

Universitatea de Științe Vieții  
„Regele Mihai I” din Timișoara



ȘCOALA DOCTORALĂ: INGINERIA RESURSELOR VEGETALE ȘI  
ANIMALE

**NECULA S. DANIEL CĂTĂLIN**

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**IMPACTUL AFECȚIUNILOR PODALE LA VACILE DE  
LAPTE ASUPRA EMISIILOR DE AZOT ÎN FERMELE  
COMERCIALE**

**Conducător științific**

**Prof. Dr. Ing. LAVINIA ȘTEF**

Timișoara

2024

University of Life Sciences  
„King Mihai I” from Timișoara



DOCTORAL SCHOOL OF PLANT AND ANIMAL RESOURCES  
ENGINEERING

**NECULA S. DANIEL CĂTĂLIN**

# **Ph.D. THESIS**

**IMPACT OF LAMENESS ON DAIRY COWS NITROGEN  
EMISSIONS IN COMMERCIAL FARMS**

**Scientific coordinator**

**Prof. Dr. Ing. LAVINIA ȘTEF**

Timișoara

2024

# REZUMAT

**Cuvinte cheie: vaci de lapte, șchiopătură, metabolismul azotului, emisii, parametri metabolici, parametri hormonal**

Teza de doctorat cu titlul „**Impactul afecțiunilor podale la vacile de lapte asupra emisiilor de azot în fermele comerciale**” este structurată în două părți: partea de studiu bibliografic respectiv stadiul actual al cunoașterii și partea de cercetări proprii. Teza de doctorat cuprinde un număr de 8 capitole, la care se adaugă referințele bibliografice utilizate. Lucrarea integrală însumează un număr de 121 pagini, 21 tabele, 21 figuri, 20 grafice și 271 referințe bibliografice.

## **Stadiul actual al cunoașterii**

### **Capitolul 1. Importanța emisiilor de azot la rumeğătoare asupra actualelor schimbări climatice**

Ciclul azotului este unul din cele mai importante cicluri de pe Pământ, alături de cel al carbonului. La nivel global, aproximativ 425 Megatone ( $MT = 10^{12}$  grame) de azot reactiv (Nr) este fixat în fiecare an din azotul atmosferic nereactiv ( $N_2$ ) în urma proceselor naturale, în oceane, pe uscat și în urma activității umane. Azotul rezultat din emisiile antropogenice a crescut fulminant începând cu 1850, când reprezenta 15% din total, ajungând la 60% în 2005 și, conform estimărilor, se va menține la acest nivel până în 2050. Această dinamică s-a datorat creșterii populației la nivel global, ce a dus la o cerere susținută pentru mai multe alimente, având ca rezultat o creștere a cantităților de îngrășăminte utilizate în agricultură, precum și creșterea suprafețelor de teren utilizate pentru producerea hranei. De asemenea, cererea pentru mai multă energie a dus la intensificarea arderii combustibililor fosili, ducând la pierderi sporite de Nr în mediul înconjurător. Astfel, multe praguri limită pentru sănătatea umană și a ecosistemelor au fost surmontate, inclusiv cele pentru calitatea aerului (smog, particule, ozon troposferic), apei potabile (nitrați), eutrofizarea apelor dulci și sărate, pierderea biodiversității sau epuizarea ozonului stratosferic.

Agricultura împreună cu sectorul zootehnic sunt principalii contributivi de Nr din totalul emisiilor induse de activitatea umană. Printre principalele cauze se numără utilizarea excesivă și ineficientă a fertilizatorilor sintetici, managementul gunoiului de grajd, precum și eficiența scăzută a conversiei N de către animale în lapte, carne, ouă. Principalele emisii de N provenite din sectorul zootehnic sunt reprezentate de amoniac, oxizi de azot și protoxid de azot ce contribuie la poluarea aerului și încălzirea globală, precum și de nitrați care contribuie la poluarea solului și apei.

Rumeğătoarele au jucat un rol esențial în supraviețuirea și succesul societăților din întreaga lume. Principalele lor contribuții sunt reprezentate de carne, lapte, piei, lână, îngrășământ, precum și forță de muncă. Un alt aspect important este reprezentat de faptul că rumeğătoarele convertesc nutrienți neutilizabili de către oameni în produse alimentare înalt nutritive. Acest lucru se datorează particularităților anatomo-fiziologice și de digestie ale acestor animale, diferența majoră dintre rumeğătoare și nerumeğătoare, fiind digestia fermentativă sau digestia microbiană de la nivelul prestomacurilor.

Totuși rumeğătoarele nu sunt cele mai eficiente când vine vorba de conversia azotului în lapte sau carne. La vacile de lapte, eficiența conversiei azotului variază între 15-35%. Diferența de aproximativ 65-85% este excretată prin urină și fecale. Excreția azotului în fecale este, în principal, sub formă de compuși organici stabili, în timp ce excreția prin urină este sub formă de uree. Sub acțiunea ureazei bacteriene ureea este transformată în amoniac care se volatilizează în aer contribuind astfel la poluarea aerului. Aceste pierderi contribuie la acidifierea mediului și eutrofizare, care afectează negativ biodiversitatea. Rumeğătoarele reprezintă 71% din totalul emisiilor produse de sectorul zootehnic, depășind semnificativ celelalte specii în contribuția lor la impactul asupra mediului.

### **Capitolul 2. Metabolismul substanțelor azotate, prevalența și impactul afecțiunilor podale asupra excreției de azot**

Rumegătoarele sunt animale erbivore care au tractul digestiv adaptat digestiei furajelor de origine vegetală. Particularitățile anatomo-fiziologice caracteristice rumegătoarelor constau în prezența stomacului pluricompartmentat format din trei prestomacuri și un compartiment gastric propriu-zis asemănător monogastricelor. Cele patru compartimente permit animalelor rumegătoare să ingere într-un timp scurt și cu o masticăție sumară cantități mari de furaje, care ulterior sunt regurgitate, remasticate, reinsalivate și redeglutite, acestea urmând a fi descompuse de către microorganismele prezente la acest nivel. Metabolismul substanțelor azotate la rumegătoare este un proces complex și dinamic deoarece acestea, ingerate prin rație, susțin atât metabolismul proteic al microsimbionților ruminali, cât și pe cel al animalului. Substanțele azotate folosite în furajarea rumegătoarelor se împart în proteice (proteina pură) și neproteice, cum sunt amoniacul ( $\text{NH}_3$ ) sau ureea. Substanțele azotate proteice care ajung în rumen prin ingestă sunt degradate de microorganismele ruminale până la formarea de peptide, aminoacizi și  $\text{NH}_3$ . Degradarea este influențată de solubilitatea acestora, durata de retenție în rumen, precum și de concentrația de  $\text{NH}_3$  sau pH-ul ruminal. Sinteza proteinelor microbiene în rumen asigură în mare măsură proteinele furnizate la nivelul intestinului subțire, reprezentând 50 până la 80% din totalul de proteină absorbită. O parte din substanțele azotate proteice ingerate scapă de degradarea microsimbionților ruminali, fiind digerate și absorbite la nivelul intestinului subțire, similar monogastricelor.

Factorii răspunzători de alterarea metabolismului substanțelor azotate și respectiv de eficiența utilizării N la rumegătoare sunt reprezentați de factori nutriționali și de management, dar și de factori ce țin de animal și genetici. Printre factorii nutriționali se numără nivelul proteic al rației, rata de degradare a proteinei la nivelul rumenului, precum și rata de degradare a carbohidraților din rație. Tot din această categorie fac parte și ingesta de apă, aportul de minerale, în special sodiu și potasiu, precum și diverși aditivi cum sunt pro-prebioticele, taninurile, ionoforii sau aminoacizii protejați. Factorii de management sunt reprezentați în principal de tipul de furajare (pașunat, furajarea separată sau amestec furajer unic), ordinea și frecvența administrării furajelor, precum și frecvența mulșului. Factorii legați de animal sunt strâns corelați cu greutatea corporală a animalelor; de asemenea, la vacile de lapte au fost raportate diferite variabile genetice pentru heritabilitatea ureei din lapte.

Șchiopătarea este o afecțiune multifactorială și una dintre cele mai importante probleme de bunăstare la vacile de lapte. Reprezintă a doua cea mai costisitoare boală după displazia de abomasum și al patrulea cel mai probabil motiv al reformării animalelor. Șchiopătarea afectează negativ o serie de comportamentele vitale, cum ar fi durata de odihnă, consumul zilnic de hrană și durata alocată hrănirii, precum și rumegării. Rezultatul este reducerea producției de lapte, scăderea greutății corporale și afectarea reproducției. Având în vedere faptul că șchiopătura reprezintă al patrulea motiv de reformare, atât incidența cât și prevalența sunt semnificativ crescute, în special în fermele de bovine. Din păcate, de cele mai multe ori, fermierii nu sunt conștienți de numărul animalelor afectate din efectivul lor, iar dacă sunt observate, adesea nu au suficient timp și personal calificat pentru a le trata. În medie, numărul vacilor șchioape, pe care fermierii îl detectează în fermele lor, este cu 35% mai mic comparativ cu situația reală. Din această cauză numărul cazurilor de șchiopătare este subestimat, așadar, prevalența și incidența cazurilor este redusă determinând astfel o percepție scăzută a impactului acesteia asupra bunăstării, sănătății și producției vacilor. Prevalența șchiopătării la nivelul efectivului are o variabilitate ridicată cuprinsă între 0-69%. Prevalența medie între diferite regiuni variază de la 16% în Olanda, 21% în Canada, 37% în Anglia până la 63% în nord-estul Statelor Unite ale Americii.

Având în vedere impactul afecțiunilor podale prin modificarea comportamentelor vitale ale animalului, asupra fermentației la nivel ruminal, se emite ipoteza că metabolismul azotului este perturbat. Aceasta poate reduce eficiența fermei, cu consecințe economice negative și impact nedorit asupra mediului înconjurător. De asemenea, luând în considerare prevalența ridicată din fermele de vaci, se poate deduce că impactul la nivel global este unul destul de important, ceea ce justifică o aprofundare mai amănunțită pentru cuantificarea acestor pierderi și găsirea unor soluții adecvate pentru reducerea lor, precum și identificarea unor biomarkeri pentru depistarea precoce a acestora.

Prima parte a tezei de doctorat cuprinde un număr de 30 pagini, ceea ce reprezintă în jur de 28% din volumul total al tezei. Următoarele capitole, respectiv partea de cercetări proprii, prezintă studiile efectuate pe parcursul anilor de doctorat. Cercetările experimentale au fost realizate în ferma comercială de vaci de lapte SC Koplax SRL din localitatea Gorgota, județul Prahova (44.7951, 26.0745). Partea a II-

a lucrării de doctorat se extinde pe 78 pagini, ceea ce reprezintă 72% din volumul total al tezei, cuprinzând 17 tabele, 19 figuri, 20 grafice.

## **Cercetări proprii**

### **Capitolul 3. Scopul, obiective și organizarea cercetărilor**

Scopul prezentei teze de doctorat, intitulată "Impactul afecțiunilor podale la vacile de lapte asupra emisiilor de azot în fermele comerciale", este de a evalua ingesta și emisiile de N prin lapte, fecale și urină la vacile cu afecțiuni podale (scor locomotor 3 și 4) comparativ cu animale fără afecțiuni (scor locomotor 1), precum și identificarea unor potențiali parametri metabolici și hormonal care pot ajuta la depistarea precoce, rapidă și facilă a animalelor cu afecțiuni podale.

Prin urmare, obiectivele cercetărilor realizate în vederea atingerii scopului propus, vizează următoarele aspecte:

- evaluarea producției de lapte și constituenților laptelui la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea volumului urinar și a concentrației de creatinină, uree și a raportului creatinină/uree din urină la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea ingestiei de azot la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea egestei de azot prin lapte, urină și fecale la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea bilanțului azotat la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea concentrației de creatinină, uree, electroliților sangvini și a coceptinei ADH din sânge la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- evaluarea duratei de rumegare și ingestă la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale;
- corelația și regresia diferitelor caractere luate în studiu la vacile din experiment;
- corelația dintre scorul locomotor și parametrii sangvini.

Primul experiment a fost realizat în perioada 6 Mai 2021 – 12 Mai 2021, fiind conceput pentru a evalua ingesta și emisiile de azot prin lapte, urină și fecale la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale.

Al doilea experiment a fost realizat în perioada 19 Martie 2023 – 30 Martie 2023, fiind conceput pentru identificarea unor potențiali parametri metabolici și hormonal care pot ajuta la depistarea precoce, rapidă și facilă a animalelor cu afecțiuni podale.

Analizele de laborator au fost realizate în laboratoarele de cercetare specifice din cadrul Universității de Științe Vieții „Regele Mihai I al României” din Timișoara, precum și în alte laboratoare de profil din alte instituții, în regim de prestări servicii.

### **Capitolul 4. Materiale și metode de cercetare**

În capitolul IV sunt descrise metodele folosite în studiul nostru pentru determinarea compoziției chimice a furajelor și fecalelor, a constituenților din lapte, determinarea indicilor urinari și a indicilor sangvini. De asemenea, în capitol sunt descrise și metodele folosite pentru determinarea substanței uscate ingerate individual, a volumului urinar, comportamentelor vitale, precum și cele utilizate pentru analiza statistică.

### **Capitolul 5. Cercetări proprii privind evaluarea ingestiei și a emisiilor de azot prin lapte, urină și fecale la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale**

În această cercetare ne-am propus să evaluăm ingesta și emisiile de azot prin lapte, urină și fecale la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale. Experimentul s-a desfășurat pe parcursul a șase zile fiind împărțit în două perioade, perioada experimentală propriu-zisă (de colectare a probelor) cu durată de trei zile fiind precedată de o perioadă preexperimentală, de asemenea cu o durată

de trei zile. Douăzeci de vaci de lapte din rasa Holstein-Friză au fost selectate pe baza numărului de lactații, zilelor de lactație, producției de lapte și a scorului locomotor. Animalele au fost cazate în 2 boxe în sistem de stabulație liberă.

**Lotul experimental (LE)** a fost constituit din 10 vaci multipare cu o greutatea corporală medie de  $604 \pm 55$  kg,  $159 \pm 31$  zile de lactație,  $40,8 \pm 5,5$  kg producție medie de lapte și cu un scor locomotor  $\geq 3$  excluzând animalele cu scor locomotor 5.

**Lotul de control (LC)** a fost constituit, din 10 vaci multipare. În cadrul acestui lot greutatea corporală medie a vacilor a fost de  $643 \pm 85$  kg,  $158 \pm 32$  zile de lactație,  $40,0 \pm 2,1$  kg producție medie de lapte și scor locomotor 1.

Conform rezultatelor obținute în urma experimentului, producția de *lapte corectat energetic* a fost mai mare la vacile șchioape, înregistrând o creștere de 11,8%. În plus, concentrația de *creatinină urinară* la vacile șchioape a fost semnificativ mai mare, cu 14,1%, decât la vacile fără afecțiuni podale. Cu toate acestea, nu au fost observate diferențe semnificative în concentrația urinară de uree între cele două grupuri. *Raportul creatinină/uree* a fost cu 23,5% mai mare la animalele cu afecțiuni podale comparativ cu cele sănătoase. *Volumul urinar* la vacile șchioape a fost cu 17,5% mai mic decât cel la vacile fără afecțiuni ale picioarelor, această diferență fiind semnificativă statistic. De asemenea, a fost observată o corelație puternic negativă între volumul urinar și creatinina urinară atât la vacile cu și fără afecțiuni podale, precum și per total experiment.

În ceea ce privește *bilanțul azotat*, s-au înregistrat diferențe semnificative în ceea ce privește excreția de *azot în lapte*, unde vacile cu afecțiuni podale au avut o excreție de azot cu 10,8% mai mare decât vacile sănătoase. În schimb, excreția de *azot în urină* a fost cu 15,1% mai mică la vacile șchioape comparativ cu grupul martor. De asemenea, a existat un trend către o excreție mai mare de *azot în fecale*, valorile fiind cu 6% mai mari în lotul experimental față de lotul martor. Nu au fost găsite diferențe semnificative între cele două grupuri în ceea ce privește aportul total de azot, retenția de azot în organism sau eficiența utilizării azotului. Analizând bilanțul azotat ca pondere din azotul ingerat, nu s-au înregistrat diferențe semnificative în azotul eliminat prin lapte și fecale. Cu toate acestea, excreția de *azot în urină* a fost semnificativ mai mică la vacile cu afecțiuni podale, cu 19,4%, comparativ cu lotul de control.

În studiul nostru, am observat câteva *corelații* cheie între parametrii analizați. S-a identificat o corelație puternică negativă și semnificativă statistic între volumul urinar și creatinina urinară. Acest lucru sugerează că, pe măsură ce nivelul creatininei urinare crește, volumul urinar tinde să scadă. Această relație a fost consecventă atât în grupurile experimentale individuale, cât și în setul de date general. În mod similar, studiul a identificat o corelație negativă puternică între volumul urinar și ureea din urină la nivel de grup experimental, care a fost semnificativă statistic. Acest lucru sugerează că nivelurile mai ridicate de uree din urină sunt asociate cu debitul urinar redus. Deși această corelație a fost puternică în cadrul grupurilor experimentale, sa observat că este moderată atunci când se ia în considerare întregul experiment, reflectând posibil variații ale răspunsurilor individuale sau alți factori de influență.

În plus, a existat o corelație puternică pozitivă și semnificativă statistic între ureea din urină și creatinina urinară în cadrul grupurilor de studiu, cu o corelație moderată observată pe parcursul întregului experiment. Această relație sugerează o asociere strânsă între cei doi parametri metabolici urinari.

În concluzie, contrar ipotezei noastre, *emisiile urinare de azot* la vacile cu afecțiuni podale au fost semnificativ mai mici decât cele la vacile sănătoase. Asigurarea unui confort adecvat, cum ar fi reducerea distanțelor dintre spațiile de odihnă, furajare, adăpare și sala de muls permite animalelor șchioape să își exprime mai bine potențialul productiv. O modalitate de a realiza acest lucru este plasarea lor în boxe proiectate pentru întreținerea unui număr mic de animale, construit în proximitatea sălii de muls. Acest lucru poate avea un impact pozitiv asupra producției de lapte și eficienței utilizării azotului.

De asemenea, conform rezultatelor obținute, parametrii metabolici precum *concentrația de creatinină urinară* sau *raportul creatinină-uree* au potențial în a fi utilizați pentru depistarea afecțiunilor podale. Sunt necesare cercetări ulterioare pentru a determina (estima) dacă acești biomarkeri sunt modificați înainte de apariția semnelor clinice, ceea ce ar spori valoarea acestora pentru depistarea precoce și tratamentul incipient al afecțiunilor podale.

Nu în ultimul rând în urma regresiiilor aplicate, *predicția volumului de urină* la animale, cu sau fără afecțiuni podale, se poate face pe baza nivelurilor de creatinină urinară, gradul de potrivire situându-

se între 81,6% și 90,4%. Pentru creșterea gradului de acuratețe, predicția volumului urinar se poate face folosind două variabile respectiv nivelul de creatinina urinară și greutatea corporală a vacilor, gradul de potrivire al ecuației în acest caz fiind de 99,998%.

## **Capitolul 6. Cercetări proprii privind evaluarea unor parametri metabolici și hormonal la vacile cu afecțiuni podale comparativ cu vacile fără afecțiuni podale**

Scopul acestui experiment a constat în evaluarea unor parametri metabolici și hormonal la vacile cu afecțiuni podale (scor locomotor 3 și 4) comparativ cu vaci fără afecțiuni podale (scor locomotor 1). Experimentul s-a desfășurat pe parcursul a doisprezece zile și a inclus o perioadă de adaptare de 4 zile urmată de o fază experimentală de 8 zile pe parcursul căreia au fost colectate probe de sânge, lapte, urină și au fost monitorizate comportamentele vitale, precum durata rumegării și durata ingestiei. Probele de lapte, fecale și urină au fost colectate în primele 3 zile ale perioadei experimentale. Probele de sânge au fost recoltate de două ori, în prima și în ultima zi a perioadei experimentale. Monitorizarea comportamentelor intrinseci s-a efectuat pe o durată de 6 zile.

**Lotul experimental (LE)** a fost constituit din 10 vaci multipare cu o greutatea corporală medie de  $716 \pm 54$  kg,  $182 \pm 99$  zile de lactație,  $41,6 \pm 6,1$  kg producție medie de lapte și cu un scor locomotor  $\geq 3$  excluzând animalele cu scor locomotor 5.

**Lotul de control (LC)** a fost constituit, din 10 vaci multipare. În cadrul acestui lot greutatea corporală medie a vacilor a fost de  $712 \pm 21$  kg,  $182 \pm 50$  zile de lactație,  $41,8 \pm 3,2$  kg producție medie de lapte și scor locomotor 1.

Conform rezultatelor obținute în urma studiului, *producția de lapte corectată energetic* a fost semnificativ mai mare (+9,5%) la animalele cu afecțiuni podale comparativ cu cele fără afecțiuni podale. Diferențe semnificative ale procentul de grăsime din lapte s-au înregistrat între cele două loturi experimentale în favoarea vacilor șchioape (+15%). În cea ce privește proteina și ureea din lapte, nu au fost identificate diferențe semnificative între loturile experimentale.

Nu s-au înregistrat diferențe semnificative ale valorilor *concentrației de creatinină și uree din urină* înregistrate în experiment precum și ale raportului dintre creatinină și uree. De asemenea, nu s-au constat diferențe în ceea ce privește volumul urinar la vacile șchioape comparativ cu cele fără afecțiuni podale.

În ceea ce privește *corelațiile* dintre diferite caractere, s-a observat o corelație puternic negativă, semnificativă dpdv statistic între volumul urinar și creatinina urinară, atât la nivelul loturilor experimentale cât, și per total experiment. O corelație puternic pozitivă, semnificativă din punct de vedere statistic a fost observată și între ureea și creatinina urinară, atât la nivelul loturilor experimentale, cât și per total experiment. Corelații moderate spre slabe au fost identificate între celelalte caractere luate în studiu. De asemenea corelații moderate spre slabe au fost observate între scorul locomotor și parametrii sangvini. Corelațiile dintre diferite caractere ale vacilor din experiment, indică faptul că, creatinina urinară poate fi considerată un biomarker, atât pentru volumul urinar, cât și pentru concentrația de uree. Corelația negativă cu volumul urinar sugerează că monitorizarea nivelului de creatinină ar putea ajuta la înțelegerea stării de hidratare și a funcției renale, în timp ce corelația pozitivă cu ureea din urină întărește rolul creatininei ca biomarker pentru metabolismul și excreția proteinelor.

În ceea ce privește *biomarkerii sangvini*, BUN și raportul BUN/creatinină serică au fost semnificativ mai mici la începutul studiului la animalele șchioape, sugerând o stare de acidoză metabolică. Diferențe în favoarea LE s-au înregistrat și la sfârșitul experimentului, însă acestea nu au fost semnificative dpdv statistic.

De asemenea, un nivel semnificativ mai scăzut de Na a fost observat la animalele cu afecțiuni podale între zilele de recoltare, precum și între loturile experimentale la sfârșitul studiului. Scăderea nivelului de Na seric pe măsură ce confortul se îmbunătățește indică faptul că animalele au început să recupereze din efectul cortizolului asupra receptorilor mineralocorticoizi. Un trend de creștere a K seric a fost înregistrat în lotul vacilor cu afecțiuni podale între începutul și sfârșitul experimentului. Nu au fost observate diferențe semnificative, atât atât între zilele de recoltare, cât și între cele două loturi experimentale în ceea ce privește valorile K și Cl seric.

Nu în ultimul rând, un nivel scăzut de copeptină ADH a fost observat la vacile cu afecțiuni podale la sfârșitul experimentului comparativ cu animalele sănătoase, ceea ce indică un efect negativ al șchiopăturii asupra secreției de copeptină ADH.

În concluzie, în condițiile asigurării unui confort adecvat, în principal reducerea distanțelor dintre spațiul de odihnă, furajare, adăpare și sala de muls, animalele șchioape își pot exprima mult mai bine potențialul productiv, ceea ce poate avea un impact pozitiv asupra producției de lapte corectat energetic. O modalitate de a realiza acest lucru este plasarea lor în boxe proiectate pentru întreținerea unui număr mic de animale, construit în proximitatea sălii de muls. Acest lucru poate avea un impact pozitiv asupra producției de lapte și eficienței utilizării azotului.

Dintre parametrii metabolici și hormonalii evaluați în acest experiment, BUN și raportul BUN/SC pot fi asociați cu șchiopătura, putând fi considerați potențiali biomarkeri în depistarea afecțiunilor podale. Investigații suplimentare sunt necesare pentru a stabili dacă există modificări ale azotului ureic din sânge, ureea din urină, creatinina urinară și serică, azotul ureic sangvin/creatinină serică și raportul creatinină urinară/uree din urină, electroliții serici și vasopresină, în stadiile incipiente ale șchiopăturii.

Nu în ultimul rând, *predicția volumului de urină* la animale, cu sau fără afecțiuni podale, se poate face pe baza nivelurilor de creatinină urinară și a greutateii corporale a vacilor, gradul de potrivire al ecuației în acest caz fiind de 99,99%.

## Capitolul 7. Concluzii generale și recomandări

Studiul a fost inițiat pornind de la ipoteza că șchiopătura la vacile de lapte ar afecta metabolismul azotului, rezultând o utilizare mai puțin eficientă a azotului pentru producție și creșterea excreției de azot prin urină și fecale. Această ipoteză a fost întemeiată pe așteptarea că stresul și disconfortul fizic asociat cu șchiopătura ar avea un impact negativ asupra proceselor metabolice, ducând la pierderi mai mari de azot. Cu toate acestea, rezultatele celor două experimente efectuate nu au susținut ipoteza inițială. Contrar așteptărilor, studiile noastre au arătat că vacile cu șchiopătare în primul experiment au excretat de fapt mai puțin azot în comparație cu omoloagele lor. Acest rezultat neașteptat sugerează că relația dintre șchiopătare și metabolismul azotului este mai complexă decât se credea inițial. În loc să provoace pur și simplu o creștere a excreției de azot, șchiopătura poate declanșa ajustări metabolice care reduc pierderile de azot în anumite condiții. Acest lucru s-ar putea datora unei varietăți de factori, inclusiv comportamentul de hrănire modificat, modificări ale eficienței metabolice sau mecanisme fiziologice compensatorii care conservă azotul ca răspuns la stresul șchiopăturii. Aceste rezultate subliniază necesitatea unor investigații suplimentare pentru a înțelege pe deplin mecanismele subiacente implicate. Studiile viitoare ar trebui să exploreze modul în care șchiopătura afectează diferite aspecte ale metabolismului azotului, înainte de apariția simptomelor clinice și până la stadiul de afecțiune cronică. În plus, ar fi valoros să se examineze modul în care diferite practici de management, cum ar fi formularea rației și condițiile de întreținere, ar putea influența răspunsurile metabolice ale vacilor șchioape.

Din rezultatele ambelor experimente, s-a observat că producția de lapte corectat energetic a fost cu 11,7% și respectiv 9,5% mai mare la vacile șchioape comparativ cu cele fără afecțiuni podale. Această constatare este oarecum contraintuitivă, deoarece problemele de sănătate sunt de obicei asociate cu o productivitate redusă. Cu toate acestea, această creștere a productivității se datorează probabil implementării practicilor de management îmbunătățite ce includ condiții de întreținere și hrănire optimizate, precum și un acces mai facil la sursele apă. Impactul pozitiv al acestor practici este susținut și de creșterea observată a duratei de rumegare la vacile afectate de șchiopătură. Prin urmare, recomandăm identificarea timpurie și tratarea promptă a vacilor afectate de șchiopătură. Odată cu intervenția medicală, se recomandă amplasarea strategică a acestor vaci în boxe proiectate pentru întreținerea unui număr mic de animale, construit în proximitatea sălii de muls. Această abordare ajută la reducerea efortului fizic și permite vacilor afectate acces ușor la resursele esențiale, sprijinind astfel recuperarea lor și menținând productivitatea în această perioadă critică. Prin implementarea acestor practici, fermele de lapte pot spori atât bunăstarea vacilor, cât și eficiența generală a producției de lapte.

Corelațiile dintre diferite caractere, indică faptul că *creatinina urinară* poate fi considerată un biomarker util atât pentru *volumul urinar*, cât și pentru concentrația de *uree din urină*. Corelația negativă cu volumul urinar sugerează că monitorizarea nivelului de creatinină ar putea ajuta la înțelegerea stării de hidratare și a funcției renale, în timp ce corelația pozitivă cu ureea din urină întărește rolul creatininei ca biomarker pentru metabolismul și excreția proteinelor.



Unii *parametrii metabolici și hormonal* evaluați în acest studiu, au demonstrat un potențial semnificativ ca indicatori ai șchiopăturii. În special, *creatinina urinară, raportul creatinină urinară/uree din urină și raportul azot ureic din sânge/creatinină serică* par a fi biomarkeri deosebit de promițători. Identificarea acestor biomarkeri reprezintă un pas semnificativ înainte în managementul proactiv al sănătății vacilor de lapte. Detectarea precoce prin intermediul acestor biomarkeri metabolici ar putea duce la strategii de tratament mai eficiente, reducând impactul afecțiunilor podale asupra productivității generale și bunăstării animalelor. Acești biomarkeri nu numai că pot ajuta la detectarea condițiilor existente, ci și deschid calea pentru protocoale de monitorizare îmbunătățite, în care evaluările regulate ale acestor parametri ar putea alerta fermierii și medicii veterinari asupra semnelor timpurii de suferință. Cu toate acestea, pentru a valorifica pe deplin potențialul acestor biomarkeri, sunt necesare investigații suplimentare. Cercetările viitoare ar trebui să se concentreze pe stabilirea unui model cuprinzător de biomarkeri care să includă nivelurile de uree, atât în lapte, cât și în urină, azotul ureic din sânge, concentrațiile de creatinină în urină și sânge, electroliții serici și nivelurile de copeptină ADH. Înțelegerea modului în care acești biomarkeri interacționează și se modifică în timpul etapelor incipiente ale șchiopăturii, ar putea oferi o imagine mai completă a perturbărilor fiziologice care apar, permițând dezvoltarea unor instrumente de diagnosticare mai precise.

În ceea ce privește *predicția volumului de urină* ce include atât animale șchioape, cât și sănătoase, studiul a demonstrat că acesta poate fi estimat cu precizie pe baza nivelurilor de creatinină urinară. Precizia volumului de urină calculat folosind ecuația de predicție s-a dovedit a fi mare, variind de la 81,6% la 90,4%. Pentru obținerea unui grad de acuratețe ridicat, predicția volumului urinar se poate face folosind două variabile respectiv nivelul de creatinină urinară și greutatea corporală a vacilor, gradul de potrivire al ecuației în acest caz fiind de 99,99%.

## Capitolul 8. Elemente de originalitate

Originalitatea acestei cercetări constă în concentrarea pe evaluarea bilanțului de azot la animalele cu afecțiuni ale picioarelor comparativ cu cele sănătoase. Această zonă nu a fost explorată direct în studiile existente, ceea ce face din cercetarea noastră un efort de pionierat în înțelegerea impactului afecțiunilor podale asupra metabolismului azotului. Analizând modul în care aportul de azot este utilizat pentru producție, întreținere și excreție, putem obține informații mai aprofundate asupra provocărilor metabolice cu care se confruntă animalele șchioape.

Un aspect inovator al cercetării noastre este metoda utilizată pentru a stabili aportul individual de substanță uscată în condiții de fermă comercială. Metodele tradiționale se bazează adesea pe estimări generalizate, dar abordarea noastră utilizează digestibilitatea individuală a materiei organice, determinată cu ajutorul biomarkerului de cenușă insolubilă în acid (AIA) determinat atât din AFU, cât și în probele de fecale colectate de la fiecare animal. Aplicând aceste măsurători precise la cantitatea totală de fecale zilnice colectate individual, putem determina cu exactitate aportul de substanță uscată. Această metodă asigură că datele noastre reflectă aportul real al fiecărui animal, oferind o evaluare mai precisă a stării lor nutriționale.

În ceea ce privește parametrii metabolici și hormonal, cercetarea noastră deschide noi baze prin evaluarea copeptinei ADH împreună cu electroliții din sânge pentru a evalua stresul metabolic și starea de hidratare. Această combinație oferă o abordare nouă pentru înțelegerea mecanismelor de reglare homeostatică în condiții de stres metabolic sau durere, care sunt comune la animalele cu afecțiuni podale. Copeptina, un biomarker surrogat stabil pentru vasopresină, împreună cu nivelurile de electroliți, poate oferi informații valoroase asupra răspunsului organismului la stres și durere, putându-se încadra între potențiali biomarkeri pentru detectarea precoce și gestionarea afecțiunilor podale.

În plus, metaboliții precum creatinina și ureea, evidențiați în studiul nostru pentru ușurința lor de detectare și rentabilitate, prezintă potențial în utilizarea ca indicatori fiabili pentru detectarea afecțiunilor podale, oferind o alternativă practică și economică la biomarkerii mai complexi și mai scumpi. Disponibilitatea lor pe scară largă și tehnicile simple de măsurare le fac deosebit de atractive pentru monitorizarea de rutină în fermele comerciale.

De asemenea, cercetarea noastră abordează dintr-un alt unghi ecuațiile existente de predicție a volumului de urină, care se bazează în mod tradițional pe date provenite de la animale sănătoase. Prin încorporarea datelor de la animale cu afecțiuni ale picioarelor, am dezvoltat ecuații de predicție revizuite, care oferă un grad mare de precizie. Această îmbunătățire asigură că ecuațiile reflectă mai mult condițiile reale cu care se confruntă animalele șchioape, sporind utilitatea acestora pentru prezicerea volumului de urină și a diferiților produși de metabolism excretați pe cale renală.

# ABSTRACT

**Keywords:** dairy cows, lameness, nitrogen metabolism, emissions, metabolic parameters, hormonal parameters

The doctoral thesis with the title "**The impact of lameness in dairy cows on nitrogen emissions in commercial farms**" is structured in two parts: the bibliographic study part, respectively the current state of knowledge, and the part of own research. The doctoral thesis includes a number of 8 chapters, to which are added the bibliographic references used. The complete work totals a number of 121 pages, 21 tables, 21 figures, 20 graphs and 271 bibliographic references.

## **Current state of knowledge**

### **Chapter 1. The importance of nitrogen emissions in ruminants on current climate changes**

The nitrogen cycle is one of the most important cycles on Earth, along with the carbon cycle. Globally, approximately 425 Megatons (MT = 10<sup>12</sup> grams) of reactive nitrogen (Nr) is fixed each year from non-reactive atmospheric nitrogen (N<sub>2</sub>) by natural processes, in the oceans, on land and by human activity. Nitrogen resulting from anthropogenic emissions has grown rapidly since 1850, when it represented 15% of the total, reaching 60% in 2005 and, according to estimates, it will remain at this level until 2050. This dynamic was due to the increase in the global population which led to a sustained demand for more food resulting in increased amounts of fertilizers used in agriculture as well as increased land areas used for food production. Also, the demand for more energy has led to increased fossil fuels burned, resulting in increased losses of Nr to the environment. Thus, many thresholds for human and ecosystem health have been overcome, including those for air quality (smog, particulates, tropospheric ozone), drinking water (nitrates), eutrophication of freshwater and saltwater, loss of biodiversity or depletion of stratospheric ozone.

Agriculture together with the livestock sector are the main contributors of Nr from the total emissions induced by human activity. Among the main causes are excessive and ineffective use of synthetic fertilizers, manure management, as well as low efficiency of N conversion into milk, meat, eggs by animals. The main N emissions from the livestock sector are ammonia, nitrogen oxides and nitrous oxide, which contribute to air pollution and global warming, as well as nitrates, which contribute to soil and water pollution.

Ruminants have played an essential role in the survival and success of societies around the world. The main contributions are represented by meat, milk, hides, wool, fertilizer as well as labor. Another important aspect is represented by the fact that ruminants convert nutrients unusable by humans into highly nutritious food products. This is due to the anatomical-physiological and digestive peculiarities of these animals, the major difference between ruminants and non-ruminants being fermentative digestion or microbial digestion in the prestomachs.

However, ruminants are not the most efficient when it comes to converting nitrogen into milk or meat. In dairy cows, nitrogen efficiency varies between 15-35%. The rest, about 65-85% is excreted through urine and faeces. Excretion of nitrogen in faeces is mainly in the form of stable organic compounds, while excretion in urine is in the form of urea. Under the action of bacterial urease, urea is transformed into ammonia which volatilizes in the air thus contributing to air pollution. These losses contribute to environmental acidification, eutrophication that negatively affects biodiversity. Ruminants represent 71% of the total emissions produced by the livestock sector, significantly surpassing the other species in their contribution to the environmental impact.

### **Chapter 2. Nitrogen metabolism, prevalence and impact of lameness on nitrogen excretion**

Ruminants are herbivorous animals that have a digestive tract adapted to the digestion of plant-based fodder. The anatomical-physiological peculiarities characteristic of ruminants consist in the presence of a pluricompartmented stomach consisting of three prestomachs and a proper gastric

compartment similar to monogastrics. The four compartments allow ruminants to ingest large quantities of feed in a short time and with a brief mastication, which are later regurgitated, re-masticated, re-salivated and re-swallowed, these being degraded by the microorganisms present at this level. The nitrogen metabolism in ruminants is a complex and dynamic process because they, ingested nitrogen through the ration, support both the protein metabolism of the ruminal microsymbionts and that of the animal. Nitrogen substances used in ruminant feed are divided into protein (pure protein) and non-protein, such as ammonia (NH<sub>3</sub>) or urea. Protein nitrogenous substances that reach the rumen through ingestion are degraded by ruminal microorganisms until the formation of peptides, amino acids and NH<sub>3</sub>. Degradation is influenced by their solubility, retention time in the rumen as well as the concentration of NH<sub>3</sub> or the rumen pH. Microbial protein synthesis in the rumen largely provides the protein supplied to the small intestine, accounting for 50 to 80% of total protein absorbed. Part of the ingested protein nitrogenous substances escapes the degradation of ruminal microsymbionts, being digested and absorbed in the small intestine, similar to monogastrics.

The factors responsible for altering the nitrogen metabolism and respectively the nitrogen use efficiency in ruminants are represented by nutritional and management factors but also by animal and genetic factors. Among the nutritional factors are the protein level of the ration, the rate of degradation of protein in the rumen, the level and the rate of degradation of carbohydrates in the ration. This category also includes water intake, mineral intake, especially sodium and potassium, as well as various additives such as pro-prebiotics, tannins, ionophores or protected amino acids. Management factors are mainly represented by the type of forage (grazing, separate feeding or total mixed ration), the order and frequency of feeding and the frequency of milking. Animal-related factors are closely correlated with animal body weight while different genetic variables for the heritability of milk urea have been reported in dairy cows.

Lameness is a multifactorial condition and one of the most important welfare problems in dairy cows. It is the second most costly disease after abomasum dysplasia and the fourth most likely reason for culling the animals. Lameness negatively affects a number of intrinsic behaviors such as resting time, dry matter intake and time spent for feeding, as well as rumination time. The result is loss of milk production, body weight and impaired reproduction. Considering that lameness is the fourth reason for retraining, both incidence and prevalence are significantly increased, especially in cattle farms. Unfortunately, most of the time, farmers are not aware of the number of affected animals in their herd, and if they are noticed, they often do not have enough time and qualified personnel to treat them. On average, the number of lame cows that farmers detect on their farms is 35% less compared to the real situation. Because of this, the number of cases of lameness is underestimated, therefore, the prevalence and incidence of cases is reduced, thus causing a low perception of its impact on the welfare, health and production of cows. Herd prevalence of lameness has a high variability between 0-69%. The prevalence between different regions varies from 16% in the Netherlands, 21% in Canada, 37% in England to 63% in the northeastern United States of America.

Considering the impact of lameness due changing the animal's intrinsic behaviors, on ruminal fermentation, it is hypothesized that nitrogen metabolism is affected. This can reduce the farm efficiency, with negative economic consequences and undesirable impact on the environment. Also, taking into account the high prevalence in cow farms, it can be deduced that the global impact is quite important, which justifies a more thorough investigation to quantify these losses and find appropriate solutions to reduce them, as well to find solutions for early detection.

The first part of the doctoral thesis comprises a number of 30 pages, which represents around 28% of the total volume of the thesis. The following chapters, respectively the part of personal research, present the studies carried out during the doctoral years. The experimental researches were carried out in the commercial dairy farm SC Koplax SRL from Gorgota town, Prahova county (44.7951, 26.0745). Part II of the doctoral thesis extends over 78 pages, which represents 72% of the total volume of the thesis, comprising 17 tables, 19 figures, 20 graphs.

## **Personal research**

### **Chapter 3. Purpose objectives and organization of the studies**

The aim of this doctoral thesis, entitled "The impact of lameness in dairy cows on nitrogen emissions in commercial farms", is to evaluate the N intake and emissions through milk, faeces and urine in cows with lameness (locomotion score 3 and 4) compared to animals without lameness (locomotion score 1) as well as the identification of potential metabolic and hormonal parameters that can help in the early, quick and easy detection of lame animals.

Therefore, the objectives of the research carried out in order to achieve the proposed goal, aim at the following aspects:

- evaluation of milk production and milk constituents in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of urinary volume and concentration of creatinine, urea and urinary creatinine/urea ratio in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of nitrogen intake in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of nitrogen excretion through milk, urine and faeces in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of the nitrogen balance in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of the concentration of creatinine, urea, blood electrolytes and copeptin ADH in the blood in cows with lameness compared to cows without lameness;
- evaluation of rumination and ingestion times in cows with lameness compared to cows without lameness;
- correlation and regression of the various characters studied in the cows in the experiment;
- the correlation between locomotion score and blood parameters.

The first experiment was carried out between May 6, 2021 and May 12, 2021 and was designed to evaluate the intake and emissions of nitrogen through milk, urine and feces in lame cows compared to no lame cows.

The second experiment was carried out between March 19, 2023 and March 30, 2023, being designed to identify potential metabolic and hormonal parameters that can help in the early, quick and easy detection of lame animals.

The laboratory analyzes were carried out in the specific research laboratories of the University of Life Sciences "King Mihai I of Romania" in Timișoara, as well as in other specialized laboratories of other institutions under the service provision regime.

### **Chapter 4. Materials and methods**

Chapter IV describes the methods used in our study for the determination of the chemical composition of feed and feces, of milk constituents, determination of urinary indices and blood indices. The chapter also describes the methods used to determine individual dry matter intake, urinary volume, intrinsic behaviors as well as those used for statistical analysis.

### **Chapter 5. Evaluation of nitrogen intake and emissions through milk, urine and faeces in cows with lameness compared to cows without lameness**

In this research we aimed to evaluate nitrogen intake and emissions through milk, urine and feces in cows with lameness compared to cows without lameness. The experiment was carried out over six days, being divided into two periods, the actual experimental period (of sample collection) lasting three days being preceded by a pre-experimental period (adaptation), also lasting three days. Twenty dairy cows of the Holstein-Friesian were selected based on the number of lactations, days in lactation, milk production and locomotion score. The animals were housed in 2 boxes in a freestall system.

**The experimental group (LE)** consisted of 10 multiparous cows with an average body weight of 604±55kg, 159±31 days of lactation, 40.8±5.5 kg average milk production and with a locomotion score  $\geq 3$  excluding animals with score 5.

**The control group (LC)** was consisted of 10 multiparous cows. Within this group, the average body weight of the cows is 643±85kg, 158±32 days of lactation, 40.0±2.1kg average milk production and locomotion score 1.

According to the results obtained from the experiment, *energy-corrected milk* production was higher in lame cows, registering an increase of 11.8%. In addition, *urinary creatinine* concentration in lame cows was significantly higher, by 14.1%, than in cows without lameness. However, no significant differences in urinary urea concentration were observed between the two groups. *Creatinine/urea ratio* was 23.5% higher in animals with lameness compared to healthy ones. *Urinary volume* in lame cows was 17.5% lower than in cows without lameness, this difference being statistically significant. Also, a strong negative correlation was observed between urinary volume and urinary creatinine both in lame and no lame cows, as well overall experiment.

In terms of *nitrogen balance*, there were significant differences in *milk nitrogen* excretion, where cows with lameness had 10.8% more nitrogen excretion than healthy cows. In contrast, *urinary nitrogen* excretion was 15.1% lower in lame cows compared to the control group. There was also a tendency towards higher nitrogen excretion in feces, with values being 6% higher in the lame group compared to the control group. No significant differences were found between the two groups in terms of total nitrogen intake, nitrogen retention in the body, or nitrogen use efficiency. Analyzing the nitrogen balance as a percentage from nitrogen intake, no significant differences were recorded in the nitrogen excreted through milk and faeces. However, *urinary nitrogen* excretion was significantly lower in cows with lameness by 19.4% compared to controls.

In our study, we observed some key *correlations* between the analyzed parameters. A strong negative and statistically significant correlation was identified between urinary volume and urinary creatinine. This suggests that as urinary creatinine levels increase, urinary volume tends to decrease. This relationship was consistent both in the individual experimental groups and in the overall data set. Similarly, the study identified a strong negative correlation between urinary volume and urinary urea at the experimental group level, which was statistically significant. This suggests that higher urinary urea levels are associated with reduced urinary output. Although this correlation was strong within experimental groups, it was found to be moderate when considering the entire experiment, possibly reflecting variation in individual responses or other influencing factors.

In addition, there was a strong positive and statistically significant correlation between urinary urea and urinary creatinine within study groups, with a more moderate correlation observed throughout the experiment. This relationship suggests a close association between these two urinary metabolic parameters.

In conclusion, contrary to our expectations, *urinary nitrogen emissions* in cows with lameness were significantly lower than in healthy cows. Providing adequate comfort, such as reducing the distances between resting, feeding bunk, water sources and milking parlor, allows lame animals to better express their productive potential. One way to achieve this is to place them in stalls designed for housing a small number of animals, built in the vicinity of the milking parlor. This can have a positive impact on milk production and nitrogen use efficiency. This can have a positive impact on milk production and nitrogen use efficiency.

Also, according to the obtained results, metabolic parameters such as *urinary creatinine concentration* or the *creatinine-urea ratio* have the potential to be used to lameness detection. Further research is needed to determine (estimate) whether these biomarkers are modified before the onset of clinical signs, which would increase their value for early detection and early treatment of lameness.

Last but not least, following the applied regressions, the *prediction of the urine volume* in animals, with or without lameness, can be made on the basis of urinary creatinine levels, the degree of agreement being between 81.6% and 90.4%. To increase the degree of accuracy, the *prediction of the urinary volume* can be made using two variables, namely the level of urinary creatinine and the body weight of the cows, the matching degree of the equation in this case being 99.998%.

## Chapter 6. Evaluation of some metabolic and hormonal parameters in cows with lameness compared to cows without lameness

The aim of this experiment was to evaluate some metabolic and hormonal parameters in cows with lameness (locomotion score 3 and 4) compared to cows without lameness (locomotion score 1). The experiment was conducted over twelve days and included a 4-day adaptation period followed by an 8-day experimental phase during which blood, milk, urine samples were collected and intrinsic behaviors such as time spent ruminating and food intake were monitored. Milk, faeces and urine samples were collected during the first 3 days of the experimental period. Blood samples were collected twice, on the first and last day of the experimental period. The intrinsic behaviors were monitored over a period of 6 days.

**The experimental group (LE)** consisted of 10 multiparous cows with an average body weight of  $716\pm 54$ kg,  $182\pm 99$  days of lactation,  $41.6\pm 6.1$ kg average milk production and with a locomotor score  $\geq 3$  excluding animals with locomotion score 5.

**The control group (LC)** was made up of 10 multiparous cows. Within this group, the average body weight of the cows was  $712\pm 21$ kg,  $182\pm 50$  days of lactation,  $41.8\pm 3.2$ kg average milk production and locomotion score 1.

According to the results obtained from the study, *energy-corrected milk* production was significantly higher (+9.5%) in animals with lameness compared to those without lameness. Significant differences in milk fat percentage were recorded between the two experimental groups in favor of lame cows (+15%). Regarding milk protein and urea, no significant differences were observed between the experimental groups.

There were no significant differences on *urine creatinine* and *urine urea concentration* recorded in the experiment, as well as on the ratio between *urine creatinine / urine urea*. Also, no differences were found in terms of urinary volume in lame cows compared to their peers.

Regarding the *correlations* between different characters, a strong negative, statistically significant correlation was observed between urinary volume and urinary creatinine both at the level of the experimental groups and per total experiment. A strong positive, statistically significant correlation was also observed between urinary urea and creatinine both at the level of experimental groups and per total experiment. Moderate to weak correlations were identified between the other characters studied. Also moderate to weak correlations were observed between locomotor score and blood parameters. Correlations between different characters indicate that urinary creatinine can be considered a biomarker for both urinary volume and urea concentration. The correlation with urinary volume suggests that monitoring creatinine levels could help develop hydration status and renal function, while the positive correlation with urinary urea meets the role of creatinine as a biomarker for protein metabolism and excretion.

Regarding *blood biomarkers*, BUN and the BUN/serum creatinine ratio were significantly lower at the start of the study in the lame animals, suggesting a state of metabolic acidosis. Differences in favor of LE were also registered at the end of the experiment, but they were not statistically significant.

Also a significantly lower level of Na was observed in animals with lameness between sampling days as well as between experimental groups at the end of the study. The decrease in serum Na levels as comfort improves indicates that the animals have begun to recover from the effect of cortisol on mineralocorticoid receptors. A tendency of higher serum K was recorded in the lame cows between the beginning and the end of the experiment. No significant differences were observed both between the sampling days and between the two experimental groups in terms of serum K and Cl values.

Last but not least, a low level of ADH copeptin was observed in lame cows at the end of the experiment compared to healthy peers, which indicates a negative effect of lameness on copeptin ADH secretion.

In conclusion, under the conditions of ensuring adequate comfort, mainly reducing the distances between the resting, feeding, water space and the milking parlour, lame animals can express their productive potential much better, which can have a positive impact on corrected milk production energetic. One way to achieve this is to place them in stalls designed to accommodate a small number of animals, built in the vicinity of the milking parlor. This can have a positive impact on milk production and nitrogen use efficiency.

Among the metabolic and hormonal parameters evaluated in this experiment, *BUN* and the *BUN/SC ratio* may be associated with lameness, and may be considered potential biomarkers in the detection of foot diseases. Further investigation is needed to determine whether there are changes in blood urea nitrogen, urine urea, urine and serum creatinine, blood urea nitrogen/serum creatinine and urine creatinine/urine urea ratio, serum electrolytes, and vasopressin in the early stages of lameness.

Last but not least, the prediction of urine volume in animals, with or without lameness, can be made based on urinary creatinine levels and body weight of cows, the degree of fit of the equation in this case being 99.99%.

## Chapter 7. General conclusions and recommendations

The study was initiated with the hypothesis that lameness in dairy cows would affect nitrogen metabolism, resulting in less efficient use of nitrogen for production and increased nitrogen excretion through urine and faeces. This hypothesis was based on the expectation that the stress and physical discomfort associated with lameness would have a negative impact on metabolic processes, leading to greater nitrogen losses. However, the results of the two experiments conducted did not support this initial hypothesis. Contrary to expectations, the findings showed that lame cows in the first experiment actually excreted less nitrogen compared to their counterparts. This unexpected result suggests that the relationship between lameness and nitrogen metabolism is more complex than originally thought. Rather than simply causing an increase in nitrogen excretion, lameness may trigger metabolic adjustments that reduce nitrogen losses under certain conditions. This could be due to a variety of factors, including altered feeding behavior, changes in metabolic efficiency, or compensatory physiological mechanisms that conserve nitrogen in response to lameness stress. These results underscore the need for further investigation to fully understand the underlying mechanisms at play. Future studies should explore how lameness affects different aspects of nitrogen metabolism before the onset of clinical symptoms and up to the chronic condition stage. In addition, it would be valuable to examine how different management practices, such as ration formulation and housing conditions, could influence the metabolic responses of lame cows.

From the results of both experiments, it was observed that energy-corrected milk production was 11.7% and 9.5% higher respectively in lame cows compared to those without lameness. This finding is somewhat counterintuitive, as health problems are usually associated with reduced productivity. However, this increase in productivity is likely due to the implementation of improved management practices that include optimized housing and feeding conditions as well as more efficient access to water sources. The positive impact of these practices is also supported by the observed increase in rumination duration in cows affected by lameness. Therefore, we recommend early identification and prompt treatment of cows affected by lameness. Along with the medical intervention, it is recommended to strategically place these cows in stalls designed to accommodate a small number of animals, built in the vicinity of the milking room. This approach helps reduce physical exertion and ensures that affected cows have easy access to essential resources, thus supporting their recovery and maintaining productivity during this critical period. By implementing these practices, dairy farms can increase both cow welfare and overall milk production efficiency.

Correlations between different characters indicate that *urinary creatinine* can be considered a biomarker for both *urinary volume* and *urinary urea* concentration. The negative correlation with urinary volume suggests that monitoring creatinine levels could help to understand hydration status and renal function, while the positive correlation with urinary urea reinforces the role of creatinine as a biomarker for protein metabolism and excretion.

Some metabolic and hormonal parameters evaluated in this study demonstrated significant potential as indicators of lameness. In particular, *urinary creatinine*, *urinary creatinine/urine urea ratio*, and *blood urea nitrogen/serum creatinine ratio* appear to be particularly promising biomarkers. The identification of these biomarkers represents a significant step forward in the proactive health management of dairy cows. Early detection through these metabolic biomarkers could lead to more effective treatment strategies, reducing the impact of lameness on overall productivity and animal welfare. These biomarkers can not only help detect existing conditions, but also pave the way for more refined monitoring protocols, where regular assessments of these parameters could alert farmers and veterinarians to times of distress. However, to fully exploit the potential of these biomarkers, further investigations are needed. Future research should focus on stabilizing a comprehensive biomarker model that includes both milk and urine urea levels, blood urea nitrogen, urine and blood creatinine concentrations, serum electrolytes, and copeptin levels ADH. Understanding how these biomarkers interact and

change during their early onset of lameness could provide a more complete picture of the physiological disturbances that occur, allowing the development of more accurate diagnostic tools.

Regarding the prediction of urine volume including both lame and healthy animals, the study demonstrated that it can be accurately estimated based on urinary creatinine levels. The accuracy of urine volume calculated using the prediction equation was found to be high, ranging from 81.6% to 90.4%. In order to obtain a high degree of accuracy, the prediction of urinary volume can be made using two variables, namely the level of urinary creatinine and the body weight of the cows, the matching degree of the equation in this case being 99.99%.

### **Chapter 8. Elements of originality**

The originality of this research consists in focusing on the evaluation of the nitrogen balance in lame animals compared to no-lame. This area has not been directly explored in existing studies, making our research a pioneering effort in understanding the impact of lameness conditions on nitrogen metabolism. By analyzing how nitrogen intake is used for production, maintenance and excretion, we can gain deeper insight into the metabolic challenges facing lame animals.

An innovative aspect of our research is the method used to determine individual dry matter intake under commercial farm conditions. Traditional methods are often based on generalized estimates, but our approach uses individual organic matter digestibility, determined with the acid-insoluble ash (AIA) biomarker analyzed in both AFU and faecal samples collected from each animal. By applying these precise measurements to the total amount of daily feces collected individually, we can accurately determine individual dry matter intake. This method ensures that our data reflects the actual intake of each animal, providing a more accurate assessment of their nutritional status.

Regarding metabolic and hormonal parameters, our research breaks new ground by evaluating ADH copeptin along with blood electrolytes to assess metabolic stress and hydration status. This combination provides a novel approach to understanding homeostatic regulatory mechanisms under conditions of metabolic stress or pain, which are common in lame animals. Copeptin, a stable surrogate biomarker for vasopressin, along with electrolyte levels, may provide valuable information on the body's response to stress and pain, potentially as potential biomarkers for the early detection and management of lameness.

In addition, metabolites such as creatinine and urea, highlighted in our study for their ease of detection and cost-effectiveness. These metabolites have the potential to be used as reliable indicators for the detection of lameness, providing a practical and economical alternative to more complex and expensive biomarkers. Their widespread availability and simple measurement techniques make them particularly attractive for routine monitoring on commercial farms.

Our research also approaches existing urine volume prediction equations, which are traditionally based on data from healthy animals, from a different angle. By incorporating data from animals with lameness, we have developed revised prediction equations that provide a high degree of accuracy. This improvement ensures that the equations more closely reflect the actual conditions faced by lame animals, increasing their usefulness for predicting urine volume and various elements excreted.