نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد هفتم، شماره دوم، ۱۳۹۸
http://ejrr.gau.ac.ir
۱۱۳-۱۲۸

بهینه‌سازی رشد باکتری‌های سلولولیتیک جدا شده از دستگاه گوارش اسب و بررسی اثر انتقال آن‌ها به شیرابه شکمبه بر گوارش پذیری کاه گندم

مریم هرسینی شاکرمی[۱]، *طاهره محمدآبادی[۲]، حسین معتمدی[۳]، محسن ساری[۲] و اسداله تیموری یانسری[۴]

[۱]دانشجوی دکتری و [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، [۳]استاد گروه زیست‌شناسی دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز، [۴]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری

تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/٤/۲٤

چکیده

سابقه و هدف: مواد لیگنو سلولزی در جیره نشخوارکنندگان از اهمیت بالایی برخوردار بوده و به دلیل مقرون به صرفه بودن و اثر بر عملکرد بهینه شکمبه و سلامت آن در جیره نشخوارکنندگان گنجانده می‌شوند. گرچه این ترکیبات توسط بسیاری از میکروب‌های شکمبه قابل تخمیر می‌باشند، ولی وجود پروتئین، فیبر و سایر مواد مغذی با منشا خوراکی در مدفوع نشان می‌دهد که اکوسیستم شکمبه برای هضم خوراک خورده شده کارایی بالایی ندارد. بنابراین دستکاری شکمبه جهت بالا بردن این کارایی ضروری به نظر می‌رسد. لذا این پژوهش با هدف بهینه سازی شرایط رشد باکتری‌های سلولولیتیک جدا شده از دستگاه گوارش اسب و اثر انتقال آنها به شیرابه شکمبه بر فراسنجه‌های تولید گاز و گوارش پذیری کاه گندم در شرایط برون تنی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در شرایط آزمایشگاهی و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. باکتری‌های سلولولیتیک جداشده از دستگاه گوارش اسب شامل *Paenibacillus polymyxa* L11، *Paenibacillus polymyxa* L12، *Enterobacter cloacae* L2 و *Escherichia coli* Z2 بودند. ابتدا بهینه‌سازی دما و pH برای رشد و تولید آنزیم این باکتری‌ها در دو دمای ۲۵ و ۳۹ درجه سانتی‌گراد و سه pH ۵/۲، ۵/۷ و ٦/۲ انجام پذیرفت. سپس با انتقال این باکتری‌ها به شیرابه شکمبه، فرانسجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم آزمایشگاهی کاه گندم به‌ترتیب با استفاده از دو تکنیک تولید گاز و هضم دو مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفتند. به این منظور از چهار راس گوسفند مایع شکمبه گرفته شد، در هر دو تکنیک مایع شکمبه با باکتری‌های مورد نظر تلقیح و با کاه گندم انکوبه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که جدایه *Paenibacillus polymyxa L12* بهترین رشد را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۲ و بیشترین فعالیت آنزیمی را در دمای ۳۹ درجه با pH ۵/۷ و در زمان ۲٤ ساعت داشت. دما و pH بهینه برای رشد *Paenibacillus polymyxa L11* و *Enterobacter cloacae L2* به‌ترتیب ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ٦/۲ بود. این دو باکتری بیشترین فعالیت آنزیمی را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ٦/۲ به‌ترتیب در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت از خود نشان دادند. *Escherichia coli Z2* نیز بیشترین رشد را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ٦/۲ از خود نشان داد ولی بیشترین

*نویسنده مسوول: mohammadabadi@asnrukh.ac.ir

فعالیت آنزیمی این باکتری مربوط به دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۲ و زمان ٤٨ ساعت بود. جدایه‌ها بـه طـور معنـی داری باعث کاهش تولید گاز کاه گندم، افزایش ماده آلی واقعا هضم شده، افزایش بیومس و راندمان بیومس میکروبی شدند (P<۰/۰۵). بیشترین و کمترین پتانسیل گاز تولیدی به ترتیب به تیمار شاهد (۵۹/۷۹ میلی لیتر) و تیمـار Z2 (۵۲/۰۰ میلـی لیتـر) اختصـاص داشت. بیشترین و کمترین مقدار ماده آلی واقعا هضم شده به ترتیب مربوط بـه تیمـار L11 (۲۸٤/٤ میلـی‌گـرم) و تیمـار شـاهد (۲٦٦/۱ میلی‌گرم) بود. بین ضریب تفکیک، بیومس میکروبی و راندمان بیومس میکروبی تیمارهای باکتریایی اختلاف معنـی‌داری وجود نداشت، ولی همگی بیشتر از تیمار شاهد بودند. تیمار L11 دارای بالاترین قابلیت هضم ماده خشک (۵۰/۷۳ درصد)، ماده آلی (٤۹/۳۹ درصد)، فیبر نامحلول در شوینده خنثی (٤۷/٦۹ درصد) و اسیدی (۳۵/۵۵ درصد) بود. تیمـار شـاهد دارای کمتـرین قابلیت هضم ماده خشک(۳۸/۸۳ درصد)، ماده آلی (۳۷/۷٦ درصد) و فیبر نامحلول در شوینده خنثی (۳٤/۵٦ درصـد) بـود. ولـی بین قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده اسیدی تیمارهای L12، L2 و Z2 با تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری وجود نداشت.

نتیجه‌گیری: به‌طورکلی دما و pH برروشد و تولید آنزیم جدایه‌ها تاثیر گذار بود. همه آنها در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد که دمـای مطلوب شکمبه است بهتر ازدمای ۲۵ درجه رشد کرده و فعالیت آنزیمی بیشتری داشتند.این باکتری‌ها توانستند تخمیر شـکمبه‌ای و قابلیت هضم مواد مغذی کاه را در شرایط آزمایشگاهی بهبود بخشند. در تیمارهای باکتریایی مسیر تخمیر به سمت تولیـد گـاز کمتر و پروتئین میکروبی بیشتر پیش رفت و قابلیت هضم مواد مغذی در این تیمارها افزایش یافت.

واژه‌های کلیدی: اسب، باکتری سلولولیتیک، تخمیر، قابلیت هضم، کاه گندم

مقدمه

ایران در منطقه اقلیمی خشک و نیمه خشـک قـرار گرفته است و عمده زمین‌های کشاورزی آن بـه کشـت غلات اختصاص یافته است به تبع آن بخش دامپروری کشور هم از بقایای زراعی و یا سایر محصولات جانبی این غلات در کشور استفاده می‌کند. کاه غـلات انـرژی خام تقریبا مشابهی با سایر علوفه‌های مورد اسـتفاده در تغذیه نشخوارکنندگان دارد (۱٦) اما به دلیل دارا بـودن دیواره سلولی بالا و نرخ هضم پایین باعث افت قابلیت هضم و در نتیجه تامین نابسـنده انـرژی خـالص بـرای حیوان می‌شود. با این حـال مـواد لیگنـو سـلولزی بـه دلایلی همچون اثر بر عملکرد بهینه شکمبه و سـلامت دستگاه گوارش در جیـره نشـخوارکنندگان از اهمیـت بـالایی برخـوردار هسـتند. پلیمرهـای کربوهیـدراتی گیاهی برای بسیاری از حیوانات غیر قابل هضـم بـوده ولی توسط بسیاری از میکروب‌های شکمبه هیـدرولیز و تخمیر می‌شوند. عوامـل بسـیاری بـر هضـم دیـواره سلولی در شکمبه تاثیر می‌گذارند. از جمله این عوامل می‌توان بـه عامـل آنزیمـی (میکـروب‌هـای شـکمبه)، خصوصیات فیزیکوشـیمیایی سوبسـترا (مثـل خـواص دیواره سلولی)، عوامل محیطی (بستر یا محیط زیسـت برای فعالیـت میکـروب مثـل pH، تـامین سـایر مـواد مغذی) و زمان ماندگاری در شکمبه اشاره کـرد (۱٦). گـروه‌هـای متنـوعی از میکـروب‌هـای شـکمبه شـامل باکتری‌هـای سـلولولیتیک، قـارچ‌هـا و پروتوزوآهـا در هضم الیاف فعالیـت دارنـد. بـا ایـن حـال اکوسیسـتم شکمبه برای هضم خوراک خورده شده کارایی بسـیار بالایی ندارد و زمان یـا فرصـت بـرای میکـروب‌هـای شکمبه محدود اسـت. از ایـن‌رو بخـش گـوارش‌پـذیر کاملا هضم نمـی‌شـود (۱۷). وجـود پـروتئین، فیبـر و سایر مواد مغذی بـا منشـا خـوراکی در مـدفوع و نیـز تولید متان بالا در شکمبه می‌تواند دلیلی بـر ایـن ادعـا باشـد. بنـابراین بکـار بسـتن اسـتراتژی‌هـایی جهـت بالابردن کارایی شکمبه برای هضم الیاف ضـروری بـه نظر می‌رسد.

در طی چند دهه گذشته جهت بهبود هضم و تخمیر مواد فیبری تحقیقات فراوانی صورت گرفته است. که می‌توان به دستکاری ژنتیکی دیواره سلولی (۱۹)، بکارگیری روش‌های فیزیکی و شیمیایی فراوری خوراک، دستکاری شکمبه مانند تلقیح باکتری به شکمبه (۳، ۲٤، ۳٦) و یا تغذیه میکروب‌ها به دام اشاره کرد. هانگیت (۱۹٦٦) در آزمایشی با تلقیح باکتری‌های فیبرولیتیک به شکمبه، اثرات اندکی در تجزیه فیبر مشاهده نمود (۱۷). عزیزی و همکاران (۱۳۹٦) نیز با انتقال باکتری‌های تجزیه کننده لیگنوسلولز جدا شده از روده موریانه به شیرابه شکمبه تاثیری بر فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم و سرشاخه خرما مشاهده نکردند (٤).

در حقیقت این تصور که میکروارگانیسم‌های شکمبه قابلیت تجزیه‌کنندگی فیبر قابل قبولی ندارند، همچنان باقیست و اکثر تلاش‌ها جهت تلقیح باکتری به شکمبه موفقیت‌آمیز نبوده است. که از دلایل آن می‌توان به درک ناقص بشر از اکوسیستم پیچیده شکمبه، فقدان سیستم‌های قابل اعتماد برای باکتری‌های سلولولیتیک شکمبه، درک ضعیف عوامل اکولوژیکی حاکم بر تداوم باکتری‌ها و قارچ‌های فیبرولیتیک، درک ضعیف این نکته که کدام آنزیم گلیکوزیل هیدرولاز نیازمند دستکاری است (۱۹) و انتخاب ناکارآمد باکتری‌های سلولولیتیک منتقل شده به شکمبه اشاره کرد.

اسب حیوانی تک معده‌ای و جز تخمیر کنندگان در انتهای دستگاه گوارش است. اگر چه این حیوان غیرنشخوارکننده می‌باشد، اما فعالیت میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش این حیوان نقش بسیار مهمی در تغذیه آن ایفا می‌کند. بیشتر اسب‌ها می‌توانند مواد مغذی مورد نیاز خود را با رژیم غذایی ۱۰۰ درصد علوفه تامین کنند. برخی محققین بیان نموده‌اند که آنزیم‌های حاصل از باکتری‌های سلولولیتیک اسب پتانسیل بیشتری برای هضم مواد فیبری نسبت به گاو و گوسفند دارا بوده و فعالیت سلولولیتیک اکوسیستم دستگاه گوارش اسب حتی در شرایط اسیدی هم پایدار است (۱۳). پژوهش حاضر با هدف بهینه سازی شرایط رشد و تولید آنزیم باکتری‌های سلولولیتیک جدا شده از دستگاه گوارش اسب و اثر انتقال آن‌ها به شیرابه شکمبه بر فراسنجه‌های تولید گاز و گوارش‌پذیری کاه گندم در شرایط برون تنی انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان انجام شد. در این پژوهش از چهار باکتری جدا شده از دستگاه گوارش اسب شامل *Paenibacillus polymyxa* L11، *Paenibacillus polymyxa* L12، *Enterobacter cloacae* L2 و *Escherichia coli* Z2 استفاده شد. این باکتری‌ها توسط همین محققین، با استفاده از محیط کشت محلول نمک‌های پایه حاوی کربوکسی متیل سلولز به‌عنوان تنها منبع کربن از مدفوع تازه اسب جداسازی شده و با استفاده از روش‌های مولکولی شناسایی شده بودند (۱۵). باکتری‌های مورد نظر بعد از بهینه‌سازی، در شرایط آزمایشگاهی به شیرابه شکمبه منتقل شده و تاثیر آن‌ها بر تخمیر و قابلیت هضم کاه گندم مورد بررسی قرار گرفت.

مرحله اول آزمایش، شامل بهینه‌سازی دما و pHرشد باکتری‌های سلولولیتیک جدا شده از دستگاه گوارش ٤ راس اسب عربی بود و در مرحله دوم تاثیر این باکتری‌های بر تخمیر و قابلیت هضم کاه گندم در قالب طرح کاملا تصادفی با ۵ تیمار (تیمار شاهد، *Paenibacillus polymyxa* L11، *Paenibacillus polymyxa* L12، *Enterobacter cloacae* L2 و *Escherichia coli* Z2) و ٦ تکرار با استفاده از تکنیک

تولید گاز و هضم دو مرحله‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

بهینه سازی دما و pH رشد جدایه‌های باکتریایی

برای انتخاب دما و pH رشد جدایه‌ها، منحنی رشد این باکتری‌ها در دو دمای ۲۵ و ۳۹ درجه سانتی‌گراد و سه pH ۵/۲، ۵/۷ و ٦/۲ در محیط کشت مایع رسم گردید. به این منظور ۱۸ ارلن ۲۵۰ میلی لیتری برای هر باکتری (دوتا دما، سه تا pH و سه تکرار) در نظر گرفته شد. و به هر کدام ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت نوترینت براث اضافه گردید. pH با استفاده از سود و اسید کلریدریک یک نرمال تنظیم شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استریل شده و در دمای اتاق خنک شدند (۳۸). به هر ارلن به مقدار ۱ درصد از سوسپانسون باکتریایی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند اضافه گردید و سپس در دماهای مورد نظر انکوبه شدند. به مدت ٢٤ ساعت هر دوساعت یک بار از کشت‌ها نمونه برداری صورت گرفت و جذب نمونه‌ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر یادداشت و در نهایت منحنی رشد باکتری رسم شد.

بهینه سازی دما و و pH تولید آنزیم جدایه‌های باکتریایی: برای انتخاب دما و pH بهینه تولید آنزیم دو دمای ۲۵ و ۳۹ درجه و سه pH ۵/۲، ۵/۷ و ٦/۲ در نظر گرفته شدند. به این منظور ۱۸ ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری برای هر باکتری (دوتا دما، سه تا pH و سه تکرار) در نظر گرفته شد. و به هر کدام ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت محلول نمک‌های پایه حاوی کربوکسی متیل سلولز اضافه گردید. pH محیط کشت با استفاده از سود و اسید کلریدریک یک نرمال تنظیم شد. سپس ارلن‌ها در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه استریل شده و در دمای اتاق خنک شدند. به هر ارلن به مقدار ۱ درصد از سوسپانسون باکتریایی با غلظت ۰/۵ مک‌فارلند اضافه گردید و سپس در دماهای موردنظر انکوبه شدند. در زمان های ٢٤، ٤٨ و ۷۲ ساعت نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها با دور ۵۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ٤ ذرجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند و مایع رویی حاصل به عنوان منبع آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت. برای سنجش فعالیت آنزیمی یک میلی‌لیتر محلول آنزیمی به سوبسترای CMC یک درصد (یک میلی‌لیتر محلول CMC یک درصد بعلاوه یک میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم ۱صدم میلی مولار با pH ۵/۲، ۵/۷ و ٦/۲) اضافه شد. مخلوط یک ساعت در دماهای مورد نظر انکوبه گردید و برای توقف واکنش آنزیمی یک میلی‌لیتر معرف دی نیتروسالیسیلیک اسید به آن اضافه گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب جوش قرار داده شدند تا در اثر احیا معرف توسط قند احیا شده (گلوکز)، تغییر رنگ معرف از زرد به قرمز انجام پذیرد. سپس برای تثبیت رنگ، لوله‌ها بلافاصله در آب یخ قرار گرفتند. لوله‌ها با دور g ۱۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه جهت رسوب زیر واحدهای سلولز باقیمانده سانتریفیوژ شدند. جذب نوری در طول موج ٥٤٦ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر برای هر لوله خوانده شد. درنهایت فعالیت CMCase با استفاده از منحنی استاندارد گلوکز اندازه‌گیری شد (۳۸).

آزمون تولید گاز: میزان گاز تولیدی حاصل از تخمیر شکمبه‌ای طبق روش منک و استینگس (۱۹۸۸) اندازه گیری شد (۲۳). به این منظور از ٤ راس گوسفند عربی تغذیه شده با جیره پایه علوفه ای، شیرابه شکمبه گرفته شد. مایع شکمبه بلافاصله به‌وسیله ٤ لایه پارچه‌متقال صاف گردید و درون فلاسک عایق‌دار با شرایط دمایی ۳۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه انتقال داده شد. در آزمایشگاه جهت اطمینان از شرایط بی‌هوازی گاز CO_2 به مایع شکمبه صاف شده تزریق گردید و همچنین قبل از استفاده جهت انکوباسیون، در حمام آب‌گرم بادمای ۳۹ درجه سانتی گراد قرار گرفت.

درون ویال‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری شیشه‌ای ۵۰۰ میلی‌گرم کاه گندم همراه با مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (با نسبت یک به دو) ریخته شد و سپس به این ویال‌ها یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری مورد نظر با غلظت یک مک‌فارلند اضافه شد.

ویال‌ها با استفاده از کپسول دی اکسید کربن بی‌هوازی شدند و پس از پرس کردن درب آن‌ها در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد درون حمام آب‌گرم انکوبه شدند. حجم گاز تولیدی در زمان‌های ۲، ٤، ٦، ٨، ١٢، ٢٤، ٣٦، ٤٨، ٧٢، ٩٦ و ١٢٠ ساعت با استفاده از دستگاه فشار سنج اندازه گیری شد. داده‌های گاز تولیدی با استفاده از مدل $Y = b(1 - e^{-ct})$ (برازش شدند (۲۷)، که در آن، b گاز تولید شده از بخش ماده آلی به آرامی قابل تخمیر (بخش نامحلول) و c نرخ تخمیر (سرعت تولید گاز) بود.

پس از پایان انکوباسیون محتوای ویال‌ها با محلول شوینده خنثی به مدت یک ساعت جوشانده و سپس صاف شد. باقیمانده در آون خشک و جهت اندازه‌گیری خاکستر به کوره منتقل شد. در نهایت ماده آلی واقعا هضم شده محاسبه و بر اساس آن ضریب تفکیک، توده میکروبی و راندمان تولید میکروبی با استفاده از روابط زیر محاسبه گردید.

گاز تولیدی(mL) / ماده آلی واقعا هضم شده (mg) = ضریب تفکیک ($mg\ mL^{-1}$)

(گاز تولیدی (mL) ×۲/۲)- ماده آلی واقعا هضم شده (mg) = بیومس میکروبی (mg)

ماده آلی واقعا هضم شده (mg) / بیومس میکروبی (mg) = راندمان تولید میکروبی

قابلیت هضم دو مرحله‌ای آزمایشگاهی: برای اندازه‌گیری قابلیت هضم آزمایشگاهی از روش تلی و تری (۱۹٦۳) استفاده شد (۳۳). به این صورت که از ٤ راس گوسفند عربی شیرابه شکمبه گرفته شد. پس از صاف کردن در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد به آزمایشگاه منتقل شد و تحت شرایط بی‌هوازی قرار گرفت. درون لوله‌های ۱۰۰ میلی لیتری ۵۰۰ میلی‌گرم از ماده خشک کاه گندم همراه با مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (با نسبت ۱ به ٤) ریخته شد و سپس به آن‌ها یک میلی‌لیتر محیط کشت حاوی باکتری مورد نظر با غلظت یک مک‌فارلند اضافه شد و در شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. در پایان روز دوم، پس از گذشت ٤٨ ساعت از شروع آزمایش، درپوش لوله‌ها را برداشته به هر کدام از لوله‌ها ٦ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲۰ درصد اضافه گردید. این کار علاوه بر از بین بردن میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای، pH آن را نیز کاهش می‌دهد تا محیط برای فعالیت آنزیم پپسین آماده شود. بعد از آن ۰/۵ گرم آنزیم پپسین را در ۱۰۰سی‌سی اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال حل کرده و به هر لوله ۵ سی‌سی از محلول آنزیمی اضافه شد. در این مرحله لوله‌ها به مدت ٤٨ ساعت دیگر انکوبه شدند. سپس محتویات لوله‌ها به کمک پارچه‌ای از جنس داکرون و پمپ خلاء صاف و پس از خشک شدن در آون مواد مغذی آن‌ها اندازه‌گیری شد. بخش الیاف نامحلول در شوینده خنثی با استفاده از روش ون سوست و همکاران (۱۹۹۱)(۳٤) و بخش الیاف نامحلول در شوینده اسیدی با استفاده از روش استاندارد اندازه‌گیری گردید (۲). از رابطه‌ی زیر قابلیت هضم مواد مغذی محاسبه شد:

ماده مغذی اولیه / (ماده مغذی اولیه – ماده مغذی باقیمانده) = قابلیت ماده مغذی

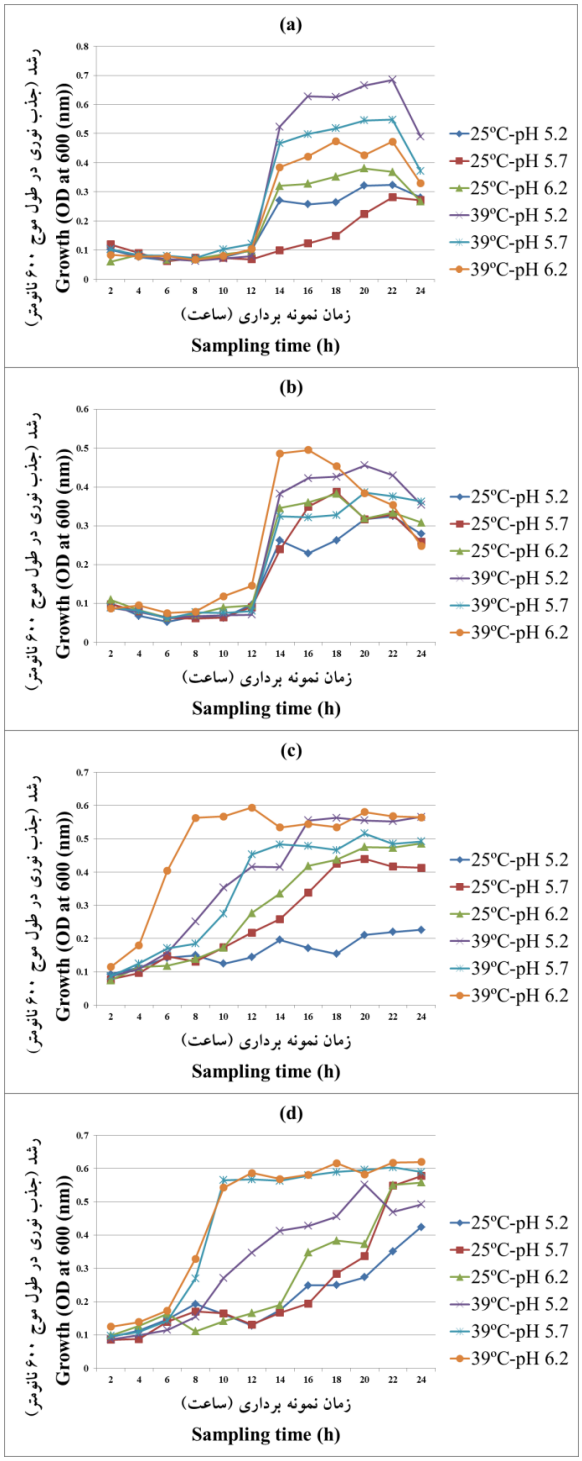
نتایج و بحث

بهینه‌سازی: نتایج مربوط به بهینه‌سازی شرایط رشد و تولید آنزیم جدایه‌های مورد آزمایش در شکل های ۱ و ۲ آورده شده‌اند. منحنی رشد *Paenibacillus polymyxa* L11 نشان داد که این جدایه بهترین رشد

را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ۵/۲ از خود نشان می‌دهد. این ایزوله بیشترین فعالیت آنزیمی را در دمای ۳۹ درجه با pH ۵/۷ و در زمان ۲٤ ساعت داشت. دما و pH بهینه برای رشد *Paenibacillus polymyxa* L12 و *Enterobacter cloacae* L2 ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ٦/۲ بود. همچنین این دو باکتری بیشترین فعالیت آنزیمی را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ٦/۲ به‌ترتیب در زمان‌های ۲٤ و ٤۸ ساعت از خود نشان دادند. *Escherichia* coli Z2 نیز بیشترین رشد را در دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و pH ٦/۲ از خود نشان داد ولی بیشترین فعالیت آنزیمی این باکتری مربوط به دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد، pH ۵/۲ و زمان ٤۸ ساعت بود. به‌طورکلی همه ایزوله‌ها در دمای ۳۹ درجه بهتر ازدمای ۲۵ درجه رشد کردند.

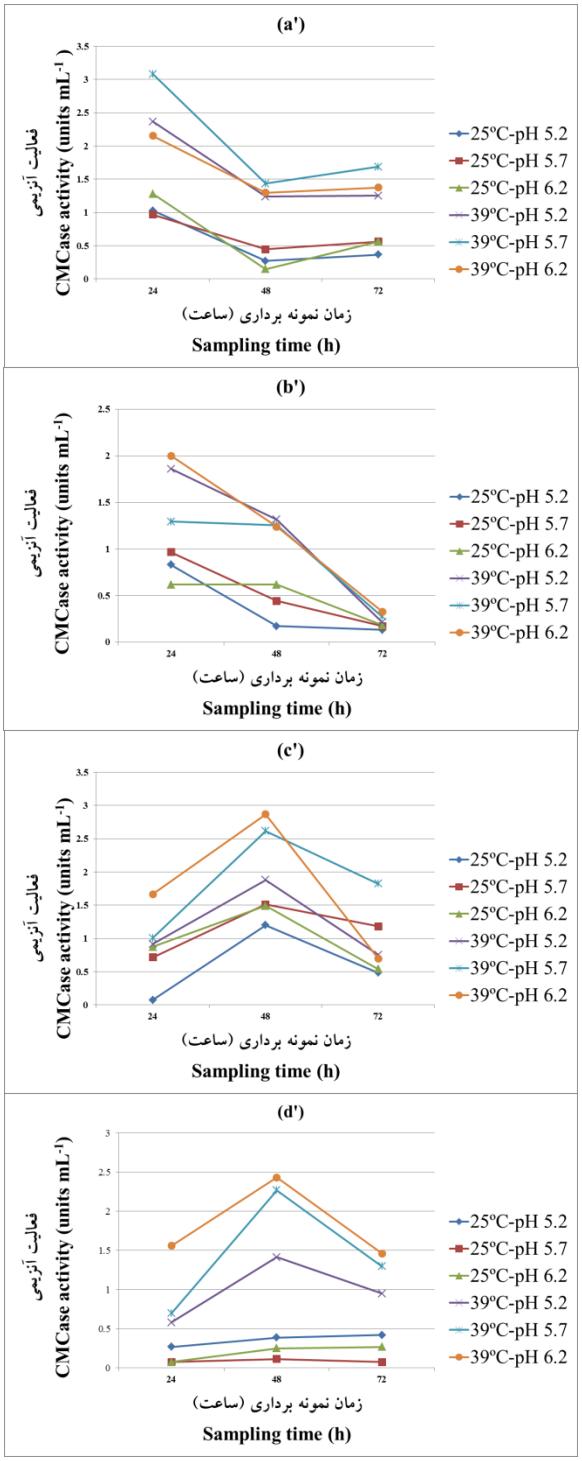
شرایط محیطی بر افزایش رشد و فعالیت آنزیمی تاثیر بسیار بالایی داشته از این رو حفظ شرایط بهینه دمایی و pH محیط رشد باکتری بسیار مهم است. در مطالعه حاضر نیز نتایج نشان داد که افزایش یا کاهش دما و pH می‌تواند بر رشد جدایه تأثیر بگذارد. اثر pH بر رشد باکتری سلولولیتیک توسط چندین محقق مورد مطالعه قرار گرفته است و pH بهینه برای رشد بین ۷ تا ۷/۵ گزارش شده است (۵، ۷، ۲۸).

ویژگی دمای جدایه‌ها نشان داد که همه آن‌ها در سه دمای مورد نظر رشد کرده‌اند. با این حال رشد و تولید آنزیم آن‌ها در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد بهتر از ۲۵ درجه سانتی‌گراد بود. گزارش‌های متنوعی در مورد pH و دمای بهینه برای تولید آنزیم سلولولیتیک توسط گونه‌های *Paenibacillus* وجود دارد. در مطالعه‌ای، *P. curdlanolyticus* B-6 برای تولید آنزیم در pH ۷ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد (۳۵). علاوه بر این، کومار و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که pH و دمای بهینه برای تولید CMCase توسط *P. polymyxa* به‌ترتیب ۵/۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود (۲۰). یون و همکاران (۲۰۰۳) دمای بهینه رشد برای *P. terrae* را ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیان نمودند (۳۹). لیانگ و همکاران (۲۰۱٤) گزارش نمودند که بهترین دما و pH برای رشد و تولید آنزیم *P. terrae* ME27-1 به ترتیب ۸ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد بوده و زمانی که pH محیط کشت بهینه نبود میزان فعالیت آنزیمی کاهش یافت (۲۲). در مطالعه شینده و همکاران (۲۰۱۷) *Enterobacter cloacae* و *Enterobacteraerogens* بیشترین رشد را در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد نشان دادند (۳۱). این محققین بیان نمودند که گونه‌های انتروباکتر می‌توانند هم در محیط‌های اسیدی و هم بازی زنده بمانند. نتایج ستهی و همکاران (۲۰۱۳) نشان داد که *E.coli* در pH حدود ٦ تا ٦/۵ و دمای حدود ۳۲ تا ۳۷ بیشترین فعالیت آنزیمی را داشته است (۳۰).



شکل ۱: اثر **pH** و دما بر رشد باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش اسب.

Figure 1. Effect of initial pH and temperature on growth bacteria isolated from gastrointestinal tract of horse. ***Paenibacillus polymyxa L11*** **(a)_** ***Paenibacillus polymyxa L12*** **(b)_** ***Enterobacter cloacae L2*** **(c)_** ***Escherichia coli Z2*** **(d)**



شکل ۲: اثر **pH** و دما بر فعالیت **CMCase** باکتری‌های جدا شده از دستگاه گوارش اسب.

Figure 2. Effect of initial pH and temperature on CMCase activity of bacteria isolated from gastrointestinal tract of horse. *Paenibacillus polymyxa L11* (a')_ *Paenibacillus polymyxa L12* (b')_ *Enterobacter cloacae L2* (c')_ *Escherichia coli Z2* (d')

فراسنجه‌های تولید گاز و قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم: نتایج مربوط به تاثیر انتقال گونه‌های باکتری بر فراسنجه‌های تولید گاز (جدول ۱) نشان داد که جدایه‌های باکتریایی به طور معنی داری باعث کاهش تولید گاز کاه گندم، افزایش مقدار ماده خشک تجزیه شده بصورت حقیقی، افزایش بیومس و راندمان بیومس میکروبی شدند (P<۰/۰۵). بیشترین و کمترین پتانسیل گاز تولیدی به ترتیب به تیمار شاهد و تیمار *Escherichia coli* Z2 اختصاص داشت. کمترین و بیشترین مقدار ماده آلی واقعا هضم شده به ترتیب مربوط به تیمار شاهد و تیمار L11 *Paenibacillus polymyxa* بود. بین ضریب تفکیک، بیومس میکروبی و راندمان بیومس میکروبی تیمارهای باکتریایی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ولی همگی بیشتر از تیمار شاهد بودند.

نتایج مربوط به تاثیر تلقیح جدایه‌های باکتریایی بر قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود اثر تیمار بر تمامی قابلیت هضم‌ها معنی دار بوده و تیمار *Paenibacillus polymyxa* L11 دارای بالاترین قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، فیبر نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی بود. تیمار شاهد دارای کمترین مقدار قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و فیبر نامحلول در شوینده خنثی بود ولی بین قابلیت هضم فیبر نامحلول در شوینده اسیدی تیمارهای *Paenibacillus polymyxa* L12، *Enterobacter cloacae* L2 و *Escherichia coli* Z2 با تیمار شاهد اختلاف معنی داری وجود نداشت.

جدول ۱: اثر تلقیح گونه‌های باکتری جداشده از دستگاه گوارش اسب بر فراسنجه های تخمیر کاه گندم

Table 1. Effect of inoculation of bacteria isolated from gastrointestinal tract of horse on fermentation parameters of wheat straw

تیمار treatment	پتانسیل تولید گاز (میلی‌لیتر به ازای ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک) b	نرخ تولید گاز (میلی‌لیتر در ساعت) c	ماده آلی واقعا هضم شده TDOM (mg)	ضریب تفکیک PF (mg mL^{-1})	بیومس میکروبی Microbial biomass (mg)	راندمان بیومس میکروبی Microbial biomass efficiency
شاهد control	59.79±1.517^{a}	0.0328±0.0022	266.1^{c}	4.629^{b}	139.6^{b}	0.524^{b}
Paenibacillus polymyxa L11	56.42±1.909^{ab}	0.0302±0.0027	284.4^{a}	5.342^{a}	167.0^{a}	0.587^{a}
Paenibacillus polymyxa L12	54.36b±2.219^{c}	0.0248±0.0025	275.5^{b}	5.498^{a}	164.9^{a}	0.598^{a}
Enterobacter cloacae L2	53.97±1.628bc	0.0337±0.0028	276.1^{b}	5.338^{a}	162.2^{a}	0.587^{a}
Escherichia coli Z2	52.00±2.151^{c}	0.0250±0.0026	276.2^{b}	5.515^{a}	165.9^{a}	0.600^{a}
SEM	1.222	0.0028	1.975	0.1248	3.0173	0.0095
سطح احتمال P-value	0.0048	0.1192	0.0003	<0.0001	<0.0001	0.0003

SEM: خطای استاندارد میانگین ها

در هر ستون اعداد دارای حروف غیر مشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰۵).

SEM: Standard error of the means

In each column, values with different letters are significantly different (P<0.05).

جدول ۲- اثر تلقیح گونه‌های باکتری جداشده از دستگاه گوارش اسب بر قابلیت هضم آزمایشگاهی مواد مغذی کاه گندم (درصد)

Table 1. Effect of inoculation of bacteria isolated from gastrointestinal tract of horse on *in vitro* nutrient digestibility of wheat straw (%)

فیبر نامحلول در شوینده اسیدی ADF	فیبر نامحلول در شوینده خنثی NDF	ماده آلی Organic mater	ماده خشک Dry mater	تیمار
32.53^{b}	34.56^{e}	37.76^{d}	38.83^{c}	شاهد control
35.55^{a}	47.69^{a}	49.39^{a}	50.73^{a}	*Paenibacillus polymyxa* L11
32.87^{b}	43.29^{b}	43.53^{b}	44.90^{b}	*Paenibacillus polymyxa* L12
32.93^{b}	37.06^{d}	42.10^{bc}	43.25^{b}	*Enterobacter cloacae* L2
31.88^{b}	40.61^{c}	39.43^{cd}	40.58^{c}	*Escherichia coli* Z2
0.5690	0.6046	1.019	0.9123	SEM
0.0015	<0.0001	<0.0001	<0.0001	سطح احتمال P-value

SEM: خطای استاندارد میانگین ها

در هر ستون اعداد دارای حروف غیر مشابه از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند (P<۰/۰۵).

SEM: Standard error of the means

In each column, values with different letters are significantly different (P<0.05).

مطالعات قابل توجهی جهت دستکاری شرایط تخمیر شکمبه یا دستگاه گوارش نشخوارکنندگان به منظور افزایش هضم مواد لیگنوسلولزی یا سایر مواد خوراکی با استفاده از مواد تلقیحی صورت گرفته است که نتایج آن‌ها بسیار متنوع می‌باشد. ولی تاکنون پژوهشی در زمینه انتقال باکتری‌های سلولولیتیک جدا شده از دستگاه گوارش اسب به شیرابه شکمبه نشخوارکنندگان صورت نگرفته است و اطلاعات اندکی در این مورد وجود دارد.

در برخی مطالعات میکروارگانیسم‌های تلقیحی به شیرابه شکمبه معمولا در شکمبه ناپدید گردیده‌اند که از دلایل آن می‌توان به نقش پروتوزوا به عنوان مصرف کننده باکتری‌ها اشاره کرد (۱۸ و ۱۹)، از طرفی ممکن است ایزوله های مورد آزمایش در محیط شکمبه زنده بمانند اما قادر به تولید و ترشح آنزیم جهت تجزیه مواد لیگنوسلولزی نبوده‌اند و احتمال اینکه آنزیم‌های ترشحی آن‌ها توسط سایر میکروب‌های شکمبه به عنوان منبع پروتئینی مصرف شده باشند نیز وجود دارد. هانگیت (۱۹٦٦)، با تلقیح باکتری‌های تجزیه کننده فیبر به شکمبه، بهبودی در تجزیه فیبر در شکمبه مشاهده نکرد (۱۷). عزیزی و همکاران (۱۳۹٦) گزارش نمودند که انتقال باکتری‌های تجزیه کننده مواد لیگنوسلولزی جدا شده از دستگاه گوارش موریانه به شیرابه شکمبه تاثیری بر قابلیت هضم فراسنجه‌های تخمیر کاه گندم و سرشاخه نیشکر نداشت. ولی غلظت نیتروژن آمونیاکی تلقیح شده با باکتری در هر دو سوبسترا در مقایسه با تیمار شاهد افزایش نشان داد که علت آن را بلع احتمالی باکتری‌های تلقیح شده توسط پروتووزای شکمبه و به تبع آن افزایش نیتروژن آمونیاکی دانستند (٤). چرا که پروتوزوا به طور معمول نقش قابل توجهی در بلع باکتری‌های شکمبه دارند (۹ و ۱۰). با این حال کومار وهمکاران (۲۰۱٤) گزارش نمودند که تغذیه سویه *tdgb 406* باکتری *استرپتوکوس گالولیتیکوس* با قابلیت تجزیه‌گنندگی تانن به عنوان پروبیوتیک همراه برگ‌های کوئرکوس سمی کارپیفولیا غنی از تانن به

بزها سبب بهبود عملکرد رشد و ضریب تبدیل غذایی نسبت به تیمار شاهد (بدون تلقیح باکتریایی) شد (۲۱).

از جمله مطالعات دیگر در زمینه دستکاری شکمبه می‌توان به استفاده از باکتری‌های نوترکیب (تغییر یافته از نظر ژنتیکی) جهت بهبود هضم فیبر در شکمبه اشاره کرد. در واقع این مطالعات با این فرض که اکوسیستم شکمبه قادر به تولید مخلوط کاملی از آنزیم‌ها جهت حداکثر نمودن تجزیه دیواره سلولی نیستند، انجام شده اند. به عنوان مثال رومینوکوکوس و فیبروباکتر قادر به تولید اگزوسلولازهای فعال جهت تجزیه سلولز کریستاله نیستند، بنابراین افزودن این قابلیت به این باکتری‌ها می‌تواند توانایی آن‌ها را جهت تجزیه سلولز افزایش دهد. با این حال 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 (٦، ٨، ١٤) اما در *بوتیریویبریو فیبروسالونس*، *استرتریتوکوکوس بویس* (۳۷) و گونه های پریووتلا (۳۲) نتایج امیدوار کننده‌ای به‌دست آمده است. *بوتیریویبریو فیبروسالونس* از لحاظ اکولوژیکی باکتری ارزشمندی بوده که مورد مناسبی جهت تغییر ژنتیکی به‌منظور تجزیه مناسب فیبر می‌باشد. تغییر ژنتیکی این باکتری توسط گلیکوزیل هیدرولاز موفقیت آمیز بوده به نحوی که قابلیت هضم برون‌تنی فیبر را بهبود بخشیده است (١٤ و ١٨).

کوتا و همکاران (۱۹۹۷) در مطالعه‌ای با دستکاری ژنتیکی سویه باکتریایی *باکتریویدس تتایوتائومیکرون* جدا شده از کولون انسان از نظر تولید آنزیم گلوکاناز و انتقال آن به محیط کشت مخلوط با جمعیت میکروبی شکمبه بیان نمودند که این باکتری تنها زمانی که کوندرویتین سولفات (یک موکوپلی ساکارید مورد استفاده توسط این باکتری) به محیط کشت اضافه شد قدرت ماندگاری در محیط کشت را داشت (۱۱). در آزمایش کشت پیوسته دیگری توسط زیمر و همکاران (۲۰۰۲) این باکتری به مدت ١٤٤ ساعت پس از تلقیح به محیط کشت به میزان ۱ درصد جمعیت کل میکروبی وجود داشت و افزایش اندکی در هضم فیبر توسط این باکتری مشاهده گردید (٤٠). در هر دو مطالعه مذکور مایع شکمبه مورد استفاده فاقد پروتوزوا بود. ساهو و همکاران (٢٠٠٤) نیز بین نمودند که انتقال باکتری‌های سلولایتیک جدا شده از دستگاه گوارش نشخوارکنندگان وحشی به شیرابه شکمبه در شرایط آزمایشگاهی باعث افزایش قابلیت هضم ماده خشک و فیبر نامحلول در شوینده خنثی کاه گندم و سبوس گندم در ٢٤ ساعت اول کشت شد. این محققین بیان نمودند که این باکتری‌ها نسبت به باکتری‌های سلولولیتیک دستگاه گوارش نشخوارکنندگان اهلی فعالیت آنزیمی بیشتری داشته و می‌توانند به عنوان یک افزودنی در جیره نشخوارکنندگان اهلی استفاده شوند (۲۹).

به‌طور کلی میزان تخریب فیبر در شکمبه بستگی به توانایی تک تک میکروب‌های موجود در کنسرسیوم میکروبی دارد. باکتری‌های منتقل شده به شیرابه درصورتی می‌توانند بر تخمیر و قابلیت هضم تاثیر بگذارند که دارای ویژگی‌هایی همچون قدرت ماندگاری در شکمبه، قدرت انطباق پذیری با شرایط فیزیکی، شیمیایی و دمایی شکمبه و قدرت تولید آنزیم جهت هضم مواد خوراکی باشند. همانطور که نتایج مشخص نمود جدایه‌های استفاده شده در پژوهش حاضر قدرت تغییر در شرایط تخمیر را داشته و توانسته‌اند میزان گاز تولیدی، ضریب تفکیک، بیومس میکروبی، ماده آلی واقعا هضم شده و راندمان بیومس میکروبی را تغییر دهند. درواقع می‌توان بیان نمود که احتمالا در این تیمارها افزایش تخمیر در

نتیجه افزایش تعداد سلولولیتیک‌ها و به تبع آن افزایش آنزیم‌های سلولولیتیک اتفاق افتاده‌است (۱)؛ تیمارهای باکتریایی باعث کاهش گاز تولیدی شده ولی مقدار تجزیه پذیری ماده آلی را افزایش داده‌اند به همین دلیل باعث افزایش ضریب تفکیک شده‌اند. در واقع می‌توان بیان نمود که تیمارهای باکتریایی باعث افزایش تخمیر شده و مسیر تخمیر را به سمت تولید گاز کمتر و پروتئین میکروبی بیشتر پیش برده‌اند. محمد آبادی و همکاران (۲۰۱۸) با انتقال آنزیم‌های فیبرولیتیک به شیرابه حاوی باکتری‌های دستگاه گوارش اسب افزایش معنی‌داری در راندمان سنتز میکروبی کاه گندم مشاهده کردند (۲۵) که موافق با نتایج پژوهش حاضر بود.

تیمارهای باکتریایی در مجموع باعث بهبود قابلیت هضم شدند. این افزایش قابلیت هضم، به خصوص برای هضم فیبر ممکن است به علت افزایش جمعیت میکروبی شیرابه شکمبه (۲۶) و یا افزایش فعالیت باکتری سلولولیتیک شیرابه (۱۲) باشد. البته بین قابلیت هضم مواد مغذی در تیمارهای باکتریایی نیز اختلاف معنی داری مشاهده شد و تیمار مربوط به جدایه *Paenibacillus polymyxa* L11 ماده آلی واقعا هضم شده و قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی، فیبر نامحلول در شوینده خنثی و فیبر نامحلول در شوینده اسیدی بیشتری نسبت به دیگر تیمارها داشت. باتوجه به منحنی‌های رشد و تولید آنزیم، بالاتر بودن این فاکتورها ممکن است به این دلیل بیشتر بودن رشد و فعالیت آنزیمی این جدایه باشد.

نتیجه گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده از دستگاه گوارش اسب در دمای ۳۹ درجه سانتیگراد که دمای مطلوب شکمبه بوده و همچنین در دامنه pH ۵/۲ تا ٦/۲ قادر به رشد و تولید آنزیم بودند. تلقیح این جدایه‌ها به مایع شکمبه در شرایط آزمایشگاهی باعث بهبود تخمیر، افزایش راندمان میکروبی و افزایش قابلیت هضم مواد مغذی کاه گندم شد. که نشان می‌دهد این باکتری‌ها احتمالا قادر به زنده مانی در شیرابه شکمبه و تولید آنزیم سلولولیتیک بوده اند. با توجه به اینکه پژوهش حاضر در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است به نظر می‌رسد جهت بررسی و اطمینان بیشتر از اثر این باکتری‌ها بر تخمیر و گوارش پذیری کاه گندم بهتر است این آزمایش در دام زنده نیز صورت پذیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم میدانند از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان به خاطر حمایت مالی این پژوهش تشکر و قدردانی به عمل آورند.

منابع

1. Alvarez, G., Pinos-Rodríguez, J.M., Herrera, J.G., García, J.C., Gonzalez, S.S., and Barcena, R. 2009. Effects of exogenous fibrolytic enzymes on ruminal digestibility in steers fed high fiber rations. Livest. Sci. 121: 150-154.
2. AOAC. 1990. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, VA, USA.
3. Attwood, G.T., Lockington, R.A., Xue, G. P., and Brooker, J.D. 1988. Use of a unique gene sequence as a probe to enumerate a strain of Bacteroides ruminicola introduced into the rumen. Appl. Environ. Microbiol. 54(2): 534-539.
4. Azizi, A., Mohammadabadi, T., Motamedi, H., Chaji, M., and Fazaeli, H. 2016. 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 liaf. Anim. Sci. J. (pajouhesh & sazandegi). 114: 219-230. (In Persian)
5. Balamurugan, A., Jayanthi, R., Nepolean, P., Pallavi, R.V., and Premkumar, R. 2011. Studies on cellulose degrading bacteria in

tea garden soils. Afr. J. Plant Sci. 5(1): 22-27.
6. 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 *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156. Curr. Microbiol. 30(2): 105-109.
7. Bholay, A. D., Gaur, A., Ganeshan, M., and Shah, R. 2014. Exploration of cellulolytic potential of Termite gut flora for sustainable development. J. Environ. Sci. Toxicol. Food Technol. 8(2): 71-76.
8. Clark, R.G., Cheng, K.J., Selinger, L.B., and Hynes, M.F. 1994. A conjugative transfer system for the rumen bacterium, *Butyrivibrio fibrisolvens*, based on Tn916-mediated transfer of the *Staphylococcus aureus* plasmid pUB110. Plasmid. 32(3): 295-305.
9. 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*. J. Appl. Bacteriol. 56(2): 283-294.
10. 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 maggii*. J. Appl. Bacteriol. 47(3): 409-419.
11. Cotta, M.A., Whitehead, T.R., and Rasmussen, M.A. 1997. Survival of the recombinant *Bacteroides thetaiotaomicron* strain BTX in *in vitro* rumen incubations. J. Appl. Microbiol. 82(6): 743-750.
12. Dawson, K.A. 1993. Probiotics and enzymes in ruminant nutrition. In Enzymes in Animal Nutrition, Proceedings of the 1st Symposium. Kartause Ittingen, Switzerland. 89-96.
13. Fon, F. N., Nsahlai, I.V., and Scogings, P. F. 2014. Extraction and comparison of fibrolytic enzyme additives from gut of 11 ungulates. Afr. J. Biochem. Res. 8(2): 31-38.
14. 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 fibrisolvens. J*. Appl. Microbiol. 93(1): 122-133.
15. Harsini Shakarami, M., Mohammadabadi, T., Motamedi, H., Sari, M., and Teimouri Yansari, A. 2019. Isolation and identification of cellulolytic bacteria from gastrointestinal tract of Arabian horse and investigation of their effect on the nutritional value of wheat straw. J. Appl. Microbiol. 1-10.
16. Hatef, H., Sarvari, A.A., Daneshvar, M., and Sadrolashraf, M. 2007. The determine of milk price and milk production breakeven level (Khorasan province case study). 6th National Conference of Agricultural Economics. Ferdowsi University of Mashhad, Iran. (In Persian)
17. Hungate, R.E. 1966. The rumen and its microbes. Academic press, New York.
18. Krause, D.O., Bunch, R.J., Conlan, L.L., Kennedy, P.M., Smith, W.J., Mackie, R.I., and McSweeney, C.S. 2001. Repeated ruminal dosing of *Ruminococcus* spp. does not result in persistence, but changes in other microbial populations occur that can be measured with quantitative 16S-rRNA-based probes. Microbiology. 147(7): 1719-1729.
19. 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 Microbiol. Rev. 27(5): 663-693.
20. Kumar, D., Ashfaque, M., Muthukumar, M., Singh, M., and Garg, N. 2012. Production and characterization of carboxymethyl cellulase from *Paenibacillus polymyxa* using mango peel as substrate. J. Environ. Biol. 33(1): 81-84.
21. Kumar, K., Chaudhary, L.C., Agarwal, N., and Kamra, D.N. 2014. Effect of feeding tannin degrading bacterial culture (*S treptococcus gallolyticus* strain TDGB 406) on nutrient utilization, urinary purine derivatives and growth performance of goats fed on Q uercus semicarpifolia leaves. Anim. Physiol. Anim. Nut. 98(5): 879-885.
22. Liang, Y.L., Zhang, Z., Wu, M., Wu,Y. and Feng, J.X. 2014. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. Biomed Res Int.
23. Menke, K.H. and Steingass, H. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and gas production using rumen fluid. Anim. Res. Dev. 28: 7–55.
24. 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. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2030-2032.

25. Mohammadabadi, T., Shakarami, M. H., Elghandour, M. M., Salem, A. Z., and Monroy, J.C. 2018. Effect of Natuzyme enzyme on fecal digestion and fermentation of wheat straw and alfalfa hay in Arabian horses. J. Equine Vet. Sci. 70: 13-17.
26. Newbold, C.J., Wallace, R.J., and McIntosh, F. M. 1996. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Br. J. Nut. 76(2): 249-261.
27. Ørskov, E.R., and McDonald, I.M. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J. Agric. Sci. (Cambrige). 92: 499-503.
28. Rasi, R.M., and Mahalingam, P.U. 2012. Screening and Partial Characterization of Cellulose Degrading Bacteria from Decayed Sawdust. Int. J. Sci. Res. 3(8): 328-331.
29. Sahu, N.P., Kamra, D.N., and Paul, S.S. 2004. Effect of cellulose degrading bacteria isolated from wild and domestic ruminants on *in vitro* dry matter digestibility of feed and enzyme production. Asian-australas. J. Anim. Sci. 17(2): 199-202.
30. Sethi, S., Datta, A., Gupta, B. L., and Gupta, S. 2013. Optimization of cellulase production from bacteria isolated from soil. ISRN Biotechnol.
31. Shinde, V. S., Agrawal, T., and Kotasthane, A. S. 2017. Molecular Characterization of Cellulolytic Bacteria Derived From Termite Gut and Optimization of Cellulase Production. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 6(10): 2474-2492.
32. 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* B (1) 4. Appl. Environ. Microbiol. 57(8): 2114-2120.
33. Tilley, J.M.A., and Terry, R.A. 1963. A two stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. J. Br. Grassl. Soc. 18: 104–111.
34. Van Soest, P.J., Robertson, J.B., and Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy. Sci. 74: 3583–3597.
35. Waeonukul, R., Kyu, K.L., Sakka, K., and Ratanakhanokchai, K. 2009. Isolation and characterization of a multienzyme complex (cellulosome) of the *Paenibacillus curdlanolyticus* B-6 grown on Avicel under aerobic conditions. J. Biosci. Bioeng. 107(6): 610-614.
36. Wallace, R.J., and Walker, N.D. 1993. Isolation and attempted introduction of sugar alcohol-utilizing bacteria in the sheep rumen. J. Appl. Bacteriol. 74: 353-359.
37. Whitehead, T.R. 1992. Genetic transformation of the ruminal bacteria *Butyrivibrio fibrisolvens* and *Streptococcus bovis* by electroporation. Lett. Appl. Microbiol. 15(5): 186-189.
38. Yang, W., Meng, F., Peng, J., Han, P., Fang, F., Ma, L., and Cao, B. 2014. Isolation and identification of a cellulolytic bacterium from the Tibetan pig's intestine and investigation of its cellulase production. Electron. J. Biotechnol. 17(6): 262-267.
39. Yoon, J.H., Oh, H.M., Yoon, B.D., Kang, K.H., and Park, Y.H. 2003. *Paenibacillus kribbensis* sp. nov. and *Paenibacillus terrae* sp. nov., bioflocculants for efficient harvesting of algal cells. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53(1): 295-301.
40. Ziemer, C. J., Sharp, R., Stern, M.D., Cotta, M.A., 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. Syst. Appl. Microbiol. 25(3): 416-422.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 7(2), 2019
http://ejrr.gau.ac.ir

Optimization growth of isolated cellulolytic bacteria from gastrointestinal tract of Arabian horse and investigation of the effect of transferring to rumen fluid on wheat straw digestibility

M. Harsini Shakarami[1], *T. Mohammadabadi[2], H. Motamedi[3], M. Sari[2], A. Teimouri Yansari[4]

[1]Ph.D. Student and [2]Associate Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Animal Science and Food Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University of Khuzestan, Mollasani, Ahvaz, Iran, [3]Professor, Dept. of Biology, Faculty of Science, Shahid Chamran University of Ahvaz, Khuzestan, Iran, [4]Associate Prof., Dept. of Animal Sciences, Faculty of Animal Sciences and Fishery, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 07/05/2019; Accepted: 15/07/2019

Abstract

Background and objectives: Lignocellulosic material is important in ruminant rations and because of its cost-effectiveness and effect on optimum rumen performance and its health included in ruminant rations. Although these compounds can be fermentable by many rumen microbes, the presence of proteins, fibers and other edible source nutrients in the feces shows that the rumen ecosystem does not have high efficacy for digestion. That's way, it seems necessary, the manipulation of the rumen to increase of this performance. Therefore, this study was carried out with the aim of the investigation of optimization growth of cellulolytic bacteria isolated from gastrointestinal tract of Arabian horse and the effect of transferring to the rumen fluid on the *in vitro* parameters of gas production and digestibility of wheat straw.

Materials and methods: This research was conducted *in vitro* based on a completely randomized design. The cellulolytic bacteria isolated from the gastrointestinal tract include *Paenibacillus polymyxa L11, Paenibacillus polymyxa L12, Enterobacter cloacae L2, and Escherichia coli Z2*. At first, optimization of temperature and pH for growth and production of the enzymes of these bacteria was carried out at two temperatures of 25°C and 39°C and three pH level of 2.5, 7.5 and 6.2. In the next step, these bacteria were transferred to the rumen fluid and gas production parameters and *in vitro* digestibility of wheat straw were investigated using gas production techniques and two step digestion, respectively. For this purpose, rumen fluid was taken from four sheep. In both methods, rumen fluid was inoculated with bacteria and incubated with wheat straw.

Results: The results showed that *Paenibacillus polymyxa L12* had the best growth at 39°C and pH 5.2 and had the highest enzyme activity at 39°C, pH 5.7 and 24 hours. The optimum temperature and pH for growth of *Paenibacillus polymyxa L11 and Enterobacter cloacae L2* were 39°C and 6.2. These two bacteria exhibited the highest enzymatic activity at 39°C and pH 6.2, at 24 and 48 hours, respectively. *Escherichia coli Z2* showed the highest growth at 39°C and pH 6.2, but the most enzymatic activity of this bacterium was 39°C, pH 5.2 and 48 hours. The isolates reduced the gas production of wheat straw, increased truly degraded organic matter, microbial biomass and microbial biomass efficiency ($P<0.05$). The highest and lowest potential of gas production was allocated to control and *Escherichia coli* Z2 treatments, respectively. The lowest and highest amount of truly degraded organic matter was related to the control and *Paenibacillus polymyxa* L11 treatment, respectively. There was no significant difference

* Corresponding author: mohammadabadi@asnrukh.ac.ir

between partitioning factor, microbial biomass and microbial biomass efficiency of bacterial treatments (P>0.05), but they were more than control. *Paenibacillus polymyxa* L11 has the highest digestibility of dry matter, organic matter, neutral detergent fiber and acid detergent fiber. The control had the least digestibility of dry matter, organic matter and neutral detergent fiber. There was no significant difference for digestibility of acid detergent fiber among *Paenibacillus polymyxa* L12, *Enterobacter cloacae* L2 and *Escherichia coli* Z2 treatments and control (P>0.05).

Conclusion: Generally, temperature and pH had an effect on the growth and production of enzymes of isolates. All isolates grew at a temperature of 39 °C, which is the optimal temperature of the rumen, better than 25°C and had more enzymatic activity at 39°C. These bacteria were able to improve rumen fermentation and *in vitro* digestibility of wheat straw. In the bacterial treatments, the fermentation pathway went towards producing less gas and more microbial protein, and the digestibility of nutrients in these treatments increased.

***Keywords*:** Cellulolytic bacteria, Horse, Fermentation, Digestibility, Wheat straw