</sub>S. Vid det pH som rådde under inkubationerna (6.6 – 6.8) bör därför 64-73% ha funnits som H<sub>2</sub>S och resten som HS<sup>-</sup>. Jämvikt ställer in sig mellan de olika formerna, men nya resultat av Wu et al. (2015) har visat på komplexa samband vid in vitro-inkubationer. VOS-buffert och våmvätska i de proportioner som användes valdes för att kunna hålla ett relativt stabilt pH-värde under inkubationen. Analys av vätskefasen skulle sedan visa förändringar i innehåll av HS<sup>-</sup>/H<sub>2</sub>S där så att det gick att kompensera för dem. Tyvärr måste dessa analyser göras om för att kunna dra säkra slutsatser. Det är planerat att utföras när labpersonalen är tillbaka i slutet av augusti.

Ett alternativ för att minska problemet med effekten av varierande pH är att helt enkelt göra inkubationerna vid ett lägre pH. Det är en etablerad teknik vid kontinuerlig kultur att hålla pH inom intervallet 5.1 – 5.8 med små doser av lut och saltsyra (Ruiz-Moreno et al., 2015). Det skulle innebära att mer än 95% av frigjord sulfid alltid finns som H<sub>2</sub>S och minimera pH-effekten. För en standardmetod för

analys bör det dock göras med en buffert och inte genom tillsats av syra och lut. Det har också förekommit att in vitro-försök med H<sub>2</sub>S som markör gjorts med enbart våmvätska utan någon buffert (Häll-Larsson, 2004) och pH fått sjunka från 6.9 till 5.5 under inkubationens gång. Det innebär förmodligen en underskattning av nedbrytningen i början.

Det var ett mycket tydligt utslag för värmebehandling av åkerböna i linje med vad Martinussen et al (2013) observerade, där andelen lösligt protein minskade från 70 till 20% och proteinets nedbrytningshastighet in sacco från 11 till 4%/h för motsvarande värmebehandling. Mätning av H<sub>2</sub>S-bildning in vitro klarar alltså väl av att identifiera minskad nedbrytningshastighet för samma foder utsatt för olika behandling. För att översätta resultaten till en nedbrytningshastighet eller effektiv nedbrytbarhet finns flera vägar att gå. Kurvanpassning kan göras som för in sacco med antagandet att fermentationen fortgår med samma hastighet in vitro. Jämförelse kan också göras med ett standardprotein som kasein.

## Publikationer

De färdigbearbetade resultaten kommer att publiceras tillsammans med de båda in vivo-försök som gjordes i SLF-projekt V1230042.

## Slutsatser

De slutsatser som kan dras för närvarande är att H<sub>2</sub>S som markör tydligt identifierar den sänkta nedbrytningshastigheten efter värmebehandling av åkerböna.

## Resultatförmedling till näringen

När de slutgiltiga resultaten föreligger kommer de att tillsammans med implikationerna för tillämpad fodervärdering att förmedlas till näringen genom Norfors Scientific Advisory Group, genom artikel i tidningen Husdjur och genom presentation på Växa Sveriges D&U-konferens.

## Referenser

- Bird, P.R., 1972. Sulphur metabolism and excretion studies in ruminants V, Ruminal desulphuration of methionin and cyst(e)ine. *Aust. J. boill. Sci.* 25, 185-93.
- Bray, A.C., Till, A.R., 1975. Metabolism of sulphur in the gastro-intestinal tract. In: I.W. McDonald and A.C.I. Warner (editors), *digestion and metabolism of the Ruminant*. University of New England Publishing Unit, Atmidale, Australia, pp. 243-260.
- Broderick, G.A., 1987. Determination of protein-degradation rates using a rumen in vitro system containing inhibitors of microbial nitrogen-metabolism. *British Journal of Nutrition* 58, 463-475.
- Czerkawski, J.W., Breckenridge, G., 1969. The fermentation of sugar-beet pulp and sucrose in an artificial rumen, and the effect of linseed oil fatty acids on the fermentation. *Br. J. Nutr.* 23, 51-66.
- Dewhurst, R.J., Kim, E.J., Evans, R.T., Cabrita, A.R.J., Fonseca, A.J.M., 2007. Effects of dietary sulphur sources on concentrations of hydrogen sulphide in the rumen head-space gas of dairy cows. *Animal* 1, 531-535.
- Eriksson, T., Murphy, M., 2004. Ruminal digestion of leguminous forage, potatoes and fodder beets in batch culture: I. Fermentation pattern. *Animal Feed Science and Technology* 111, 73-88.
- Fonseca, A.J.M., Cabrita, A.R.J., Pinho, E.J., Kim, E.J., Dewhurst, R.J., 2013. Effects of protein sources on concentrations of hydrogen sulphide in the rumen headspace gas of dairy cows. *Animal* 7:1, 75-81.
- Fox, D.G., Tedeschi, L.O., Tylutki, T.P., Russell, J.B., Van Amburgh, M.E., Chase, L.E., Pell, A.N., Overton, T.R., 2004. The Cornell Net Carbohydrate and Protein System model for evaluating herd nutrition and nutrient excretion. *Anim. Feed Sci. Technol.* 112, 29-78.
- Gould, D.H., Cummings, B.A., Hamar, D.W., 1997. In vivo indicators of pathologic ruminal sulphide production in steers with diet-induced polioencephalomalacia. *Journal of Veterinary Diagnostics and Investigation* 9, 72-76.

- Hedqvist, H., Uden, P., 2006. Measurement of soluble protein degradation in the rumen. *Anim Feed Sci Technol* 126, 1-21.
- Häll-Larson, K., 2004. Effects of different forages on production of hydrogen sulphide in a rumen in vitro system. Examensarbete 196. Inst. f. husdjurens utfodring och vård. Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala.
- Huhtanen, P., Rinne, M., Nousiainen, J., 2008. Effects of silage soluble nitrogen components on metabolizable protein concentration: a meta-analysis of dairy cow production experiments. *Journal of Dairy Science* 91, 1150-1158.
- Jaakkola, S., Rinne, M., Heikkilä, T., Toivonen, V., Huhtanen, P., 2006. Effects of restriction of silage fermentation with formic acid on milk production. *Agricultural and Food Science* 15, 200-218.
- Kung, L., Bracht, J.P., Tavares, J.Y., 2000. Effects of various compounds on in vitro ruminal fermentation and production of sulfide. *Anim Feed Sci Technol* 84, 69-81.
- Madsen, J. (1985) The basis for the proposed Nordic protein evaluation system for ruminants. The AAT-PBV system [amino acids absorbable in the small intestine, protein balance in the rumen]. *Acta Agriculturae Scandinavica, Supplementum*, 25, 9-20.
- Martinussen, H., Jørgensen, K.F., Strudsholm, F., Weisbjerg, M.R. 2013. Heat treatment increases the protein value in beans. 4<sup>th</sup> Nordic Feed Science Conference, Uppsala, 12-13 of June 2013. SLU/HUVRapport 287, p 34-38.
- Ruiz-Moreno, M., Binversie, E., Fessenden, S. W., Stern, M.D. 2015. Mitigation of in vitro hydrogen sulfide production using bismuth subsalicylate with and without monensin in beef feedlot diets. *Journal of Animal Science* 93:5346-5354.
- Salsbury, R.L., Merricks, D.L., 1975. Production of methanethiol and dimethyl sulphide by rumen micro-organisms. *Plant and Soil* 43, 191-209.
- Siegel, L. M. 1965. A direct microdetermination for sulfide. *Anal. Biochem.* 11:126-132.
- Uden, P., Eriksson, T. 2012. Evaluation of some factors influencing the reliability of buffer soluble N recovery in feeds. *Animal Feed Sci. Technol.* 177, 218- 224.
- Volden H. (2011) (red.) NorFor – the Nordic feed evaluation system. EAAP publication No. 130. Wageningen, The Netherlands: Wageningen Academic Publishers.
- Wu, H., Meng, Q., Yu, Z. 2015. Effect of pH buffering capacity and sources of dietary sulfur on rumen fermentation, sulfide production, methane production, sulfate reducing bacteria, and total Archaea in in vitro rumen cultures. *Bioresource Technology* 186:25-33