نشریه پژوهش‌های علوم دامی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال۱۳۹۶/ صفحات ۶۹ تا ۸۵

تعیین دما و pH بهینه رشد باکتری‌های تجزیه کننده مواد لیگنوسلولزی جدا شده از دستگاه گوارش موریانه و اثر آن‌ها بر قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی برخی پسماندهای کشاورزی

ایوب عزیزی[1*]، طاهره محمدآبادی[2]، حسین معتمدی[3]، مرتضی چاجی[2] و حسن فضایلی[4]

تاریخ: ۹٤/۸/۲٤ تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۳

[1] استادیار گروه علوم دامی دانشگاه لرستان
[2] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
[3] استاد گروه زیست‌شناسی دانشگاه شهید چمران اهواز
[4] استاد مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور
[*] مسئول مکاتبه: Email: azizi.msc.modares@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: روده موریانه‌ها حاوی انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های تجزیه کننده مواد لیگنوسلولزی است که امکان استفاده از آنها در بهبود ارزش تغذیه‌ای پسماندهای زراعی گامی بزرگ جهت پوشش دادن کمبود خوراک دام است. **هدف**: این پژوهش به منظور تعیین دما و pH بهینه رشد باکتری‌های همزیست تجزیه کننده مواد لیگنوسلولزی جدا شده از دستگاه گوارش موریانه‌ها و بررسی قابلیت هضم و فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی کاه گندم و سرشاخه خرمای فرآوری شده با ایزوله‌های مذکور انجام شد. **روش‌کار**: برای این منظور، از سه گونه باکتری *Bacillus licheniformis* ، *Ochrobactrum intermedium* و *Microbacterium paludicola*، استفاده گردید که باکتری‌های مذکور توسط کشت محتویات روده موریانه‌ها در محیط‌های کشت حاوی انواع مختلفی از لیگنین و مواد لیگنوسلولزی جداسازی شده بودند. منحنی‌های رشد ایزوله‌ها در محیط کشت نوترینت براث به دست آمد. و سپس کاه گندم و سرشاخه خرما توسط جدایه‌های مذکور عمل‌آوری شدند. **نتایج**: رشد بهینه باکتری *B. licheniformis* در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد بود، اما در دو گونه *O. intermedium* و *M. paludicola* رشد بهینه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. رشد بهینه هر سه سویه در pH برابر با ۷ اتفاق افتاد. پس از عمل‌آوری، برای هر دو سوبسترای کاه گندم و سرشاخه خرما بیشترین حجم گاز تولیدی و قابلیت هضم ماده آلی در تیمار فرآوری شده توسط باکتری *B. licheniformis* و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$). قابلیت هضم ماده خشک، سوبسترای تجزیه شده حقیقی، انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک، pH و غلظت نیتروژن آمونیاکی در هر دو سوبسترا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. **نتیجه‌گیری نهایی**: نتایج این تحقیق نشان داد که عمل‌آوری کاه گندم و سرشاخه خرما توسط باکتری‌های جداسازی شده سبب بهبود فراسنجه‌های تخمیر شکمبه در شرایط برون‌تنی گردید.

واژگان کلیدی: مواد لیگنوسلولزی، باکتری‌های روده موریانه، دما، pH، فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی

مقدمه

پس‌ماندهای کشاورزی شامل طیف گسترده‌ای از مواد آلی گیاهی بوده و سالانه حجم زیادی از آن‌ها در جهان تولید می‌گردد (گبولاگاد ۲۰۰٦ و جوناتان و همکاران، ۲۰۰۸). لیگنوسلولز شامل ترکیبی از سلولز، همی‌سلولز و لیگنین می‌باشد که بیشترین بیوماس موجود روی زمین است (نی و توکودا ۲۰۱۳). لیگنین دارای ساختاری پیچیده، بی شکل و مقاوم بوده که از واحدهای مونومری پی- هیدروکسی فنیل پروپان تشکیل شده است (کورنول و همکاران ۲۰۰۹). این ترکیب سخت تجزیه با سلولز و همی‌سلولز پیوند شده و سبب کاهش قابلیت دسترسی میکروب‌ها به بخش کربوهیدراتی در شکمبه می‌شود. هم‌چنین، آن به عنوان سدی برای استفاده از کربوهیدرات‌های ساختمانی عمل می‌نماید (ون‌سوست ۱۹۹٤). به هر حال مواد لیگنوسلولزی به دلیل وجود بخش کربوهیدارتی، پتانسیل استفاده به عنوان یک خوراک انرژی‌زا در جیره نشخوارکنندگان را دارند (ناصحی و همکاران ۲۰۱٤). از جمله روش‌هایی که برای عمل‌آوری مواد لیگنوسلولزی جهت افزایش ارزش تغذیه‌ای آن‌ها مورد استفاده قرار گرفته است می‌توان روش‌های فیزیکی، شیمیایی، فیزیکوشیمیایی، اکسیداسیون- آبکافت و بیولوژیکی را نام برد (راحال و همکاران ۱۹۹۷ و فضائلی و همکاران ۲۰۰٤). طی دهه‌های اخیر، عمل‌آوری و غنی‌سازی مواد لیگنوسلولزی به روش بیولوژیکی مورد توجه بیشتری قرار گرفته است، زیرا این نوع عمل‌آوری نسبت به دیگر روش‌ها ارزش غذایی را به میزان بیشتری افزایش داده، سبب ایجاد آلودگی زیست محیطی کمتر، و استهلاک کمتر در تاسیسات و تجهیزات می‌شود، و مقرون به صرفه می‌باشد (راحال و همکاران ۱۹۹۳ و فضائلی و همکاران ۲۰۰٤).

موریانه‌ها فراوان‌ترین و مهم‌ترین جانوران بی‌مهره محسوب شده، و از معدود موجوداتی هستند که توانایی تجزیه مواد لیگنوسلولزی را دارند. این قابلیت عمدتاً به دلیل همزیست‌های میکروبی مستقر در دستگاه گوارش آن‌ها می‌باشد که به نحو کارآمدی از میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش خود بهره‌برداری می‌کنند، و توان تجزیه سدهای لیگنین و پلیمرهای کربوهیدراتی بیشتری را نسبت به تجزیه آنزیمی درون‌زادی موریانه دارند (هایودو و همکاران ۱۹۹۹ و برون ۲۰۰۹ و واتابل و توکودا ۲۰۱۰).

محققان با بررسی مدفوع موریانه‌ها نشان دادند که ۸۳-۵ درصد لیگنین حین عبور از دستگاه گوارش آن‌ها تجزیه گردیده است (بوتلر و باکرفیلد ۱۹۷۹ و کوکسون ۱۹۸۸). در مطالعه دیگری تولید دی اکسید کربن نشان‌دار از مواد لیگنوسلولزی خورده شده توسط موریانه‌های *Nasutitermes exitiosus* پس از جدا نمودن سر آن‌ها با گروه شاهد مشابه بود. این امر نشان دهنده این واقعیت است که فعالیت تجزیه لیگنین مشاهده شده احتمالاً مستقل از متابولیسم حیوان میزبان بوده، و مرتبط با فعالیت میکروب‌های روده آن‌هاست (کوکسون ۱۹۸۸). پژوهشگران سویه‌های باکتریایی بی‌هوازی اجباری، بی‌هوازی اختیاری و هوازی را از روده موریانه‌های پست *Mastotermes darwiniensis* و *Reticulitermes santonensis* و موریانه عالی *Nasutitermes nigriceps* در محیط‌های کشت حاوی مونومرهای لیگنین و یا سایر ترکیبات آروماتیک جداسازی نمودند (برون و همکاران ۱۹۹۵ و کوهنیگ و کونیگ ۱۹۹۷ و کوهنیگ و همکاران ۱۹۹٤). عمده ترکیبات مونومری آروماتیک و ترکیبات دایمری در حضور اکسیژن توسط مخلوط جمعیت میکروبی روده و کشت خالص تجزیه شدند. در پژوهش اجرا شده توسط کاتو و همکاران (۱۹۹۸) که از مجموع باکتری‌های دستگاه گوارش موریانه استفاده گردید، مشخص شد که این باکتری‌ها قادر به تجزیه ۲۸ درصد از لیگنین دی آلکالیزه و ۹۵-٦۰ درصد از دایمرهای لیگنین می‌باشند.

کل جمعیت یوکاریوتی روده موریانه‌ها در حدود ۱۰۷-۱۰۱۱ میکروب در میلی‌لیتر گزارش شده است (برچتولد و همکاران ۱۹۹۹ و کونیگ و همکاران ۲۰۰۶). گونه‌های باکتریایی بسیاری از روده موریانه‌ها توسط کشت در محیط‌های بی‌هوازی اختیاری و هوازی حاوی مونومرهای لیگنین یا سایر ترکیبات آروماتیک جداسازی شده است. بر اساس روش 16S rDNA، عمده این باکتری‌ها متعلق به شاخه *Spirochetes*، *Proteobacteria*، باکتری‌های گرم مثبت و *Bacteriodes/Flavobacterium* بوده‌اند (توکودا و همکاران ۲۰۰۰ و واتاناب و همکاران ۲۰۰۳). اگرچه در سال‌های اخیر بسیاری از میکروارگانیسم‌های دخیل در هضم لیگنوسلولز روده موریانه‌ها توسط کشت خالص شناسایی شده است، اما هنوز بخش عمده این میکروارگانیسم‌ها شناسایی و بررسی نشده‌اند (کر و همکاران ۱۹۸۳ و نی و توکودا ۲۰۱۳). باکتری‌های جداسازی شده از روده موریانه‌ها یا هر اکوسیستم دیگری نیازمند فراهم نمودن شرایط مطلوب رشدی از نظر دما و pH هستند، تا بتوانند با ترشح آنزیم‌های مؤثر بیشتر روی سوبسترا، قابلیت‌های مطلوب خود را نشان دهند. بر اساس اطلاعات ما، یافته‌های اندکی در مورد فرآوری پسماندهای لیگنوسلولزی توسط باکتری‌های تجزیه کننده لیگنین و لیگنوسلولز جدا شده از دستگاه گوارش موریانه‌ها وجود دارد. بنابراین، هدف از انجام پژوهش حاضر، تعیین دما و pH بهینه رشد باکتری‌های *Bacillus licheniformis*، *Ochrobactrum intermedium* و *Microbacterium paludicola* جداسازی شده از دستگاه گوارش موریانه‌های *Microcerotermes diversus*، و سپس بررسی اثر آن‌ها بر فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی در کاه گندم و سرشاخه خرما با روش تولید گاز بود.

مواد و روش‌ها

ایزوله‌های باکتریایی

در تحقیق حاضر از سه جدایه باکتریایی *B. licheniformis*، *O. intermedium* و *M. paludicola* استفاده گردید. این باکتری‌ها در محیط کشت مایع محلول نمک‌های پایه (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، کشت داده شد، و جداسازی گردیدند (برجی ۱۳۸۲). ایزوله‌های مذکور توسط روش‌های مولکولی شناسایی شدند. باید عنوان نمود که لیگنین‌ها و مواد لیگنوسلولزی مذکور به عنوان تنها منبع انرژی و کربن در محیط کشت جهت رشد ایزوله‌ها قرار داده شد.

تعیین دمای بهینه رشد باکتری‌ها در محیط نوترینت براث

به منظور انتخاب دمای مناسب رشد ایزوله‌های باکتریایی، منحنی رشد این باکتری‌ها در سه دمای ۳۰، ۳۷ و ٤٠ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت نوترینت براث رسم گردید. ترکیب شیمیایی محیط کشت نوترینت براث شامل ۱ گرم عصاره گوشت، ۲ گرم عصاره مخمر، ٥ گرم پپتون و ٥ گرم کلرید سدیم در ۱ لیتر آب مقطر بود (فاهی و پرسلی ۱۹۸۳). هدف از انتخاب محدوده‌های دمایی مذکور، آن بود که باکتری‌های مورد نظر از دستگاه گوارش موریانه‌ها جداسازی شده بودند و محدوده دمایی انتهای دستگاه گوارش حداکثر می‌تواند در چنین محدوده‌هایی تغییر نماید. برای تعیین منحنی رشد باکتری‌ها در دماهای مختلف، تعداد ۱۸ ارلن ۲٥٠ میلی‌لیتری انتخاب (سه باکتری در سه دمای مختلف با ۲ تکرار (۲ ارلن))، و به هر کدام ۱٥٠ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث اضافه گردید. سپس ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. پس از خنک شدن، چند لوپ از کشت تازه ٢٤ ساعته باکتریایی

که در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شده بودند به هر ارلن تلقیح شده و ارلن‌ها در انکوبارتور با دماهای مورد نظر قرار داده شد. هر ۲ ساعت یک بار و به مدت ٦٠ ساعت نمونه‌ای از هر ارلن گرفته شد و میزان رشد باکتری در طول موج ٦٠٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد و سپس منحنی رشد باکتری ترسیم گردید (سیواشانموگام و جایارامان ۲۰۱۱). باید عنوان نمود که رشد باکتریایی بیشتر سبب افزایش جذب نوری محیط کشت در روش اسپکتروفتومتری خواهد گردید. همچنین، خوانش جذب برای هر باکتری ۲ بار تکرار شد که در نهایت برای هر جدایه ٤ تکرار به دست آمد.

تعیین pH بهینه رشد باکتری‌ها در محیط نوترینت براث

برای تعیین pH بهینه رشد، منحنی رشد باکتری‌ها در pH ٥، ٦، ۷ و ۸ ترسیم گردید. هدف از انتخاب محدوده‌های pH مذکور به این دلیل بود که باکتری‌های مورد بررسی از دستگاه گوارش موریانه‌ها جدا شده بودند و محدوده pH انتهای دستگاه گوارش حداکثر می‌تواند در چنین محدوده‌هایی تغییر نماید. پس از انتخاب مناسب‌ترین دمای رشد باکتری‌ها در آزمایش قبلی (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به عنوان بهترین دمای رشد ایزوله‌ها تعیین گردید)، با ثابت نگه داشتن آن دما، میزان pH مناسب رشد نیز تعیین شد. برای تعیین منحنی رشد باکتری‌ها، ٢٤ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری انتخاب (سه باکتری در چهار pH مختلف با ۲ تکرار) و به هر کدام ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث اضافه گردید. با استفاده از سود یک نرمال و اسید کلریدریک یک نرمال pHهای مورد نظر تنظیم گردیدند. سپس ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد استریل شدند. پس از خنک شدن، چند لوپ از کشت تازه ٢٤ ساعته باکتریایی (کشت داده شده در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگار) به هر ارلن تلقیح شده و ارلن‌ها در انکوبارتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه رشد به دست آمده) قرار داده شدند. هر ۲ ساعت یک بار و به مدت ٦٠ ساعت نمونه‌ای از هر ارلن گرفته شد و میزان رشد باکتری در طول موج ٦٠٠ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد و سپس منحنی رشد باکتری ترسیم گردید (سیواشانموگام و جایارامان ۲۰۱۱). همچنین، خوانش جذب برای هر باکتری ۲ بار تکرار شد که در نهایت برای هر جدایه باکتری ٤ تکرار به دست آمد.

عمل‌آوری بقایای زراعی توسط جدایه‌های باکتریایی

برای عمل‌آوری کاه گندم و سرشاخه خرمای عصاره‌گیری شده با آب جوش، به ۳۲ ارلن یک لیتری [۸ تیمار شامل ۲ سوبسترا × ۳ باکتری شامل *Bacillus*، *Ochrobactrum* و *Microbacterium* + ۲ شاهد (سوبسترای قرار داده شده در محیط کشت و بدون تلقیح باکتریایی)، و ٤ تکرار به ازای هر تیمار]۵۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع Media 9 (حاوی ٦/۲ گرم دی سدیم هیدروژن فسفات، ۳/۵ گرم دی هیدروژن پتاسیم فسفات، ۰/۵ گرم کلرید سدیم و ۱ گرم سولفات آمونیوم در هر لیتر آب مقطر) و ۲/۵ درصد (معادل ۱۲/۵ گرم) از مواد لیگنوسلولزی کاه گندم یا سرشاخه خرمای آسیاب شده به میزان یک میلی‌متر اضافه گردید. عمل استریل ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از خنک شدن، ۳ میلی‌لیتر کشت ٢٤ ساعته هر گونه باکتریایی که از قبل در محیط کشت نوترینت براث کشت داده شده بود، برای تلقیح هر ارلن استفاده شد. سپس درب ارلن‌ها با پنبه استریل بسته شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٦ هفته در انکوباتور شیکردار با ۱۵۰ دور در دقیقه در شرایط هوازی کشت داده شدند. پس از پایان انکوباسیون، محتوای هر ارلن توسط کاغذ صافی صاف گردید و ۳ بار با آب مقطر شستشو داده شد. با قرار دادن بقایای جمع‌آوری شده در آون به مدت ٤٨ ساعت در دمای ٦٠ درجه سانتی‌گراد، از خشک شدن آن‌ها حصول اطمینان شد (برجی ۱۳۸۲).

تاثیر فرآوری باکتریایی بقایای زراعی بر تولید گاز و فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی

از دو رأس گاو هلشتاین فیستولاگذاری شده، قبل از خوراک‌دهی وعده صبح شیرابه شکمبه توسط لوله پلاستیکی و پمپ خلاء جمع‌آوری گردید. حیوانات با استفاده از جیره حاوی ٦٠ درصد علوفه و ٤٠ درصد کنسانتره (جیره محتوی ٤٠ درصد کاه گندم، ١٠ درصد سیلوی ذرت، ١٠ درصد یونجه خشک، ٢٧ درصد دانه ذرت،١١ درصد سبوس گندم، ٠/٩ درصد اوره، ٠/٥٥ درصد کربنات کلسیم، ٠/٢٥ درصد مواد معدنی و ویتامیه و ٠/٢٥ درصد نمک بر حسب ماده خشک بود) به مدت دو هفته تغذیه شدند. شیرابه شکمبه بلافاصله توسط چهار لایه پارچه پنیر صاف گردید و سریعاً به آزمایشگاه انتقال داده شد. جهت حصول اطمینان از شرایط بی هوازی، گاز دی اکسید کربن به شیرابه شکمبه صاف شده تزریق گردید، و هم‌چنین، قبل از استفاده جهت انکوباسیون تیمارها در حمام آب گرم با دمای ٣٩ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

به منظور بررسی حجم گاز تولیدی و فراسنجه‌های تخمیر در سوبستراهای عمل‌آوری شده با باکتری‌های جدا شده از روده موریانه، از روش مکار (٢٠١٠) استفاده شد. دو سری آزمون تولید گاز به طور همزمان انجام شد. در سری اول، تولید گاز نمونه‌های خوراکی (با اندازه ذرات یک میلی‌متر؛ ٤ تکرار به ازای هر تیمار) در ویال‌های شیشه‌ای ١٠٠ میلی‌لیتری که حاوی ٥٠٠ میلی‌گرم نمونه، ٣٠ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی و ١٠ میلی‌لیتر مایع شکمبه بودند (مکار ٢٠١٠)، اندازه‌گیری شد. حجم گاز تولیدی در ویال‌ها توسط دستگاه فشارسنج در زمان‌های ٢، ٤، ٦، ٨، ١٢، ١٦، ٢٤، ٣٦، ٤٨، ٧٢، ٩٦، ١٢٠ و ١٤٤ ساعت پس از انکوباسیون تعیین شد.

برای تعیین فراسنجه‌های تولید گاز از معادله غیر خطی $P = b\ (1 - e^{-ct})$ استفاده گردید (بلومل و همکارن ٢٠٠٣). 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 بود.

سری دوم آزمایش تولید گاز با ٤ تکرار به ازای هر تیمار و به منظور تعیین قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک، pH و نیتروژن آمونیاکی شکمبه و ضریب تفکیک طراحی شد. پس از ٩٦ ساعت انکوباسیون، ابتدا حجم گاز تولیدی هر ویال ثبت گردید. سپس درب ویال‌ها باز گردیده و میزان pH آن‌ها توسط دستگاه pHمتر (مدل ٧٤٤؛ شرکت Metrohm سوئیس) ثبت گردید. سپس محتوای هر ویال با دور g×٢٠٠٠ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٢٠ دقیقه سانتریفیوژ گردید. بقایای هر ویال جمع‌آوری شده و خشک گردیدند. از اختلاف وزن سوبسترای اولیه و وزن بقایا پس از انکوباسیون، قابلیت هضم شکمبه‌ای ماده خشک محاسبه گردید. جهت تعیین غلظت نیتروژن آمونیاکی، نمونه‌های سوپرناتانت (٥ میلی‌لیتر) سریعاً با یک میلی‌لیتر اسید HCl ٠/٢ نرمال مخلوط شده و در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ضریب تفکیک پس از ٩٦ ساعت انکوباسیون به صورت نسبت ماده آلی حقیقی تجزیه شده به حجم گاز تولیدی پس از ٩٦ ساعت انکوباسیون محاسبه گردید. ماده آلی حقیقی تجزیه شده از اختلاف ماده آلی سوبسترای اولیه با ماده آلی بقایا پس از انکوباسیون تعیین گردید. انرژی قابل متابولیسم و قابلیت هضم ماده آلی طبق معادلات زیر تخمین زده شد (منکی و همکاران ١٩٧٩):

$$ME\ (MJ/kg\ DM) = 2.20 + 0.136\ GAS + 0.057\ CP + 0.0029\ CP^2$$

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

که در این معادلات، IVOMD قابلیت هضم ماده آلی؛ ME انرژی قابل متابولیسم؛ CP غلظت پروتئین خام به

صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک؛ XA خاکستر به صورت گرم در ۱۰۰ گرم ماده خشک و GAS حجم گاز خالص تولیدی برای ۲۰۰ میلی‌گرم سوبسترا پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون می‌باشد.

تجزیه شیمیایی نمونه‌ها

غلظت نیتروژن آمونیاکی ویال‌ها توسط روش برودریک و کانگ (۱۹۸۰) تعیین گردید.

تجزیه آماری

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده با استفاده از رویه GLM و توسط نرم‌افزار SAS (۲۰۰۱)، در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. مدل آماری طرح آزمایشی برای هر سوبسترا (کاه گندم یا سرشاخه خرما) به صورت $Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$ بود که در این مدل Y_{ij}، μ، T_i و e_{ij} به ترتیب رکورد مشاهده شده، میانگین کل، اثر تیمار آزمایشی i ام 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

دمای بهینه رشد باکتری‌ها

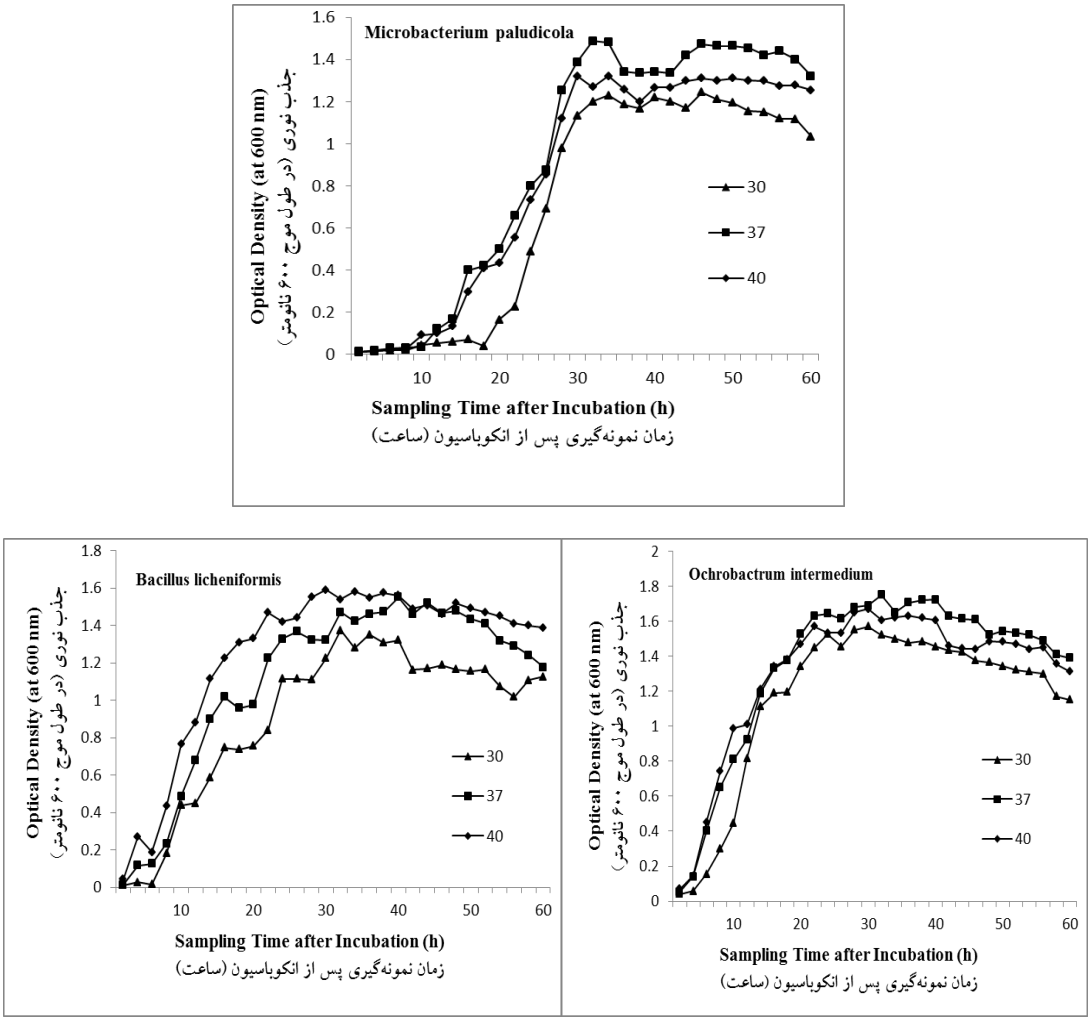
نتایج مربوط به تعیین دمای بهینه رشد جدایه‌های باکتریایی در سه دمای ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت نوترینت براث در شکل ۱ نشان داده شده است. هر سه سویه باکتریایی در سه دمای مورد نظر قادر به رشد بودند. رشد بهینه باکتری *B. licheniformis* در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به دست آمد، به طوری که در بیشتر زمان‌های مورد بررسی منحنی رشد آن بالاتر از دو دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. این باکتری در دمای بهینه خود بعد از ۳۰ ساعت به حداکثر رشد رسید. ضعیف‌ترین رشد آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد.

منحنی رشد سویه *O. intermedium* نشان داد که بر خلاف باکتری *B. licheniformis*، رشد بهینه آن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد و بعد از ۳۲ ساعت در این دما به حداکثر رشد خود رسید. هم‌چنین، باکتری مذکور در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد رشد خوبی را از خود نشان داد. کمترین رشد در باکتری *O. intermedium* در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

در جدایه *M. paludicola* بهینه رشد مانند ایزوله *O. intermedium* در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد اتفاق افتاد و این باکتری پس از ۳۲ ساعت به حداکثر رشد خود در دمای مذکور رسید. کم‌ترین رشد آن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

از مهم‌ترین عوامل موثر بر سرعت رشد می‌توان دما، pH، ترکیب گاز اتمسفر، نوع گونه باکتریایی، ترکیب و نوع محیط کشت، تعداد اولیه باکتری‌ها و فرآورده‌های حاصل از متابولیسم باکتری‌ها را بر شمرد، که در عین حال عمده این عوامل ممکن است با یکدیگر تعاملاتی نیز داشته باشند (موهان و مانوسلیس ۱۹۹۵). در تحقیق حاضر، اگرچه گونه‌های باکتریایی مورد آزمون از یک محیط (دستگاه گوارش موریانه) جداسازی شدند، از نظر دمایی (مزوفیل با دمای مناسب بین ۴۰-۳۷ درجه سانتی‌گراد)، خصوصیت ترکیب گازی (طبق آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده هر سه باکتری بی‌هوازی اختیاری بودند) و خصوصیت غذایی (هتروترف) یکنواخت بودند. بنابراین، عوامل مؤثر بر میزان و نحوه رشد آن‌ها مواردی مانند گونه باکتریایی، ترکیب محیط مغذی و یا نوع محصولات حاصل از متابولیسم باکتریایی بوده است. باید گفت دستگاه گوارش موریانه‌ها علی رغم کوچک بودن و سادگی ظاهری محیط کاملاً یکنواختی نیست. حتی در روده موریانه‌ها که طول آن از چند میلی‌متر تجاوز نمی‌کند، بخش‌های کاملاً متمایز با شرایط رشدی مختلفی مانند پیش معده، میان معده و پس معده که خود مشتمل بر ۵ بخش است، وجود دارد (ابرین و اسلایتور ۱۹۸۲). به علاوه، بین گونه‌های مختلف موریانه نیز اختلافات اساسی از نظر شرایط حاکم بر دستگاه گوارش وجود دارد. اختلاف در

دمای بهینه رشد در ایزوله‌های مطالعه حاضر احتمالاً به دلیل موارد مذکور بوده است.



شکل ۱- اثرات دما بر رشد گونه‌های مختلف باکتریایی جدا شده از روده موریانه

Figure 1- Effects of temperature on growth of different bacterial species isolated from termite gut

برجی (۱۳۸۲) در آزمایشی سه باکتری *Bacillus sphaericus*، *Ochrobactrum anthropi* و *Enterobacter cloacae* را از دستگاه گوارش موریانه‌های *Anacanthotermes vagans* جداسازی نمود، و دما و pH بهینه رشد آن‌ها در محیط‌های کشت مختلف را بررسی کرد. نتایج تحقیق مذکور نشان داد که در هر دو محیط کشت آبگوشت مغذی و محیط کشت Media 9 حاوی کلش گندم به عنوان تنها منبع کربن، با افزایش دما از ٤ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رشد باکتری‌ها افزایش یافت و بیشترین رشد در محدوده دمایی ۳۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. در این آزمایش، با افزایش دما از ۳۷ تا ٦۰ درجه سانتی‌گراد، رشد هر سه باکتری در هر دو محیط کشت روندی کاهشی نشان داد و این کاهش در گونه *Bacillus* بیشتر از دو گونه دیگر بوده، و نیز در محیط کشت Media 9 حاوی کلش گندم بیشتر از محیط کشت آبگوشت مغذی بود. این نتایج مشابه نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر است. پائول و وارما (۱۹۹۳) نیز یک گونه *Bacillus* را از خاک کلنی موریانه‌ها جدا نمودند که قادر به رشد سریع‌تری بر روی مواد محلول مانند زایلان و کربوکسی متیل سلولز نسبت به

مواد نامحلولی مانند پوست برنج بود. دما و pH بهینه رشد این باکتری به ترتیب ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۷/۲ بود. کر و کر (۱۹۸۷) دمای بهینه رشد *Arthrobacter* جهت تجزیه لیگنین را ۲٦ درجه سانتی‌گراد گزارش نمودند.

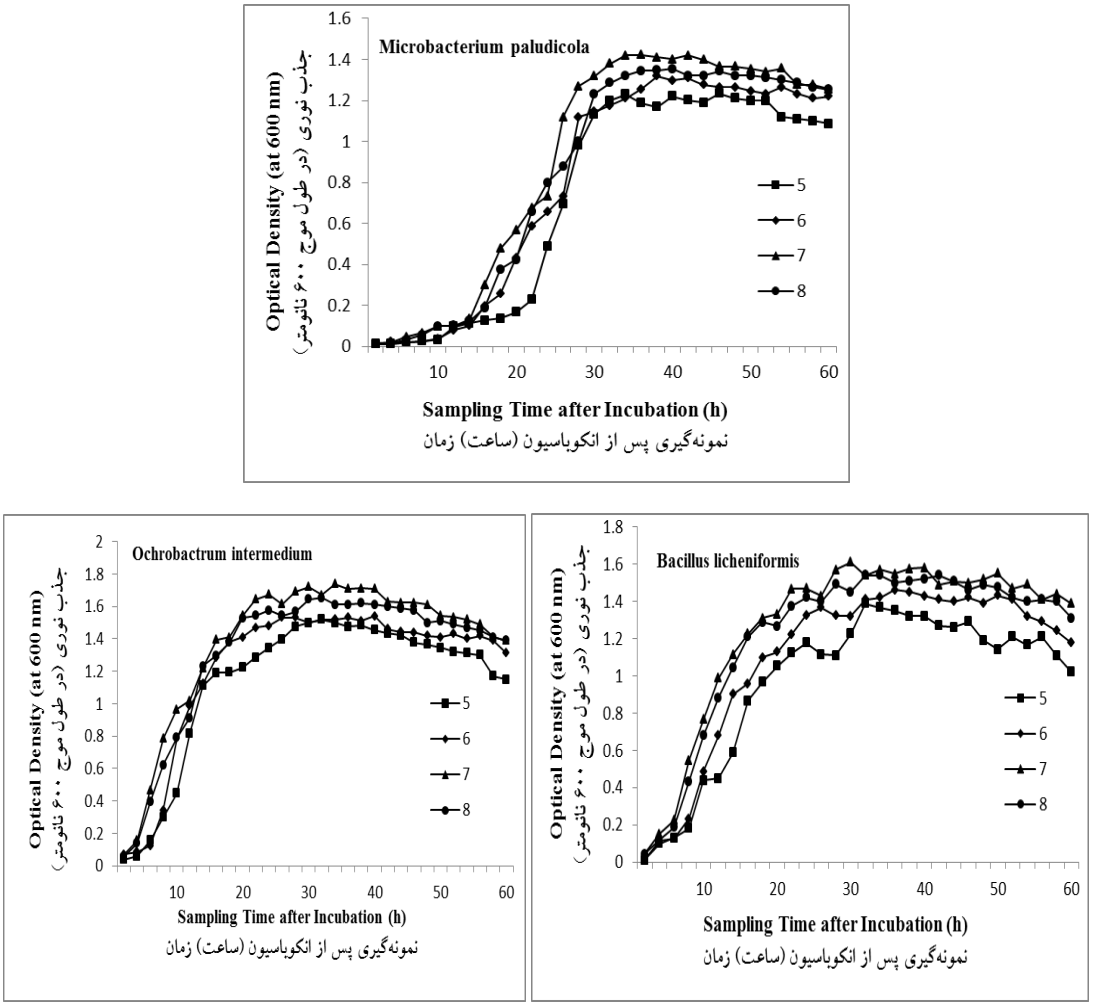
pH بهینه رشد باکتری‌ها

شکل ۲ نتایج مربوط به تعیین pH بهینه رشد سویه‌های باکتریایی در pHهای ٥، ٦، ۷ و ۸ و با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه) در محیط نوترینت براث را نشان می‌دهد. تمام ایزوله‌ها در انواع pHهای اسیدی، خنثی و بازی قادر به رشد بودند، اما رشد بهینه هر سه آن‌ها در pH خنثی یعنی ۷ مشاهده گردید. در pH مذکور، بیشترین رشد برای *Bacillus*، *Ochrobactrum* و *Microbacterium* به ترتیب در ساعت ۳۰، ۳٤ و ۳٦ ساعت پس از انکوباسیون مشاهده گردید. همچنین، در هر سه جدایه باکتریایی کمترین رشد در pH برابر با ٥ اتفاق افتاد.

میزان pH محیط کشت تأثیر قابل توجهی بر رشد میکروب‌ها دارد. هر میکروارگانیسم دارای یک pH بهینه است که در آن حداکثر رشد خود را نشان می‌دهد. تغییر در این pH به دلیل عدم توانایی در خنثی نمودن pH محیط رشدی و به طبع تغییر pH فیزیولوژیکی درون سلولی، منجر به رشد نامطلوب میکروب‌ها می‌شود (باسو و همکاران ۲۰۱٥).

مطابق با نتایج حاضر، بسیاری از محققان نیز pHهای خنثی تا کمی قلیایی را pH بهینه جهت رشد و فعالیت باکتریایی گزارش نمودند (گیروکس و همکاران ۱۹۸۸ و یانگ و همکاران ۱۹۹٥). برجی (۱۳۸۲) آزمایشی برای تعیین pH بهینه رشد باکتری‌های جدا شده از روده موریانه‌های *Anacanthotermes vagans* در محیط کشت آبگوشت مغذی انجام داد و دریافت که هم گونه باکتری و سطوح مختلف pH اثر قابل توجهی بر رشد داشتند. در باکتری‌های مورد آزمون، بیشترین رشد به ترتیب مربوط به گونه *Enterobacter*، *Bacillus* و *Ochrobactrum* بود. در سطوح مختلف pH، بیشترین رشد در pHهای ٥، ۷ و ۹ به دست آمد که بین این سه pH اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. در حالی که هر سه pH با pH ۳ که کمترین رشد در آن صورت گرفت اختلاف معنی‌داری نشان دادند. در محیط کشت Media 9 نیز بیشترین رشد در این جدایه‌ها در pH ٥ و ۷ مشاهده گردید.

به هر حال آنچه مسلم است عوامل موثر بر رشد باکتری دارای تعاملاتی نیز با یکدیگر می‌باشند. برای مثال، راجارام و وارما (۱۹۹۰) دریافتند که باکتری *Bacillus thermo-alkalophilus* رشد بهتری بر روی باگاس نسبت به پوست برنج نشان داد و pH بهینه رشد این باکتری ۷-٦ بود که مشابه نتایج پژوهش حاضر است. در مطالعه نیراج و همکاران (۱۹۹٦)، pH بهینه رشد باکتری *Aeromonas formicans* ۸ به دست آمد. اسرینیواسان و همکاران (۱۹۸۷) نیز pH بهینه برای تولید آنزیم در برخی گونه‌های باکتریایی را ۷-٦ گزارش نمودند.



شکل ۲- اثرات pH بر رشد گونه‌های مختلف باکتریایی جدا شده از روده موریانه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه)

Figure 2- Effects of pH on growth of different bacterial species isolated from termite gut at 37ºC (optimum temperature)

بر اساس گزارش‌های محققان، زمان زادآوری یک باکتری در محیط کشت می‌تواند برای باکتری‌های سریع‌الرشد (مانند *Escherichia coli*) فقط به میزان ۲۰ دقیقه باشد در حالی که برای باکتری‌های آهسته رشد (مانند *Mycobacterium tuberculosis*) تا ٢٤ ساعت طول بکشد (موهان و مانوسلیس ۱۹۹۵). در کل، در پژوهش حاضر با توجه به حتمی بودن وابستگی ایزوله‌های جدا شده به خصوصیات دستگاه گوارش موریانه‌ها، از عوامل مهم تاثیرگذار بر میزان و نرخ رشد باکتریایی می‌توان به گونه باکتری، تعداد اولیه آن در محیط کشت، ترکیب مواد مغذی محیط کشت و نوع مواد حاصل از متابولیسم باکتریایی اشاره نمود.

در کل، با فرآوری پسماندهای کشاورزی در شرایط دمایی و pH بهینه رشد به دست آمده توسط ایزوله‌های باکتریایی مذکور، می‌توان افزایش ارزش تغذیه‌ای این مواد لیگنوسلولزی را انتظار داشت. به عبارت دیگر، دانستن دما و pH مطلوب باکتریهای مذکور دارای این اهمیت کاربردی است که شخص آگاه باشد که بهترین شرایط رشد باکتریهای مذکور چیست، و در نتیجه برای

رسیدن به بهترین بازده و فراوری بهینه آن دما و pH مطلوب را در پسماندهای مورد فرآوری ایجاد نماید.

جدول ۱- اثر عمل‌آوری کاه گندم توسط گونه‌های باکتریایی جدا شده از روده موریانه بر فراسنجه‌های تخمیر با استفاده از تولید گاز

Table 1- Effect of processing wheat straw by bacterial species isolated from termite gut on fermentation parameters using gas production

	جیره‌های آزمایشی Experimental diets				SEM	P-value
	WS[1] (control)	WS+OI	WS+BL	WS+MP		
تولید گاز در زمان ۲٤ ساعت GP_{24} (mL)[2]	9.23[c]	10.2[b]	11.6[a]	10.3[b]	0.16	0.01
تولید گاز در زمان ۹٦ ساعت GP_{96} (mL)[2]	54.7[c]	57.4[b]	59.3[a]	56.2[b]	0.40	0.001
تولید گاز در زمان ۱٤٤ ساعت GP_{144} (mL)[2]	62.1[b]	63.4[b]	65.9[a]	63.3[b]	0.43	0.01
پتانسیل تولید گاز b (mL)[3]	83.2[b]	79.8[c]	86.7[a]	82.8[b]	0.85	0.01
نرخ تجزیه‌پذیری c (/h)[4]	0.009[c]	0.01[b]	0.011[a]	0.01[b]	0.0002	0.01
قابلیت هضم ماده خشک $IVDMD_{96}$ (%)[5]	41.5	43.9	45.2	44.4	1.65	0.47
قابلیت هضم ماده آلی $IVOMD_{96}$ (%)[6]	36.0[b]	37.7[a]	38.0[a]	36.3[b]	0.29	0.01
سوبسترای واقعی هضم شده TDS_{96} (mg)[7]	270	267	276	266	2.91	0.16
انرژی قابل متابولیسم ME (MJ/kg DM)[8]	5.29	5.46	5.53	5.33	0.07	0.11
ضریب تفکیک PF_{96}[9]	4.93	4.65	4.66	4.75	0.08	0.19
pH	6.58	6.56	6.50	6.53	0.039	0.51
نیتروژن آمونیاکی NH3-N (mg/dl)[10]	13.3	13.8	14.5	13.7	0.44	0.28

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts are differ (P<0.05).

[1]Treatments were wheat straw (WS) (control) and WS treated with *Ochrobactrum intermedium*, *Bacillus licheniformis* and *Microbacterium paludicola*.

[2] Volume of gas production after 24, 96 and 144 h, respectively.

[3] The gas production from the insoluble but fermentable fractions for 144 h.

[4] Rate constant of gas production during incubation.

[5] *In vitro* dry matter disappearance for 96 h.

[6] *In vitro* organic matter disappearance for 96 h.

[7] Truly digested substrate for 96 h.

[8] Metabolizable energy.

[9] Partitioning factor at 96 h incubation.

[10] Ammonia nitrogen.

تولید گاز، گوارش‌پذیری و فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی

عمل‌آوری باکتریایی کاه گندم حجم گاز تولیدی را متأثر نمود (جدول ۱)، به طوری که بیشترین حجم گاز تولیدی پس از ۲٤، ۹٦ و ۱٤٤ ساعت انکوباسیون، با فرآوری توسط باکتری *Bacillus* و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). همچنین، بیشترین نرخ تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی در کاه انکوبه شده با باکتری *Bacillus* و کمترین در تیمار شاهد به دست آمد (P<۰/۰۵). تیمارهای حاوی *Bacillus* و *Ochrobactrum* به ترتیب بیشترین و کمترین پتانسیل تولید گاز را نشان دادند (P<۰/۰۵). قابلیت هضم ماده خشک، سوبسترای تجزیه شده حقیقی، انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک، pH و نیتروژن آمونیاکی تحت تاثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). جدول ۲ نتایج مربوط به اثر عمل‌آوری باکتریایی سرشاخه خرما بر فراسنجه‌های تخمیر را نشان می‌دهد. مشابه با کاه گندم، بیشترین حجم گاز تولیدی پس از ۲٤، ۹٦ و ۱٤٤ ساعت انکوباسیون و قابلیت هضم ماده آلی در سرشاخه خرمای عمل‌آوری شده توسط *Bacillus* و کمترین در تیمار بدون تلقیح باکتریایی به دست آمد (P<۰/۰۵). فرآوری توسط جدایه *Bacillus* و *Ochrobactrum* به ترتیب منجر به بیشترین و کمترین پتانسیل تولید گاز در سوبسترا شدند (P<۰/۰۵). بیشترین نرخ تولید گاز با غنی‌سازی سوبسترا توسط جدایه *Ochrobactrum* و کمترین در تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). تفاوت قابل توجهی در قابلیت هضم ماده خشک، سوبسترای تجزیه شده حقیقی، انرژی قابل متابولیسم، ضریب تفکیک، pH و نیتروژن آمونیاکی مشاهده نگردید (P>۰/۰۵).

نمودن پیوندهای آن با بخش‌های کربوهیدراتی بوده است. زیرا میزان و نوع ساختار لیگنین تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر ارزش تغذیه‌ای مواد لیگنوسلولزی دارد (ون‌سوست ۱۹۹٤). متأسفانه اطلاعات بسیار ناچیزی برای تفسیر نتایج مربوط به فراسنجه‌های تخمیر وجود دارد و تحقیق برجی (۱۳۸۲) از معدود آزمایش‌های موجود در این حوزه از تحقیقات است. در مطالعه مذکور نیز قابلیت هضم ماده خشک کاه گندم و کاه جو پس از تلقیح توسط سه باکتریایی *Bacillus sphaericus*، *Ochrobactrum anthropi* و *Enterobacter cloacae* به مدت ٦ هفته به طور قابل توجهی در مقایسه با تیمار شاهد بهبود یافته بود؛ به طوری که در هر دو سوبسترا، بیشترین قابلیت هضم توسط جدایه *Bacillus* مشاهده گردید.

بهبود قابلیت هضم ماده آلی و فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی شامل حجم گاز تولیدی، پتانسیل و نرخ تولید گاز در هر دو سوبسترای مورد آزمون احتمالاً به دلیل اثر باکتری‌ها بر تغییر ساختار لیگنین و سست در تحقیق حاضر، قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و نیز حجم گاز تولیدی در کاه گندم بیشتر از سرشاخه خرما بود. علت آن همان طوری که در مطالعه دیگری توسط عزیزی شترخفت و همکاران (۲۰۱٦) نشان داده شده ممکن است به غلظت لیگنین کمتر و محتوای بخش کربوهیدراتی بیشتر کاه گندم مربوط باشد که دسترسی میکروارگانیسم‌های شکمبه به بخش قابل استفاده خوراک را تسهیل نموده است؛ زیرا قابلیت هضم خود تابعی از عوامل فیزیکی و شیمیایی موجود در سوبسترا از جمله محتوای لیگنین، نوع لیگنین، ارتباط لیگنین با سایر اجزای دیواره سلولی، نسبت لیگنین با سایر ترکیبات موجود در نمونه، محتوای بخش کربوهیدراتی نمونه و سایر عوامل است. بر خلاف نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر، کر و کر (۱۹۸۷) در مطالعه‌ای پوست بادام را با باکتری لیگنولایتیک *Arthrobacter* عمل‌آوری نموده و دریافتند که پروتئین خام آن به میزان دو برابر افزایش، و محتوای لیگنین نیز به نصف کاهش یافت. اما این فعل و انفعالات نه تنها سبب بهبود قابلیت هضم ماده خشک این فرآورده نشده، بلکه مقدار آن را ۵۰ درصد نیز کاهش داده است. تفاوت در حجم

تولید گاز و قابلیت هضم ماده آلی سوبستراهای فرآوری شده با ایزوله‌های باکتریایی، احتمالاً به دلیل تفاوت در میزان رشد و ترشح آنزیم‌های لیگنولایتیک و نیز نوع آنزیم‌های ترشحی توسط آن‌ها بوده است.

جدول ۲- اثر عمل‌آوری سرشاخه خرما توسط گونه‌های باکتریایی جدا شده از روده موریانه بر فراسنجه‌های تخمیر با استفاده از تولید گاز

Table 2- Effect of processing date leaf by bacterial species isolated from termite gut on fermentation parameters using gas production

	جیره‌های آزمایشی Experimental diets				SEM	P-value
	DL[1] (control)	DL+OI	DL+BL	DL+MP		
تولید گاز در زمان ۲٤ ساعت GP_{24} (mL)[2]	2.86[b]	3.35[b]	4.14[a]	2.70[b]	0.27	0.002
تولید گاز در زمان ۹٦ ساعت GP_{96} (mL)[2]	23.6[b]	24.7[b]	26.0[a]	23.9[b]	0.41	0.001
تولید گاز در زمان ۱٤٤ ساعت GP_{144} (mL)[2]	37.1[b]	39.8[ab]	41.5[a]	36.6[b]	0.87	0.01
پتانسیل تولید گاز b (mL)[3]	83.6[b]	79.8[c]	86.7[a]	82.8[b]	0.91	0.01
نرخ تجزیه‌پذیری c (/h)[4]	0.009[c]	0.011[a]	0.010[b]	0.010[b]	0.0002	0.01
قابلیت هضم ماده خشک $IVDMD_{96}$ (%)[5]	38.6	40.5	42.3	39.3	0.99	0.12
قابلیت هضم ماده آلی $IVOMD_{96}$ (%)[6]	27.2[b]	27.7[b]	28.5[a]	27.5[b]	0.22	0.005
سوبسترای واقعی هضم شده TDS_{96} (mg)[7]	120	125	119	115	1.98	0.07
انرژی قابل متابولیسم ME (MJ/kg DM)[8]	4/0	4.06	4.14	4.04	0.06	0.13
ضریب تفکیک PF_{96}[9]	5.08	5.25	4.56	4.52	0.09	0.75
pH	6.80	6.75	6.70	6.77	0.03	0.12
نیتروژن آمونیاکی NH3-N (mg/dl)[10]	11.7	12.1	11.7	12.5	0.38	0.30

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار هستند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts are differ (P<0.05).

[1]Treatments were date leaf (DL) (control) and DL treated with *Ochrobactrum intermedium*, *Bacillus licheniformis* and *Microbacterium paludicola*.

[2] Volume of gas production after 24, 96 and 144 h, respectively.

[3] The gas production from the insoluble but fermentable fractions for 144 h.

[4] Rate constant of gas production during incubation.

[5] *In vitro* dry matter disappearance for 96 h.

[6] *In vitro* organic matter disappearance for 96 h.

[7] Truly digested substrate for 96 h.

[8] Metabolizable energy.

[9] Partitioning factor at 96 h incubation.

[10] Ammonia nitrogen.

نتیجه‌گیری

در کل، نتایج تحقیق حاضر نشان داد که رشد بهینه باکتری‌های لیگنولایتیک *Ochrobactrum intermedium* و *Microbacterium paludicola* جدا شده از روده موریانه در دمای ۳۷ درجه، و رشد بهینه *Bacillus licheniformis* در ٤٠ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید و pH بهینه رشد همه آن‌ها برابر با ۷ بود. یعنی این شرایط بهینه‌ای می‌باشد که باید در زمان فرآوری پسماندهای لیگنوسلولزی با باکتریهای مذکور برای آن‌ها فراهم گردد، تا بازده فراوری حداکثر گردد. عمل‌آوری کاه گندم و سرشاخه خرما توسط این باکتری‌ها به ویژه گونه *Bacillus licheniformis* سبب بهبود فراسنجه‌های تخمیر آزمایشگاهی و قابلیت هضم ماده آلی گردید. باید اذعان نمود که تحقیقات جهت امکان بهبود ارزش تغذیه‌ای مواد لیگنوسلولزی توسط باکتری‌های روده موریانه‌ها هنوز در ابتدای راه است. بنابراین، انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه ضروری است. همچنین، امکان جایگزین نمودن محیط‌های کشت فرآوری کنونی با محیط‌های ارزان قیمت و مقرون به صرفه‌تر باید مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

در اینجا لازم می‌داند از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور، به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر تشکر و قدردانی به عمل آید.

منابع مورد استفاده

Azizi-Shotorkhoft A, Mohammadabadi, T, Motemedi, H, Chaji M and Fazaeli H, 2016. Isolation and identification of termite gut symbiotic bacteria with lignocellulose-degrading potential, and their effects on the nutritive value for ruminants of some by-products. Animal Feed Science and Technology 221: 234-242.

Basu S, Bose Ch, Ojha N, Das N, Das J, Pal M and Sukant K, 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. Bioinformation 11(4): 182-184.

Berchtold M, Chatzinotas A, Schönhuber W, Brune A, Amann R, Hahn D and König H, 1999. Differential enumeration and *in situ* localization of microorganisms in the hindgut of the lower termite *Mastotermes darwiniensis* by hybridization with rRNA-targeted probes. Archives of Microbiology 172: 407–416.

Blümmel M, Karsli A and Russell JR, 2003. Influence of diet on growth yields of rumen micro-organisms in vitro and in vivo: Influence on growth yield of variable carbon fluxes to fermentation products. British Journal of Nutrition 90: 625–634.

Borji M, 2003. The survey possibility of straw polysaccharides and lignin degradation by isolated microbiota from termites. PhD Thesis. Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Broderick G and Kang JH, 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, 2009. Symbionts aiding digestion. In: Cardé R .T., Resh, V. H. (eds) Encyclopedia of insects, 2nd edn. Academic Press, New York, NY, pp 978–983.

Brune A, Miambi E and Breznak JA, 1995. Roles of oxygen and the intestinal microflora in the metabolisms of lignin-derived phenylpropanoids and other monoaromatic compounds. Applied and Environmental Microbiology 61: 2688–2695.

Butler JH and Buckerfield JC, 1979. Digestion of lignin by termites. Soil Biology and Biochemistry 11: 507–511.

Cookson LJ, 1988. The site and mechanisms of ^{14}C-lignin degradation by Nasutitermes exitiosus. Journal of Insect Physiology 34: 409-414.

Cornwell WK, Cornelissen JHC, Allison SD, Bauhus J, Eggleton P, Preson CM, Scarff F, Weedon JT, Wirth C and Zanne AE, 2009. Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? Global Chang Biology 15: 2431–49.

Fahy PC and Persley GJ, 1983. Plant Bacterial Diseases, A Diagnostic Guide. Academic Press, N. Y., NY. 393 p.

Fazaeli H, Mohamadzadeh H, Azizi A, Jelan ZA, Liang JB, Rouzbehan Y and Osman A, 2004. Nutritive value of wheat straw treated with Pleurotus fungi. Asian Australian Journal of Animal Science 17: 1681-1688.

Gbolagade JS, 2006. Bacteria associated with compost used for cuttivation of Nigerian edible mushrooms: *Pleurotus tuber-regium* (fr.) Singer, and *Lentinus squarrosulus* (Berk.). African Journal of Biotechnology 5(4): 338-342.

Giroux H, Vidal P, Bouchard J and Lamy F, 1988. Degradation of kraft indulin lignin by *Streptomyces viridosporus* and *Streptomyces badius*. Applied and Environmental Microbiology 54: 3064-3070.

Hyodo F, Azuma J and Abe T, 1999. Estimation of effect of passage through the gut of a lower termite, *Coptotermes formosanus* Shiraki, on lignin by solid-state CP MASS C-13 NMR. Holzforscung 53: 244-246.

Jonathan SG, Fasidi IO, Ajayi AO and Adegeye A, 2008. Biodegradation of Nigeria wood waste by *Pleurotus tuber-regium* (fries) Singer. Bioresource Technology 99: 807-899.

Kato K, Kozaki S and Sakurananga M, 1998. Degradation of lignin compounds by bacteria from termite guts. Biotechnology Letters 20: 459-462.

Kerr TJ, Kerr RD and Benner R, 1983. Isolation of a bacterium capable of degrading peanut hull lignin. Applied and Environmental Microbiology 46: 1201-1206.

Kerr TJ and Kerr RD, 1987. Microorganism having characteristics of an *Arthrobacter* capable of degrading peanut hull lignin. United State Patent, 463899.

Kuhnigk T and König H, 1997. Degradation of dimeric lignin model compounds by aerobic bacteria isolated from the hindgut of xylophagous termites. Journal of Basic Microbiology 37: 205–211.

Kuhnigk T, Borst E, Ritter A, Kämpfer P, Graf A, Hertel H and König H, 1994. Degradation of lignin monomers by the hindgut flora of termites. Systematic and Applied Microbiology 17: 76–85.

Makkar HPS, 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.

Menke KH, Raab L, Salewski A, Steingass H, Fritz D and Schneider W, 1979. The estimation of the digestibility and metabolisable energy content of ruminant feeding stuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. Journal of Agricultural Science 93: 217–222.

Mohan CR and Manuselis G, 1995. Text book of diagnostic microbiology. W.B. Saundres Company, USA.

Nasehi M, Torbatinejad, NM, Zerehdaran, S and Safaei AR, 2014. Effects of (*Pleurotus Florida*) fungi on chemical composition and rumen degradability of wheat and barley straw. Iranian Journal of applied Animal Science 4(2): 257-261.

Neeraj J, Shrivastava AK, Srivastava SK and Jain N, 1996. Optimization of culture parameters for degradation of black liquor by *Aeromonas formicans*. Fresenius Environmental Bulletin 5: 213-220.

Ni J and Tokuda G, 2013. Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. Biotechnology Advances 31: 838-850.

O,Brien RW and Slaytor M, 1982. Role of microorganisms in the metabolism of termites. Australian Journal of Biology 35: 239-292.

Paul J and Varma AK, 1993. Characterization of cellulose and hemicellulose degrading *Bacillus* sp. from termite infested soil. Current Science 64: 262-266.

Rahal A, Singh A and Singh M, 1997. Effect of urea treatment and diet composition on and prediction of nutritive value of rice straw of different cultivars. Animal Feed Science and Technology 68: 165-182.

Rajaram S and Varma A, 1990. Production and characterization of xylanase from *Bacillus thermo-alkalophilus* grown on agricultural wastes. Applied and Environmental Microbiology 34: 131-144.

SAS, 2001. Statistical Analysis System: Users Guide, Statistics, version 8.2. SAS Institute. Carry, N. C., USA.

Sivashanmugam K and Jayaraman G, 2011. Production and partial purification of extracellular tannase by *Klebsiella pneumoniae* MTCC 7162 isolated from tannery effluent. African Journal of Biotechnology 10(8): 1364-1374.

Srinivasan VR, Cary JW, Chon Y and Narva KE, 1987. Gene for lignin degradation and uses thereof. United State Patent, Patent number: 4713336.

Tokuda G, Yamaoka I and Noda H, 2000. Localization of symbiotic clostridia in the mixed segment of the termite *Nasutitermes takasagoensis* (Shiraki). Applied and Environmental Microbiology 66:2199–2207.

Van Soest PJ, 1994. Nutritional Ecology of the Ruminant, 2nd ed. Cornell Univ. Press, Itacha, NY, USA, 476 pp.

Watabale H and Tokuda G, 2010. Cellulolytic systems in insects. Annual Review of Entomology 55: 609-632.

Watanabe Y, Shinzato N and Fukatsu T, 2003. Isolation of actinomycetes from termites' guts. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry 67:1797–801.

Yang VW, Zhuang Z, Elegir G and Jeffries TW, 1995. Alkaline-active xylanase produced by alkaliphilic *Bacillus* sp. isolated from kraft pulp. Journal of Industrial Microbiology 15: 434–441.

Determination of optimum temperature and pH for lignocellulosic materials-degrading bacteria isolated from termite gut and their effect on the digestibility and in vitro fermentation parameters of some agricultural by-products

A Azizi[1*], T Mohamadabadi[2], H Motamedi[3], M Chaji[2] and H Fazaeli[4]

Received: November 15, 2015 Accepted: May 23, 2016

[1]Assistant Professor, Department of Animal Science, Lorestan University, Khorramabad, Iran
[2]Associated Professor, Ramin Agriculture and Natural Resources University of Khuzestan, Khuzestan, Iran
[3]Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
[4]Professor, Animal Science Research Institute, Karaj, Iran
[*]Corresponding author: Email: azizi.msc.modares@gmail.com

Introduction: There is a shortage of animal feed and water resources in several developing countries. Thus, proper use of agro industrial by products is a useful means to overcome this problem. Agricultural by products can use as animal feeds, but because of high lignin and low protein content, their digestibility and palatability is low. Several processing method has been used to improving nutritive value of such materials (Rahal et al. 1997 and Fazaeli et al. 2004). Recently, biological delignification of lignocellulosic material has been considered as an alternative approach (Fazaeli et al. 2004). Termites gut contains different kinds of lignocellulose degrading microbes, which the possibility of their use in improving the nutritive value of agricultural by-products is a major step in compensation of animal feed shortage.

Material and methods: The present study was conducted to determine the optimum temperature and pH for growth of symbiont bacteria degrading lignocellulosic material isolated from termite gut, and to investigate their effects on the digestibility and *in vitro* fermentation parameters of wheat straw (WS) and date leaf (DL). For this purpose, three bacteria including *Bacillus licheniformis, Ochrobactrum intermedium* and *Microbacterium paludicola* were used, which isolated by culture of termite guts contents in mediums containing different types of lignin and lignocellulosic materials. Sterile basal media was used as a medium for isolation process and contained the following ingredients per litre: 7.0 g K_2HPO_4, 3.0 g KH_2PO_4, 1.0 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.1 g $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ (Borji 2003). Growth curves of isolated bacteria for optimum temperature and pH were obtained using nutrient broth medium. Three temperatures of 30, 37 and 40 ºC and four pH of 5, 6, 7 and 8 were evaluated. After that, WS and DL were processed with these isolates in media 9 (M9) medium with following composition (per litre): 6.2 g Na_2HPO_4, 3.0 g KH_2PO_4, 0.5 g NaCl, 1.0 g NH_4Cl (Kato et al. 1998). After processing, residues were collected, dried and used for *in vitro* gas production experiment according to Makkar (2010). For this purpose, rumen liquor was collected from two ruminally fistulated cows. Animals were maintained on a 60% hay and 40% concentrate diet according to their requirements for two weeks. Rumen contents were collected from the ventral sac of rumen before morning feeding. A completely randomized design was used to determine the optimum temperature and pH for bacterial growth as well as effects of different bacteria on *in vitro* gas production and fermentation parameters of treated substrates. Data were analyzed by General Linear Model (GLM) procedures of SAS (SAS Institute, 2001),

Results and discussion: All of isolates were capable of grow at all of examined temperatures (*i.e.*, 30, 37 and 40 ºC). The optimum growth of *B. licheniformis* occurred at 40 ºC, but the optimum growth of *O. intermedium* and *M. paludicola* was observed at 37 ºC. All of isolates grew at different pH ranges (*i.e.*, 5, 6, 7 and 8) and their optimum growth was observed at neutral pH of 7.0. At this neutral pH, highest growth for *B. licheniformis*, *O. intermedium* and *M. paludicola* was obtained

after 30, 34 and 36 h of incubation, respectively. After processing, in both WS and DL, highest and lowest gas production and organic matter (OM) digestibility were observed by *B. licheniformis* and control treatment, respectively (P<0.05). *In vitro* dry matter (DM) digestibility, truly digested substrate, metabolizable energy, partitioning factor, pH and ammonia nitrogen concentration were not affected by the experimental treatments. Factors such as temperature, pH, atmosphere gas composition, bacterial type, composition of media culture, number of bacteria used and end products bacteria and their interaction has an important effect on growth rate of isolates (Mohan and Manuselis 1995). Similar to our results, by isolation of *Bacillus sphaericus*, *Ochrobactrum anthropi* and *Enterobacter cloacae* from termite gut, Borji (2003) reported that their optimum temperature and pH were observed at 25-37 ºC and 7-8, respectively. Other researchers also reported similar results (Giroux et al. 1988 and Yang et al. 1995). Totally, obtaining optimizing pH and temperature of isolated bacteria for processing agricultural by-products can maximize their nutritive value. Improving OM digestibility and fermentation parameters in both substrates was maybe due to effect of isolates on changing lignin structure and loosening its bounds with carbohydrate compounds (VanSoet 2004). Consistent to results of present study, borji (2003) indicated that inoculation of wheat straw and barley straw with different bacteria isolated from termite gut increased their DM digestibility compared to control treatment. Increasing DM and OM digestibility and volume of gas production in WS than DL was probably because of lower lignin and higher carbohydrate content in the former (Azizi-Shotorkhoft et al. 2016).

Conclusion: Results of present study showed that optimum growth for *Ochrobactrum intermedium* and *Microbacterium paludicola* isolated from termite gut was observed at 37 ºC while it was 40 ºC for *Bacillus licheniformis*. Optimum pH for growth of all of isolates was 7. Processing wheat straw and date leaf with bacteria, especially *B. licheniformis* improved rumen fermentation parameters *in vitro*. Research for upgrading the nutritive value of by products with ligninolytic bacteria isolated from termite gut is in infancy. Thus, further works in this field of study is needed.

Keywords: Lignocellulosic materials, Termite gut bacteria, Temperature, pH, *In vitro* fermentation parameters