نشریه علوم دامی
(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۱٤، بهـار ۱۳۹٦
ص‌ص: ۲۱۹~۲۳۰

اثر انتقال باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز روده موریانه به شیرابه شکمبه بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم کاه گندم و سرشاخه خرما در شرایط برون‌تنی

- **ایوب عزیزی**
  دانش آموخته دکترا دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **طاهره محمدآبادی** (نویسنده مسئول)
  دانشیار و عضو هیات علمی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **حسین معتمدی**
  استاد و عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز.
- **مرتضی چاجی**
  دانشیار و عضو هیات علمی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان.
- **حسن فضایلی**
  استاد، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج.

تاریخ دریافت : اسفند ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش : اردیبهشت ۱۳۹۵

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۵۵۲۵۵۲۸۸
Email: Mohammadabadi@ramin.ac.ir

چکیده

هدف از انجام پژوهش حاضر بررسی اثر انتقال باکتری‌های *باسیلوس لیچنیفورمیس*، *آکروباکتریوم اینترمدیوم* و *میکروباکتریوم پلادیکولا* جدا شده از روده موریانه به شیرابه شکمبه بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما به روش برون‌تنی بود. هر سوبسترای تلقیح شده با ایزوله‌های باکتریایی گرمخانه‌گذاری شد و با تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) مقایسه گردید. فراسنجه‌های تولید گاز، قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی، انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک، pH و قابلیت هضم آزمایشگاهی ماده خشک، ماده آلی، فیبر نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی (به روش دو مرحله‌ای) در همه تیمارهای آزمایشی مشابه بودند (P>۰/۰۵). تلقیح گونه‌های باکتریایی به شیرابه شکمبه به طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی در هر دو سوبسترا شد (P<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب در تیمار تلقیح شده با گونه *آکروباکتریوم* و تیمار شاهد مشاهده گردید. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، تلقیح باکتری‌های تجزیه‌کننده لیگنوسلولز جدا شده از روده موریانه به شیرابه شکمبه تأثیری بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما نداشت، هرچند سبب افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی گردید.

واژه‌های کلیدی: باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز، روده موریانه، تولید گاز، قابلیت هضم.

Animal Science Journal (Pajouhesh & Sazandegi) No 114 pp: 219-230

Effect of transferring lignin and lignocellulose-degrading bacteria of termite gut to the rumen fluid on in vitro gas production parameters and digestibility of wheat straw and date leaf

By: Ayob Azizi[1], Tahereh Mohammadabadi*[2], Hossein Motamedi[3], Morteza Chaji[2], Hasan Fazaeli[4]
[1] PhD Graduated Student, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[3] Full Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
Biotechnology and Biological Science Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[2] Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Iran
[4] Full Professor of Animal Nutrition, Animal Science Research Institute, Karaj, Iran

Received: February 2016 **Accepted: April 2016**

This experiment was conducted to investigate the effect of transferring bacteria *Bacillus licheniformis*, *Ochrobactrum intermedium* and *Mycobacterium paludicola*, with degrading lignin and lignocellulose potential isolated from termite gut to the rumen liquor, on *in vitro* gas production parameters and digestibility of nutrients in wheat straw and date leaves as a substrate. Each substrate was incubated with rumen liquor that was inoculated with each of the isolated bacteria using completely randomized design, and compared with control treatment (rumen liquor without inoculation). In both substrates, gas parameters, ruminal dry matter (DM) and organic matter (OM) digestibility, estimated metabolizable energy, partitioning factor, pH and two step digestibility of DM, OM, neutral detergent fiber and acid detergent fiber were similar (P>0.05) between the experimental treatments. Inoculation of isolated bacteria to the rumen liquor in both substrates significantly increased (P<0.05) ammonia nitrogen concentration in compared to control treatment. In both substrates, highest and lowest ammonia nitrogen was observed in treatment inoculated with *Ochrobactrum* and control treatment, respectively. Results of the present study indicated that inoculation of lignocellulosic degrading bacteria isolated from termite gut to rumen liquor did not improve *in vitro* gas production parameters and nutrient digestibility of wheat straw and date leaves. However, they increased ammonia nitrogen concentration.

Key words: Lignocellulose degrading bacteria, termite gut, rumen fluid, gas production, digestibility.

مقدمه

در بین حیوانات مزرعه‌ای، نشخوارکنندگان به طور ویژه‌ای جهت استفاده از مواد لیگنوسلولزی سازگاری یافته‌اند (Gobius و همکاران، ۲۰۰۲). لیگنوسلولز همواره در جیره نشخوارکنندگان اهمیت بالایی دارد و حتی در سیستم‌های پرورش متراکم دام نیز، به دلیل مقرون به صرفه بودن و اثر بر عملکرد بهینه شکمبه و سلامت آن در جیره نشخوارکنندگان گنجانده می‌شود.

اجتماع پیچیده‌ای از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده فیبر عمل تجزیه فیبر در شکمبه را کاتالیز می‌نمایند. عمده باکتری‌های تجزیه کننده فیبر شکمبه شامل باکتری‌های گرم منفی *فیبروباکتر سوکسینوژنز*[۱] و دو گونه گرم مثبت *رومینوکوکوس آلبوس*[۲] و *رومینوکوکوس فلیوفسینز*[۳] هستند. *بوتیریویبریو فیبروسالونس*[۴] نیز یک باکتری گرم مثبت با قابلیت تجزیه‌کنندگی بالای زایلان می‌باشد که نقش اساسی در تجزیه فیبر بازی می‌نماید. بعلاوه، گونه‌های پریوتلا[۵] به عنوان باکتری‌های با قابلیت تجزیه‌کنندگی بالای فیبر شناخته نشده‌اند، اما آن‌ها دامنه‌ای از آنزیم‌های زایلانازی تولید می‌کنند. قارچ‌های بی‌هوازی شکمبه به خصوص گونه *نئوکالیماستیکس فرونتالیس*[۶] نقش مهمی در تجزیه فیبر دارند (Hungate ، ۱۹۶۶).

دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه به منظور افزایش کارایی آن در گوارش‌پذیری مواد خوراکی و به ویژه تخمیر میکروبی مواد

لیگنوسلولزی موضوعی است که مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. علیرغم پیشرفت های قابل توجه در علم تغذیه دام، هنوز بخش قابل توجهی از مواد مغذی مصرفی از طریق مدفوع دفع می گردد و نیز میزان زیادی گاز متان در شکمبه تولید می شود که حاکی از هدررفت مواد مغذی است (Santra و Karim ، ۲۰۰۳). به ویژه در خصوص بخش های فیبری جیره-های غذایی، می توان گفت که هنوز قابلیت تجزیه و تخمیر در شکمبه پایین است، زیرا در مدفوع نشخوارکنندگان بخش قابل توجهی فیبر قابل تخمیر دیده می‌شود (Krause و همکاران، ۲۰۰۳).

طی دو دهه گذشته، تکنیک‌های بسیاری جهت دستکاری شکمبه در آزمایشگاه‌های مختلف در بسیاری از نقاط جهان مورد ارزیابی قرار گرفته است. این روش‌ها را می‌توان به دو گروه عمده شامل دستکاری ژنتیکی و دستکاری غیر ژنتیکی تقسیم‌بندی نمود. در روش دستکاری ژنتیکی، تلاش‌هایی جهت توسعه مهندسی ژنتیک باکتری‌های شکمبه به وسیله تکنیک انتقال ژن‌های مطلوب به منظور تجزیه بیشتر فیبر و افزایش تولیدات حیوانی صورت گرفته است (Teather و همکاران، ۱۹۹۷ ؛ Vercoe و White، ۱۹۹۷). متاسفانه، عمده این تلاش‌ها موفقیت آمیز نبوده است، زیرا نتایج قابل قبولی از آن‌ها در جهت بهبود هضم فیبر در شکمبه حاصل نشده است.

احتمال ناتوانی میکروب‌های شکمبه جهت تولید آنزیم‌های مناسب برای حداکثر نمودن هضم فیبر، اغلب به عنوان دلیلی بر انجام تحقیقات بیشتر به منظور بهبود عملکرد شکمبه در نظر گرفته شده است (Krause و همکاران، ۲۰۰۳). از دستکاری‌های غیر ژنتیکی به منظور افزایش هضم لیگنوسلولز یا سایر خوراک‌ها می‌توان روش‌های فیزیکی (دستکاری خوراک)، شیمیایی یا تغذیه مستقیم میکروب‌ها (پروبیوتیک‌ها) را نام برد. در ارتباط با تغذیه میکروب به دام، در مطالعه‌اولیه‌ای باکتری‌های فیبرولایتیک به شکمبه تلقیح شد، اما اثرات قابل توجهی در تجزیه فیبر مشاهده نگردید (Hungate ، ۱۹۶۶). همچنین، در پژوهشی دیگر جمعیت باکتری‌های فیبرولایتیک شکمبه به میزان ده برابر افزایش داده شد، اماپس از انکوباسیون یونجه در شکمبه به وسیله کیسه نایلونی، اثر قابل توجهی بر هضم فیبر یونجه مشاهده نگردید (Dehority و Tirabasso، ۱۹۹۸). نتایج مشابهی نیز با افزایش جمعیت باکتری *رومینوکوکوس* بدست آمده است(Krause وهمکاران، ۲۰۰۱). اخیراً، Kumar و همکاران (۲۰۱۴) باکتری *استرپتوکوس گالولیتیکوس*[۷]، که یک باکتری با قابلیت تجزیه‌کنندگی تانن می‌باشد، به بزهای تغذیه شده با برگ‌های گیاه *کوئرکوس سِمِی‌کارپیفولیا*[۸] که غنی از تانن است، به عنوان پروبیوتیک تغذیه نمودند. نتایج نشان دادند که باکتری مذکور سبب بهبود عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی تیمارهای حاوی علوفه مذکور نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) گردید. بسیاری از متخصصین با تلقیح باکتری‌های تجزیه کننده فیبر به شکمبه دریافتند که مواد تلقیحی معمولاً در شکمبه ناپدید شدند (Attwood و همکاران، ۱۹۸۸؛ Miyagi و همکاران، ۱۹۹۵؛ Wallace و Walker، ۱۹۹۳)

از جمله دلایل اصلی این است که هنوز دانش بشر جهت درک چگونگی زیست، تکثیر و تعاملات میکروب‌های شکمبه با مواد تلقیحی کافی نیست.

هدف از انجام این آزمایش، بررسی فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما پس از تلقیح باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز شامل *باسیلوس لیچنیفورمیس*[۹]، *آکروباکتریوم اینترمدیوم*[۱۰] و *میکروباکتریوم پلادیکولا*[۱۱] به شیرابه شکمبه در شرایط برون‌تنی بود.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورد آزمون

در پژوهش حاضر از سه گونه باکتری تجزیه کننده لیگنوسلولز شامل *باسیلوس لیچنیفورمیس*، *آکروباکتریوم اینترمدیوم* و *میکروباکتریوم پلادیکولا* که از روده موریانه جدا شده و آماده سازی شده بودند استفاده شد. باکتری های مزبور به شیرابه شکمبه افزوده شد و اثر آن‌ها در شرایط برون‌تنی مورد بررسی قرار گرفت. این باکتری‌ها در محیط کشت مایع محلول نمک‌های پایه[۱۲] (شامل ۷ گرم پتاسیم هیدروژن فسفات، ۳ گرم پتاسیم دی

هیدروژن فسفات، ۱ گرم سولفات آمونیوم و ۰/۱ گرم سولفات منیزیم ۷ آبه در ۱ لیتر آب مقطر) حاوی انواعی از لیگنین و لیگنوسلولز، که از کاه گندم و خاک اره تهیه گردیده بودند (برجی، ۱۳۸۲)، کشت داده شدند و با دو روش بیوشیمیایی و مولکولی شناسایی شدند. لیگنین‌ها و مواد لیگنوسلولزی مذکور به عنوان تنها منبع انرژی و کربن در محیط کشت جهت رشد ایزوله‌ها قرار داده شدند.

آزمون تولید گاز

جهت انجام آزمون تولید گاز، شیرابه شکمبه از ۲ راس گاو هلشتاین فیستولاگذاری شده، قبل از خوراک‌دهی وعده صبح توسط لوله پلاستیکی و پمپ خلاء جمع‌آوری گردید. حیوانات با استفاده از جیره حاوی ۶۰ درصد علوفه و ۴۰ درصد کنسانتره به مدت ۲ هفته تغذیه می‌شدند. جیره آزمایشی محتوی ۴۰ درصد کاه گندم، ۱۰ درصد سیلاژ ذرت، ۱۰ درصد یونجه خشک، ۲۷ درصد بلغورذرت،۱۱ درصد سبوس گندم، ۰/۹ درصد اوره، ۰/۵۵ درصد کربنات کلسیم، ۰/۲۵ درصد مواد معدنی و ویتامینه و ۰/۲۵ درصد نمک بر حسب ماده خشک بود. مایع شکمبه بلافاصله به وسیله ۴ لایه پارچه متقال صاف گردید و سپس به درون بطری در داخل فلاسک عایق‌دار آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس مایع شکمبه سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. جهت حصول اطمینان از شرایط بی‌هوازی، گاز دی اکسید کربن به مایع شکمبه صاف شده تزریق گردیده و هم‌چنین، قبل از استفاده جهت انکوباسیون تیمارها در حمام آب گرم با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز جداشده از روده موریانه شامل *باسیلوس لیچنیفورمیس*، *آکروباکتریوم اینترمدیوم* و *میکروباکتریوم پالادیکولا* به شیرابه شکمبه افزوده شدند و اثر آن-ها بر روی تخمیر پذیری کاه گندم و سرشاخه خرما (۸ تیمار؛ ۳ باکتری × ۲ سوبسترا + ۲ شاهد) به روش آزمون تولید گاز مورد بررسی قرار گرفت (Makkar ، ۲۰۱۰). دو سری آزمون تولید گاز به طور همزمان انجام شد. در سری اول، ابتدا میزان ۵۰۰ میلی‌گرم کاه گندم یا سرشاخه خرما (آسیاب شده با اندازه ذرات ۱ میلی‌متر) به داخل هر ویال قرار داده شد. سپس، هر ویال که از قبل دمای آن با قرار دادن در بن‌ماری به ۳۹ درجه‌سانتی‌گراد رسیده بود، با ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه و ۳۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی تلقیح گردید (Makkar ، ۲۰۱۰). بلافاصله، در شرایط استریل میزان ۲ میلی‌لیتر کشت تازه ازهر کدام از ایزوله‌های میکروبی، که ۲۴ ساعت قبل در محیط کشت مایع نوترینت براث[13] کشت داده شده بودند، به هر ویال تلقیح گردید. ترکیب شیمیایی محیط کشت نوترینت براث شامل ۱ گرم عصاره گوشت، ۲ گرم عصاره مخمر، ۵ گرم پپتون و ۵ گرم کلرید سدیم در ۱ لیتر آب مقطر بود (Fahy و Persley ،۱۹۸۳). به تیمار شاهد نیز فقط میزان دو میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث (فاقد هر گونه باکتری) افزوده شد. میزان ۳ ویال نیز به عنوان بلانک[14] (حاوی فقط مایع شکمبه و بزاق مصنوعی) در نظر گرفته شد. سپس در ویال‌ها بسته شد و در بن‌ماری با دمای حدود ۳۹ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از انکوباسیون اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری فراسنجه‌های تولید گاز، میزان ۴ تکرار به ازای هر تیمار در نظر گرفته شد. برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادله زیر استفاده گردید (Ørskov و McDonald ، ۱۹۷۹):

$$P = b(1 - e^{-ct})$$

در این معادله، b گاز تولیدی از بخش تخمیر پذیر (میلی‌لیتر)، c نرخ تولید گاز در ساعت، t زمان انکوباسیون بر حسب ساعت و P میزان گاز تولیدی (میلی‌لیتر) در زمان مورد نظر می‌باشد.

سری دوم آزمون تولید گاز با ۴ تکرار به ازای هر تیمار و به منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک، pH و نیتروژن آمونیاکی شکمبه و ضریب تفکیک[15] طراحی شد. پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون، ابتدا میزان گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید. سپس در ویال‌ها باز گردیده و pH آن‌ها به وسیله دستگاه pH متر (مدل ۷۴۴؛ شرکت Metrohm سوئیس) ثبت گردید. محتوای هر ویال با ۴۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری و خشک گردید. از

اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون، میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک محاسبه گردید. جهت تعیین میزان نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های سوپرناتانت (۵ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال مخلوط شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ضریب تفکیک پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون به صورت نسبت ماده آلی واقعاً تجزیه شده به حجم گاز تولیدی پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون محاسبه گردید (Blummel و همکاران، ۱۹۹۴).

میزان قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده آلی و انرژی قابل متابولیسم به ترتیب بر اساس معادلات زیر تخمین زده شد (Menke و Steingass ، ۱۹۸۸):

$$IVOMD\ (g/kg\ OM) = 148.8 + 8.89\ GAS + 4.50\ CP + 6.51\ XA$$

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.20 + 0.136\ GAS + 0.057\ CP + 0.0029\ CP2$$

که در این معادلات، IVOMD [16] میزان قابلیت هضم ماده آلی؛ ME انرژی قابل متابولیسم؛ CP میزان پروتئین خام به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک؛ XA خاکستر به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک و GAS میزان گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

قابلیت هضم دو مرحله‌ای مواد مغذی

قابلیت هضم برون‌تنی مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما پس از انتقال ۲ میلی‌لیتر از هر کدام از باکتری‌های مورد آزمون به شیرابه شکمبه (مشابه آزمون تولید گاز)، به روش هضم دو مرحله‌ای Tilly و Terry (۱۹۶۳) صورت گرفت. در این آزمایش برای هر تیمار میزان هشت تکرار در نظر گرفته شد. در نهایت، قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، فیبر نامحلول در شوینده خنثی[17] و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی[18] تعیین گردید.

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

میزان ماده خشک نمونه‌ها در آون با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت تعیین گردید (AOAC ، ۱۹۹۰). میزان خاکستر خام در کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین شد و میزان ماده آلی از اختلاف بین وزن ماده خشک نمونه اولیه با وزن خاکستر محاسبه گردید (AOAC ، ۱۹۹۰). میزان ADF وNDF به ترتیب بر اساس روش‌های AOAC (۱۹۹۰) و Van Soest و همکاران (۱۹۹۱) گردید. میزان نیتروژن آمونیاکی مایع شکمبه با استفاده از معرف‌های فنول و هیپوکلریت و طبق روش Broderick و Kang (۱۹۸۰) اندازه‌گیری شد. برای تعیین قابلیت هضم مواد مغذی در آزمایش هضم دو مرحله‌ای، از رابطه زیر استفاده گردید:

قابلیت هضم ماده مغذی (٪) = [(میزان ماده مغذی در سوبسترای اولیه (mg) – میزان همان ماده مغذی در بقایا (mg))/ میزان ماده مغذی در سوبسترای اولیه (mg)]× ۱۰۰

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌های مربوط به تولید گاز و قابلیت هضم نمونه‌ها در هر سوبسترا، با استفاده از رویه GLM و توسط نرم افزار SAS (۲۰۰۱) در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی به صورت مدل زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

در این مدل Y_{ij}، μ، T_i و e_{ij} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر تیمار آزمایشی iام و اثر خطای آزمایشی بود. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و در سطح معنی‌داری ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

روده موریانه‌ها به دلیل غلظت بالای اسیدهای چرب فرار، حضور باکتری‌های تخمیر کننده و پروتوزوآ، و انجام فرآیندهای بی‌هوازی مانند هومواستوژنیک و متانوژنیک، شباهت بسیاری با شکمبه نشخوارکنندگان دارد (Brune,۱۹۹۸). باکتری‌های مورد مطالعه در این تحقیق از طریق کشت محتویات روده موریانه‌های *میکروسروترمس دایورسوس* [19] جداسازی گردیدند. نتایج آزمایشات روی باکتری‌های جداسازی شده جهت انتقال آن‌ها به

شیرابه شکمبه امیدوار کننده بود، زیرا شرایط رشدی آن‌ها با شرایط حاکم بر شکمبه مشابهت داشت. به عنوان مثال، هر ۳ باکتری بی‌هوازی اختیاری، مزوفیل با دمای بهینه رشد۳۷ درجه سانتی‌گراد و دارای pH بهینه رشد برابر ۷ بودند.

فراسنجه‌های تولید گاز

اثر انتقال باکتری‌های تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از روده موریانه به شیرابه شکمبه روی فراسنجه‌های تولید گاز کاه گندم در جدول ۱ نشان داده شده است. عمده فراسنجه‌های شکمبه‌ای مورد آزمون تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفتند. به طوری که میزان گاز تولیدی پس از ۱۴۴ ساعت انکوباسیون، پتانسیل (b) و نرخ تولید گاز (c)، قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی، برآورد انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک و میزان pH در همه تیمارهای آزمایشی مشابه بودند (P>۰/۰۵). هرچند در تیمار تلقیح شده با ایزوله *آکروباکتریوم*، اکثر پارامترها (به استثنای ضریب تفکیک) از لحاظ عددی مقادیر بیشتری را نشان دادند. تلقیح گونه‌های باکتریایی به شیرابه شکمبه به طور قابل ملاحظه‌ای سبب افزایش غلظت نیتروزن آمونیاکی گردید (P<۰/۰۵)، به طوری که بیشترین و کمترین میزان آن به ترتیب در تیمار تلقیح شده با گونه *آکروباکتریوم* و تیمار شاهد مشاهده گردید.

انکوباسیون سرشاخه خرما با ایزوله‌های باکتریایی نیز، روند مشابهی با کاه گندم را نشان داد (جدول ۲). به طوری که اختلافی در میزان گاز تولیدی، پتانسیل و نرخ تولید گاز، قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک و ماده آلی، برآورد انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک و میزان pH بین تیمارهای آزمایشی وجود نداشت (P>۰/۰۵). غلظت نیتروژن آمونیاکی با تلقیح گونه‌های باکتریایی نسبت به تیمار شاهد به طور معنی‌داری افزایش نشان داد (P<۰/۰۵)، و تیمار تلقیح شده با ایزوله *آکروباکتریوم* بیشترین و تیمار بدون تلقیح باکتریایی کمترین میزان نیتروژن آمونیاکی را به خود اختصاص دادند.

جدول ۱- اثر تلقیح گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش بر فراسنجه‌های تخمیر کاه گندم با استفاده از تولید گاز

تیمارهای آزمایشی	GP_{144}	b	c	IVDMD	IVOMD	ME	PF	pH	NH_3-N
کاه (شاهد)	۶۶/۹	۸۲/۴	۰/۰۱۳	۴۸/۸	۳۷/۵	۵/۶۹	۳/۵۷	۶/۵۰	۱۴/۶[c]
کاه + آکروباکتریوم	۷۰/۱	۸۷/۱	۰/۰۱۶	۵۰/۹	۳۹/۸	۵/۸۴	۳/۵۲	۶/۴۱	۱۶/۱[a]
کاه + باسیلوس	۶۷/۸	۸۶/۱	۰/۰۱۴	۴۹/۲	۳۸/۵	۵/۷۵	۳/۶۸	۶/۴۹	۱۵/۳[bc]
کاه + میکروباکتریوم	۶۷/۱	۸۳/۴	۰/۰۱۵	۴۹/۴	۳۸/۹	۵/۷۴	۳/۴۹	۶/۴۵	۱۵/۴[ab]
اشتباه معیار میانگین	۱/۳۲	۲/۲۶	۰/۰۰۰۹۶	۱/۸۵	۰/۶۹	۰/۰۶۸	۰/۰۷۸	۰/۰۲۱	۰/۲۹
احتمال معنی‌داری	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۲۱	۰/۴۴	۰/۴۲	۰/۴۹	۰/۰۲۲

GP_{144}: حجم گاز تولیدی پس از ۱۴۴ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر)؛ b: پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)؛ c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)؛ IVDMD: قابلیت هضم ماده خشک (درصد)؛ IVOMD: قابلیت هضم ماده آلی (درصد)؛ ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)؛ PF: ضریب تفکیک؛ NH3-N: نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)؛ حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

جدول ۲- اثر تلقیح گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش بر فراسنجه‌های تخمیر سرشاخه خرما با استفاده از تولید گاز

تیمارهای آزمایشی	GP_{144}	b	c	IVDMD	IVOMD	ME	PF	pH	NH_3-N
سرشاخه (شاهد)	۴۳/۵	۵۱/۶	۰/۰۱۴	۳۹/۷	۳۲/۵	۴/۷۳	۴/۵۹	۶/۸۰	۱۲/۸[b]
سرشاخه + آکروباکتریوم	۴۶/۲	۵۵/۵	۰/۰۱۶.	۴۲/۵	۳۴/۱	۴/۹۰	۴/۴۷	۶/۷۲	۱۴/۰[a]
سرشاخه + باسیلوس	۴۳/۹	۵۳/۸	۰/۰۱۵	۴۳/۱	۳۲/۹	۴/۷۷	۴/۷۴	۶/۷۶	۱۳/۵a[b]
سرشاخه + میکروباکتریوم	۴۴/۹	۵۲/۹	۰/۰۱۴	۴۰/۹	۳۳/۲	۴/۸۳	۴/۶۸	۶/۷۴	۱۳/۳[b]
اشتباه معیار میانگین	۱/۱۳	۱/۷۵	۰/۰۰۰۷	۱/۲۲	۰/۵۱	۰/۰۵۱	۰/۱۴	۰/۰۱۶	۰/۲۳
احتمال معنی‌داری	۰/۱۳	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۲۲	۰/۴۳	۰/۱۸	۰/۵۶	۰/۲۱	۰/۰۲

TGP_{144}: حجم گاز تولیدی پس از ۱۴۴ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر)؛ b: پتانسیل تولید گاز از بخش قابل تخمیر (میلی‌لیتر)؛ c: نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت)؛ IVDMD: قابلیت هضم ماده خشک (درصد)؛ IVOMD: قابلیت هضم ماده آلی (درصد)؛ ME: انرژی قابل متابولیسم (مگاژول در کیلوگرم ماده خشک)؛ PF: ضریب تفکیک؛ NH3-N: نیتروژن آمونیاکی (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)؛ حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

جدول ۳- اثر تلقیح گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد) کاه گندم

تیمارهای آزمایشی	ماده خشک	ماده آلی	فیبر نامحلول در شوینده خنثی	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی
کاه (شاهد)	۳۴/۸	۳۳/۶	۳۱/۸	۳۰/۸
کاه + آکروباکتریوم	۳۷/۹	۳۷/۲	۳۳/۷	۳۱/۹
کاه + باسیلوس	۳۵/۶	۳۴/۶	۳۴/۱	۳۱/۸
کاه + میکروباکتریوم	۳۷/۶	۳۶/۲	۳۳/۶	۳۲/۳
اشتباه معیار میانگین	۱/۲۳	۱/۳۴	۰/۸۸	۰/۹۷
احتمال معنی‌داری	۰/۱۸	۰/۲۵	۰/۱۷	۰/۳۴

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما به روش هضم دو مرحله‌ای پس از انتقال ایزوله‌های باکتریایی به شیرابه شکمبه به ترتیب در جداول ۳ و ۴ نشان داده شده است.

انتقال ایزوله‌های باکتریایی جدا شده از روده موریانه در هیچ یک از دوسوبسترا، تاثیری بر قابلیت هضم مواد مغذی نداشت (P>۰/۰۵)، به طوری که قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، NDF و ADF در تیمارهای تلقیح شده با باکتری در مقایسه با تیمار شاهد مشابه بود. هرچند که در هر دو سوبسترا، تلقیح باکتری *آکروباکتریوم* به شیرابه شکمبه قابلیت هضم اکثر مواد مغذی مورد بررسی را نسبت به سایر تیمارهای آزمایشی از لحاظ عددی افزایش داد.

جدول ٤- اثر تلقیح گونه‌های باکتریایی مورد آزمایش بر قابلیت هضم مواد مغذی (درصد) سرشاخه خرما

تیمارهای آزمایشی	ماده خشک	ماده آلی	فیبر نامحلول در شوینده خنثی	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی
سرشاخه (شاهد)	۲۹/۲	۲۸/۷	۲۶/۱	۲۴/۹
سرشاخه + آکروباکتریوم	۳۱/۵	۳۰/۵	۲۷/۱	۲۵/۷
سرشاخه + باسیلوس	۲۹/۷	۲۸/۴	۲۶/۳	۲۶/۴
سرشاخه + میکروباکتریوم	۲۹/۹	۳۰/۱	۲۶/۹	۲۴/۷
اشتباه معیار میانگین	۱/۳۴	۱/۱۱	۰/۶۷	۰/۵۳
احتمال معنی‌داری	۰/۲۱	۰/۱۹	۰/۳۹	۰/۲۲

حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد می‌باشند.

پژوهش حاضر اولین مطالعه‌ای است که در آن دستکاری اکوسیستم میکروبی شکمبه توسط انتقال باکتری‌های تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از روده موریانه بر روی کاه گندم و سرشاخه خرما مورد بررسی قرار گرفت و اطلاعات چندانی در این حوزه از تغذیه نشخوارکنندگان وجود ندارد. باید اذعان نمود که در این مطالعه نتایج رضایت‌بخش و قابل قبولی از نظر بهبود تجزیه دیواره سلولی و قابلیت هضم مواد مغذی در هر دو سوبسترا یعنی کاه گندم و سرشاخه خرما توسط انتقال ایزوله‌های مورد بررسی در مقایسه با تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) حاصل نشد. این بدان معناست که ممکن است ایزوله‌های مذکور قابلیت زنده‌مانی، تثبیت و تکثیر در محیط جدید (شیرابه شکمبه) را نداشته‌اند. هرچند، زنده‌مانی باکتری‌های مذکور پس از انتقال به شیرابه شکمبه مورد ارزیابی قرار نگرفت. در چند مطالعه ارگانیسم‌های تلقیحی به شیرابه شکمبه معمولاً در شکمبه ناپدید گردیدند که پروتوزوای شکمبه ممکن است نقش مهمی در این امر بازی نمایند (Krause و همکاران، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۳). از طرفی، ممکن است ایزوله‌های مذکور زنده مانده باشند، اما قادر به تولید و ترشح آنزیم‌ها جهت تجزیه مواد لیگنوسلولزی نبوده‌اند. یک احتمال دیگر این است که ممکن است آنزیم‌های ترشحی آن‌ها توسط سایر میکروب‌های شکمبه به عنوان منبع پروتئین مصرف شده باشد.

به هر حال، علی رغم تشابهات موجود بین روده موریانه‌ها و شکمبه نشخوارکنندگان، اختلافاتی نیز در این خصوص وجود دارد (برجی، ۱۳۸۲). به عنوان مثال، عمده جمعیت میکروبی جدا شده از روده موریانه‌ها مقاوم به اکسیژن، بی‌هوازی اختیاری و یا حتی هوازی اجباری هستند (برجی، ۱۳۸۲). به‌علاوه، باید بیان نمود که در غیاب اکسیژن، توضیح قابل توجهی جهت تجزیه پلی‌فنول‌های جیره‌ای از جمله لیگنین و ترکیبات هوموسی وجود ندارد. از همه مهم‌تر این که مدل موجود در مورد روده موریانه نمی‌تواند توجیه کننده این حقیقت باشد که از نقطه نظر فیزیکوشیمیایی، اکوسیستمی به کوچکی روده موریانه (حتی در صورتی که اکسیژن از طریق انتشار به سرعت و پیوسته خارج شود) بتواند شرایط بی‌هوازی خود را در محیطی هوازی حفظ نماید.

با مقایسه پارامترهای اندازه‌گیری شده در سوبستراهای مورد آزمون، میزان تولید گاز، فراسنجه‌های تخمیر و قابلیت هضم مواد مغذی در کاه گندم بیشتر از سرشاخه خرما بود، که علت آن احتمالاً به دلیل محتوای بیشتر کربوهیدارت قابل هضم و نیز لیگنین کمتر در کاه گندم بوده باشد.

مطالعات قابل توجهی جهت دستکاری شرایط تخمیر شکمبه یا دستگاه گوارش نشخوارکنندگان به منظور افزایش هضم مواد لیگنوسلولزی یا سایر موارد خوراکی با استفاده از مواد تلقیحی صورت گرفته است. استفاده از مواد تلقیحی در این مطالعات در دامنه‌ای از موفقیت تا شکست بوده است. بر اساس گزارش Hungate (۱۹۶۶)، با تلقیح باکتری‌های تجزیه کننده فیبر به شکمبه، مشاهداتی مبنی بر بهبود تجزیه فیبر در شکمبه مشاهده نشد. علوفه لگوم *لئوکانا لئوکوسفالا*[۲۰] مواد گواترزا به نام ۳-هیدروکسی ۴-پیریدون تولید می‌کند که منجر به مسمومیت در

نشخوارکنندگان می‌گردد. باکتری *سینرزیستز جوننری*[21] که معمولاً در شکمبه بزهای هاوایی وجود دارد، قادر به تجزیه این ماده است. زمانی که این ارگانیسم به نشخوارکنندگان حساس تغذیه شده با لگوم *لئوکانا لئوکوسفالا* تلقیح گردید، آن‌ها نسبت به مسمومیت مقاومت نشان دادند (Allison و همکاران،۱۹۸۳ ؛ McSweeney و همکاران، ۱۹۹۳).

همچنین، اخیراً، سویه TDGB 406 باکتری *استرپتوکوس گالولیتیکوس*، که یک باکتری با قابلیت تجزیه‌کنندگی تانن می‌باشدبه عنوان پروبیوتیک همراه با برگ‌های *کوئرکوس سِمی‌کارپیفولیا* که غنی از تانن است، به بز ها تغذیه گردید (Kumar و همکاران، ۲۰۱۴). نتایج این تحقیق نشان دادند که باکتری مذکور سبب بهبود عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) گردید. در پژوهشی، ۳ باکتری *انتروباکتر کلواکا*[22]، *آکروباکتریوم آنتروپی*[23] و *باسیلوس اسفریکوس*[24] از دستگاه گوارش موریانه‌های *آناکانتوترمس واگانژ*[25] جداسازی گردید که قادر به رشد روی کاه گندم و خاک اره و انواعی از لیگنین‌های استخراج شده از آن‌ها بودند (برجی، ۱۳۸۲). در این مطالعه سویه *باسیلوس اسفریکوس* فعالیت لیگنولایتیکی بالاتری نسبت به دو گونه دیگر از خود نشان داد. اما مطالعه‌ای جهت انتقال آن‌ها به شیرابه شکمبه صورت نگرفت.

استفاده از باکتری‌های نوترکیب (تغییر یافته از نظر ژنتیکی) جهت بهبود هضم فیبر در شکمبه نیز موضوع تحقیقات بسیاری بوده است. کاربرد این باکتری‌ها با این فرض که میکروب‌های شکمبه قادر به تولید مخلوط کاملی از آنزیم‌ها جهت حداکثر نمودن تجزیه دیواره سلولی نیستند، صورت گرفته است. به عنوان مثال، *رومینوکوکوس* و *فیبروباکتر* قادر به تولید اگزوسلولازهای فعال جهت تجزیه سلولز کریستاله نیستند، بنابراین، افزودن این قابلیت به آن‌ها می‌تواند توانایی آن‌ها را افزایش دهد. در مطالعاتی مشخص شد که تغییر ژنتیکی باکتری‌های *رومینوکوکوس* و *فیبروباکتر* (مهم‌ترین باکتری‌های تجزیه کننده فیبر شکمبه) تاثیری بر افزایش قابلیت هضم دیواره سلولی نداشت (Beard و همکاران،۱۹۹۵ ؛ Clark و همکاران، ۱۹۹۴؛ Gobius و همکاران، ۲۰۰۲) اما در *بوتیریویبریو فیبروسالونس*، *استرپتوکوکوس بویس* (Whitehead ، ۱۹۹۲) و گونه‌های *پریوتلا* (Shoemaker و همکاران، ۱۹۹۱) نتایج امیدوارکننده بوده است. *بوتیریویبریو فیبروسالونس* از لحاظ اکولوژیکی یک باکتری ارزشمند است که می‌تواند به عنوان یک انتخاب مطلوب جهت تغییر ژنتیکی درآن به منظور تجزیه مناسب فیبر در نظر گرفته شود. تغییر ژنتیکی این باکتری توسط گلیکوزیل هیدرولاز موفقیت آمیز بوده به نحوی که قابلیت هضم برون‌تنی فیبر را بهبود می بخشد (Krause و همکاران، ۲۰۰۱؛ Gobius و همکاران، ۲۰۰۲). اما این خصوصیت هنوز قابل مقایسه با عملکرد باکتری‌های با قدرت تجزیه‌کنندگی فیبر بیشتر مانند گونه‌های *فیبروباکتر* و *رومینوکوکوس* نیست. مطالعات دیگر نیز ثابت نمودند که باکتری‌های نوترکیب در شرایط برون‌تنی قابل مقایسه با سویه‌های باکتریایی سلولایتیک *رومینوکوکوس* نبودند و پس از ۱۵-۱۰ روز در شکمبه ناپدید شدند (Krause و همکاران، ۲۰۰۱).

در مطالعه‌ای (Cotta و همکاران، ۱۹۹۷) سویه باکتریایی *باکتریویدس تتایوتاومیکرون*[26] از کولون انسان جدا گردید و با آنزیم گلوکاناز دستکاری شد. در سیستم محیط کشت با مخلوط جمعیت میکروبی شکمبه، باکتری مذکور تنها زمانی که کوندرویتین سولفات (یک موکوپلی ساکارید مورد استفاده توسط این باکتری) به محیط کشت اضافه شد، وجود داشت. در آزمایش کشت پیوسته دیگری توسط Ziemer و همکاران (۲۰۰۲) این باکتری به مدت ۱۴۴ ساعت پس از تلقیح به محیط کشت به میزان ۱ درصد جمعیت کل میکروبی وجود داشت و افزایش اندکی در هضم فیبر توسط آن مشاهده گردید. در هر دو مطالعه مذکور مایع شکمبه استفاده شده فاقد پروتوزوا بود.

در پژوهش حاضر غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمارهای تلقیح شده با باکتری در هر دو سوبسترا در مقایسه با تیمار شاهد افزایش نشان داد. در این مطالعه زنده‌مانی، تثبیت و تکثیر ایزوله‌های تلقیح شده پس از انتقال به شیرابه شکمبه مورد آزمون قرار نگرفت،

بنابراین اطلاعاتی در این زمینه حاصل نگردید. هم‌چنین، تعاملات میکروارگانیسم‌های شکمبه با ایزوله‌های تلقیح شده روی میزان نیتروژن آمونیاکی می‌تواند جالب توجه باشد که در این پژوهش صورت نگرفت.

یکی از دلایل احتمالی افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی ممکن است بلع باکتری‌های تلقیح شده توسط پروتوزوای شکمبه و به تبع آن افزایش میزان نیتروژن آمونیاکی بوده باشد. زیرا پروتوزوا به طور معمول نقش قابل توجهی در بلع باکتری‌های شکمبه دارند (Coleman و Sandford، ۱۹۷۹؛ Coleman و Hall ، ۱۹۸۴).

مطابق با نتایج پژوهش حاضر، مطالعات تلقیح میکروب به شیرابه شکمبه نشان داده است که ارگانیسم‌های تلقیحی معمولاً در شکمبه ناپدید گردیدند که پروتوزوای شکمبه ممکن است نقش مهمی در این امر بازی نماید (Krause و همکاران، ۲۰۰۱ و ۲۰۰۳). زمانی که باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲۷] درشکمبه تلقیح گردید، جمعیت آن به طور قابل ملاحظه‌ای در حضور پروتوزوا کاهش یافت (Sharp و همکاران، ۱۹۹۴). در مقابل، در پژوهش Fonty و همکاران (۱۹۸۸) هیچ کاهشی در جمعیت *فیبروباکتر سوکسینوژنز* در شکمبه در غیاب پروتوزوآ مشاهده نشد. به علاوه، مطالعات برون‌تنی با مایع شکمبه گوسفند نیز نشان دادند که تجزیه *متانوبروی‌باکتر* و *سلونوموناس رومینتیوم* در غیاب پروتوزوآ به طور معنی‌داری کاهش یافت (Newbold و همکاران، ۱۹۹۶).

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق حاضر نشان دادند که انتقال باکتری‌های تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از روده موریانه شامل *باسیلوس لیچنیفورمیس*، *آکروباکتریوم اینترمدیوم* و *میکروباکتریوم پالادیکولا* به شیرابه شکمبه، تاثیری بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما در شرایط برون‌تنی نداشت، اما میزان نیتروژن آمونیاکی افزایش یافت. تحقیقات بیشتر روی باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز روده موریانه‌ها، به ویژه بررسی زنده‌مانی آن‌ها پس از انتقال به شیرابه شکمبه به وسیله تکنیک‌های مولکولی، اثرات متقابل آن‌ها با میکروارگانیسم‌های شکمبه، و در نهایت اثر انتقال آن‌ها به شکمبه دام زنده و بررسی پارامترهای عملکردی ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌داند از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، به خاطر حمایت مالی پژوهش و همچنین از همکاری دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان، تشکر و قدردانی به عمل آید.

1- *Fibrobacter succinogenes*
2- *Ruminococcus albus*
3- *Ruminococcus flavefaciens*
4- *Butyrivibrio fibrisolvens*
5- *Prevotella*
6- *Neocallimastix*
7- *Streptococcus gallolyticus*
8- *Quercus semicarpifolia*
9- *Bacillus licheniformis*
10- *Ochrobactrum intermedium*
11- *Microbacterium paludicola*
12- *Microcerotermes diversus*
13- Sterile Basal Media
14- Nutrient Broth
15- Blank
16- Partitioning Factor
17- Neutral Detergent Fiber
18- Acid Detergent Fiber
19- *Leucaena leucocephala*
20- *Synergistes jonesii*
21- *Enterobacter cloacae*
22- *Ochrobacterium anthropi*
23- *Bacillus sphaericus*
24- *Anacanthotermes vagans*
25- *Bacteroides thetaiotaomicron*
26- *Lactobacillus plantarum*
27- *Lactobacillus plantarum*

منابع

برجی، م. (۱۳۸۲). بررسی امکان تجزیه پلی‌ساکاریدها و لیگنین کاه به وسیله میکروب‌های روده‌ای موریانه‌ها. رساله دکتری تخصصی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

Allison, M. J., Cook, H. M. and Jones, R. J. (1983). Detoxification of 3-hydroxy-4(1H)-pyridone, the goiteogenic metabolite of mimosine, by rumen bacteria from Hawaiian goats.XVII Conference of Rumen Function, Chicago, IL.

AOAC. (1990). Official methods of analysis, 15th ed, USA, Washington, D.C.

Attwood, G. T., Lockington, R. A., Xue, G. P. and Brooker, G. P. (1988) Use of unique gene sequence as a probe to enumerate a strain of *Bacteroides ruminicola* introduced into the rumen. *Journal of Applied Bacteriology*. 67:177-183.

Beard, C. E., Hefford, M. A., Forster, R. J., Sontakke, S., Teather, R. M. and Gregg, K. (1995). A stable and efficient transformation system for *Botyrivibrio fibrosalvens* OB156. *Current Microbiology*. 30:105-109 .

Blummel, M., Steingas, H. and Becker, K. (1994). The partitioning factor of *in vitro* fermentation products and its bearing for voluntary feed intake. Proceedings of the Society of Nutrition Physiology 3, Abstr. 123.

Broderick, G. and Kang, J. H. (1980). Automated simultaneous determination of ammoniaand total amino acids in ruminal fluid and *in vitro* media. *Journal of Dairy Science*. 63:64-75.

Brune, A. (1998). Termite guts: the worlds smallest bioreactors. *Trends in Biotechnology*. 16:16-21.

Clark, R. G., Cheng, K. J., Selinger, L. B. and Hynes, M. F. (1994). Aconjucative transfer system for rumen bacterium *Botyrivibrio fibrosalvens*, based on Tn916-mediated transfer of the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110. Plasmid, 32, 295-305.

Coleman, G. S. and Hall, F. J. (1984). The uptake and utilization of *Entodinium caudatum*, bacteria, free amino acids, and glucose by the rumen ciliate *Entodinium bursa*. *Journal of Applied Bacteriology*. 56:283-294.

Coleman, G. S. and Sandford, D. C. (1979). The uptake and utilization of bacteria, amino acids, and nucleic acid components by the rumen ciliate *Eudiplodinium maggi*. *Journal of Applied Bacteriology*. 47: 409-419.

Cotta, M. A., Whitehead, T. R. and Rasmussen, M. A. (1997). Survival of the recombinant *Bacteroides thetaiotaomicron* strain BTX in *in vitro* rumen incubations. *Journal of Applied Microbiology*. 82:743-750.

Dehority, B. A. and Tirabasso, P. A. (1998). Effect of ruminal cellulytic bacteria on *in situ* digestion of forage cellulose. *Journal of Animal Science*. 76:2905-2911.

Fahy, P. C. and Persley, G. J., 1983. Plant Bacterial Diseases, A Diagnostic Guide. Academic Press, N. Y., NY. 393 p.

Fonty, G., Gouet, P. and Jouany, J.P. (1988). Establishment of *Bacteriodes succinogenes* and measurement of the main digestive parametes in the rumen of gnotobiotic lambs. *Canadian Journal of Animal Science*. 34:938-946.

Gobius, K. S., Xue, G. P., Aylward, J. H., Dalrymple, B. P., Swadling, Y. J., McSweeney, C. S. and Krause, D. O. (2002). Transformation and expression of an anaerobic fungal xylanase in several strains of the rumen bacterium *Butyrivibrio fibrosalvens*. *Journal of Applied Microbiology*. 93:122-133.

Hungate, R. E. (1966). The rumen and its microbes. Academic press, New York.

Krause, D. O., Bunch, R. J., Conlan, L. L., Kennedy, P. M., Smith, W. J., Mackei, R. I. and McSweeney, C. S. (2001). Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. Does not result in persistence, but changes in other microbial populations occure that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. Microbiology, 147, 1719-1729.

Krause, D. O., Denman, S. E., Mackie, R. I., Morrison, M., Rae, A. L., Attwood, G. T. and McSweeney, C. S. (2003). Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiology Reviews, 27, 663-693.

Kumar, K., Chaudhary, L. C., Agarwal, N. and Kamra, D. N. (2014). Effect of feeding tannin degrading bacterial culture (*Streptococcus gallolyticus* strain TDGB 406) on nutrient utilization, urinary purine derivatives and growth performance of goats fed on Quercussemicarpifolia leaves. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 98:879-885.

Makkar, H. P. S. (2010). *In vitro* screening of feed resources for efficiency of microbial protein synthesis. In: Verco, PE, Makkar HPS, Schlink AC. (Eds.), *In Vitro* Screening of Plant Resources for Extra-nutritional Attributes in Ruminants: Nuclear and Related Methodologies. IAEA, Dordrecht, the Netherlands; 2010. pp. 107-144.

McSweeney, C. S., Allison, M. J. and Mackie, R. I. (1993). Amino acid utilization by the ruminal bacterium *Synergistes jonessi* strain 78-1. *Archives of Microbiology*. 159:131-135 .

Menke, K. H. and Steingass, H. (1988). Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development*. 28: 47-55.

Miyagi, T., Kaneichi, K., Aminov, R. I., Kobayashi, Y., Sakka, K., Hoshino, S. and Ohmiya, K. (1995). Enumeration of transconjugated *Ruminococcus albus* and its survival in the goat rumen ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 2030-2032.

Newbold, C. J., Ushida, K., Morvan, B., Fonty, G. and Jouany, J. P. (1996). The role of ciliate protozoa in the lysis of methanogenicarchaea in rumen fluid. *Letters in Applied Microbiology*. 23:421-425.

Ørskov, E. R. and McDonald, I. (1979). The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science*. 92:499-503.

Santra, A. and Karim, S. A. (2003). Rumen manipulation to improve animal productivity. Asian-Australian Journal of Animal Science, 16, 748-763.

SAS. (2001). Statistical Analysis System. Users Guide: Statistics Version 8.2. SAS Institute, Cary, NC, USA.

Sharp, R., Hazelwood, G. P., Gilbert, H. J. and O,Donnell, A. G. (1994). Unmodified and recombinant strains of *Lacrobacillus plantarum* are rapidly lost from the rumen by protozoal predation. *Journal of Applied Bacteriology*. 76:110-117.

Shoemaker, N. B., Anderson, K. L., Smithson, S. L., Wang, G. R. and Salyers, A. A. (1991). Conjugal transfer of a shuttle vector from the human colonic anaerobe *Bacteroides uniformis* to the ruminal anaerobe *Prevotella* (Bacteroides) *ruminicola* B14. *Applied and Environmental Microbiology*. 57:2114-2120.

Teather, R. M., Hefford, M. A. and Forster, R. J. (1997). Genetics of bacteria. In: The rumen microbial ecosystem (Hobson, P.N., and Stewart, C.S., Eds.), pp. 427-466. Blackie, Melbourne.

Tilly, J. M. A. and Terry, R. A. (1963). A two stage technique for in vitro digestion of forage crops.Journal of the British Grassland Society, 18, 104-111 .

Van Soest, P. J., Robertson, J. B. and Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*. 74:3583-3597.

Vercoe, P. E. and White, B. A. (1997). Genetics of ruminal anaerobic bacteria. In: gastrointestinal microbiology (Mackie, R.I., White, B.A., and Isaacson, R.E., Eds.), pp. 321-372. Chapman and Hall, New York.

Wallace, R. J. and Walker, N.D. (1993). Isolation and attempted introduction of sugar alcohol-utilizing bacteria in the sheep rumen. *Journal of Applied Bacteriology*. 74: 353-359 .

Whitehead, T. R. (1992). Genetic transformation of the ruminal bacterium *Botyrivibrio fibrosalvens* and *streptococcus bovis* by electroporation. *Letters in Applied Microbiology*. 15:186-189.

Ziemer, C.J., Sharp, R., Stern, M.D., Whitehead, T.R. and Stahl, D.A. (2002). Persistence and functional impact of a microbial inoculant on native microbial community structure, nutrient digestion and fermentation characteristics in a rumen model. *Systematic and Applied Microbiology* .25:416-422.