بسم الله الرحمن الرحيم

**کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا یا استاد راهنمای پایان‌نامه و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.**


……..……, **Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.**

**.....، گروه .....، دانشکده .....، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.**


مقالات خارجی

مقالات داخلی

دانشکده کشاورزی
گروه آموزشی علوم دامی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته مهندسی کشاورزی – تغذیه دام

عنوان:

# جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیکی از شکمبه گوسفند مهربان

استاد راهنما:
**دکتر داریوش علیپور**

استاد مشاور:
**دکتر عبدالمجید محمدزاده**

نگارش:
**نرگس آشوری همدان**

۸ مهر ۱۳۹۲

تقدیم به

آموزگاران زندگیم

مادرم و همسرم

سپاس بیکران معشوق یگانه را که یاد و نامش مایه آرامش روح و تن است.
دستان پر مهر مادرم را می‌بوسم که سمبل فداکاری و ایثار است. امید دارم که دعای خیر ایشان همواره ره توشه من باشد.
برای پدرم و همه بیماران آرزوی شفای خیر می‌کنم، باشد که در پناه ایزد یکتا سلامت و برقرار باشند.
قدردان همراهی همسر بزرگوارم هستم و صبوری و همدلی‌هایشان را می‌ستایم. از خدای مهربان بهترین‌ها را برایشان طلب می‌کنم.
از خواهر و برادران عزیزم که همواره در کنار من بوده و هستند، سپاسگزارم. موفقیت و سربلندی آن-ها در همه مراحل زندگی آرزوی قلبی من است.
از زحمات و لطف همیشگی استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر داریوش علیپور سپاسگزارم. خوشحالم که پایان نامه‌ام با راهنمایی ایشان به انجام رسید.
از جناب آقای دکتر عبدالمجید محمدزاده به خاطر همکاری صمیمانه و مشاوره ارزنده‌شان تشکر و قدردانی می‌کنم.
از محبت‌ها و لطف بی‌پایان جناب آقای دکتر حسن علی‌عربی بی‌نهایت ممنونم و از این‌که زحمت داوری پایان نامه‌ام را پذیرفتند از ایشان سپاسگزاری می‌کنم.
از جناب آقای دکتر مصطفی ملکی ممنونم که زحمت مطالعه و داوری پایان نامه‌ام را تقبل کردند.
از همکاری مدیریت محترم گروه علوم دامی، جناب آقای دکتر علی اصغر ساکی ممنونم و از همه استادان گروه تشکر می‌کنم.
همکاری صمیمانه پرسنل آزمایشگاه تحقیقات میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان، جناب آقای فضلی و همکاران محترمشان شایسته هزاران بار تقدیر است. آرزو می‌کنم که در همه لحظات شاد و موفق باشند.
از دوست و همکار خوبم سرکار خانم مهندس برائتی به‌خاطر همکاری بی‌دریغشان سپاسگزارم و امیدوارم که همه لحظات زندگیشان مملو از شادی باشد.
از کارشناسان محترم گروه علوم دامی جناب آقای مهندس حسینی سیر و جناب آقای مهندس صفری تشکر و قدردانی می‌کنم.
از همکاران و دوستان خوبم که در همه مراحل همراه من بودند ممنونم. آرزو می‌کنم که در لحظه لحظه زندگی سربلند و موفق باشند.
از همه دانشجویان کارشناسی ارشد علوم دامی ورودی ۱۳۸۹ تشکر می‌کنم. خوشحالم که این دوره در کنار آن‌ها سپری شد. برای همه آنان موفقیت روزافزون آرزو دارم.
فرصت را مغتنم می‌دانم تا از دو استاد گرانقدری که شاگردی در محضرشان همواره مایه مباهات من بوده و هست سپاسگزاری کنم، جناب آقای دکتر سید محمد مهدی طباطبایی و جناب آقای مهندس محمد تقی اخضر. از درگاه خدای مهربان طول عمر با عزت و شادکامی برایشان طلب می‌کنم.

**مقدمه** ..... ۱

**بررسی منابع**

۱-۱ آناتومی و فیزیولوژی طبیعی شکمبه ..... ۴

۱-۲ محدودیت‌های طبیعی شکمبه ..... ۵

۱-۲-۱ دما ..... ۶

۱-۲-۲ pH ..... ۶

۱-۲- ۳ ظرفیت بافری شکمبه ..... ۶

۱-۲-٤ فشار اسمزی ..... ۷

۱-۳ میکروارگانیسم‌های شکمبه ..... ۸

۱-۳-۱ پروتوزوآها ..... ۹

۱-۳-۲ قارچ‌ها ..... ۱۰

۱-۳-۳ آرکیاها ..... ۱۱

۱-۳-٤ باکتریوفاژها ..... ۱۱

۱-۳-۵ باکتری‌ها ..... ۱۲

۱-۴ گونه‌های مختلف باکتری‌های شکمبه ..... ۱۲

۱-٤-۱ گونه‌های تجزیه کننده سلولز ..... ۱۲

۱-۴-۱-۱ فیبروباکتر سوکسینوژنز ..... ۱۳

۱-٤-۱-۲ کوکسی‌های تجزیه کننده سلولز ..... ۱۳

۱-٤-۲ باکتری‌های تخمیر کننده همی‌سلولز ..... ۱۴

۱-٤-۲-۱ بوتیری‌ویبریو فیبروسولونس ..... ۱۴

۱-٤-۲-۲ پرووتلا رومینیکولا ..... ۱۴

۱-٤-۳ باکتری‌های تخمیر کننده پکتین ..... ۱۵

۱-٤-۳-۱ لاچنوسپیرا مولتیپاروس ..... ۱۵

۱-٤-٤ باکتری‌های تجزیه کننده نشاسته (آمیلولایتیک) ..... ۱۵

۱-٤-٤-۱ استروپتوکوکوس بویس ..... ۱۶

۱-۴-۴-۲ سلنوموناس رومینتیوم ..... ۱۶

۱-۵ باکتری‌های مصرف کننده لاکتات ..... ۱۷

۱-۵-۱ ویلونلا آلکانسیس ..... ۱۷

۱-۵-۲ مگاسفرا السدنی ..... ۱۷

۱-٦ اسیدوز لاکتیکی شکمبه ..... ۱۹

۱-۷ دست‌کاری تخمیر شکمبه ..... ۲۱

۱-۷-۱ اسیدهای آلی ..... ۲۲

۱-۷-۲ ویرجینامایسین (VM) ..... ۲۲

۱-۷-۳ یونوفرها ..... ۲۳

۱-۷-۳-۱ مونسین ..... ۲۴
۱-۷-٤ روغن‌های اسانسی ..... ۲۵
۱-۷-۵ پروبیوتیک‌ها یا DFM ..... ۲۵
۱-۸ شناسایی جدایه‌های باکتریایی ..... ۲۸
۱-۸-۱ شناسایی بیوشیمیایی ..... ۲۸
۱-۸-۱-۱ مصرف سوبسترای کربن ..... ۲۸
۱-۸-۱-۲ تست ایندول ..... ۲۸
۱-۸-۱-۳ تست کاتالاز ..... ۲۹
۱-۹ شناسایی مولکولی ..... ۲۹
۱-۹-۱ واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) ..... ۲۹
۱-۹ -۲ تکنیک RFLP ..... ۳۰
اهداف تحقیق ..... ۳۰

**مواد و روش‌ها**

۲-۱ زمان و محل اجرای تحقیق ..... ۳۳
۲-۲ جداسازی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک ..... ۳۳
۲-۳ بی‌هوازی کردن جار ..... ۳۳
۲-٤ تهیه محیط کشت مایع ..... ۳۵
۲-۵ تهیه محلول احیاء ..... ۳۵
۲-٦ تهیه محیط کشت BM10 ..... ۳۶
۲-٦-۱ تهیه محلول MS1 ..... ۳۶
۲-٦-۲ تهیه محلول MS2 ..... ۳۶
۲-٦-۳ تهیه محلول همین کلراید (۰/۰۵٪) ..... ۳۶
۲-٦-٤ تهیه محلول رزازورین ۰/۱ درصد ..... ۳۷
۲-٦-۵ تهیه محلول VFA ..... ۳۷
۲-٦-٦ تهیه محلول کربنات سدیم ۸ درصد ..... ۳۷
۲-٦-۷ تهیه محلول ADS ..... ۳۸
۲-۷ رنگ آمیزی گرم ..... ۳۹
۲-۷-۱ روش رنگ آمیزی گرم ..... ۳۹
۲-۷-۲ تهیه محلول‌های رنگ آمیزی گرم ..... ۴۰
۲-۸ تهیه محلول گلیسرول ..... ۴۰
۲-۹ جداسازی باکتری‌های مصرف کننده اسید لاکتیک ..... ۴۱
۲-۹-۱ تهیه محیط کشت LH ..... ۴۱
۲-۱۰ آزمایش‌های بیوشیمیایی ..... ۴۲
۲-۱۰-۱ آزمایش مصرف سوبسترای کربن ..... ۴۲

۲-۱۰-۲ تست کاتالاز ۴۲
۲-۱۰-۳ تست ایندول ۴۲
۲-۱۰-۳-۱ تهیه معرف کوواکس ۴۳
۲-۱۱ آزمایش‌های مولکولی ۴۳
۲-۱۱-۱ استخراج DNA ۴۳
۲-۱۱-۱-۱ تهیه سود ۵۰ میلی‌مولار ۴۴
۲-۱۱-۱-۲ تهیه محلول تریس ۲۰ میلی‌مولار ۴۴
۲-۱۱-۲ الکتروفورز ۴۴
۲-۱۱-۲-۱ تهیه ژل آگارز ۴۴
۲-۱۱-۳ واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) ۴۵
۲-۱۱-۳-۱ تهیه محلول PCR برای یک نمونه ۴۶
۲-۱۱-۳-۲ برنامه PCR ۴۶
۲-۱۱-٤ تکنیک RFLP ۴۷
۲-۱۱-۴-۱ استفاده از آنزیم AluI ۴۷
۲-۱۱-٤-۲ استفاده از آنزیم DdeI ۴۸
۲-۱۱-۵ تعیین توالی و آنالیز فیلوژنی جدایه‌ها ۴۹
**نتایج و بحث**
۳-۱ شناسایی جدایه‌های مرحله اول (باکتری‌های تولید کننده لاکتات) ۵۱
۳-۲ شناسایی جدایه‌های مرحله دوم (باکتری‌های مصرف کننده لاکتات) ۵۵
۳-۳ بحث ۵۸
نتیجه گیری کلی ۶۶
پیشنهادات ۶۷
**فهرست منابع** ۶۸

جدول ۳-۱- مصرف سوبسترای کربن چند جدایه خالص شده باکتری تولید کننده لاکتات ..... ۵۵
جدول ۳-۲- نتایج مصرف سوبسترای کربن چند جدایه باکتری مصرف کننده لاکتات ..... ۵۷

شکل ۱-۱- تبدیل لاکتات به پروپیونات از مسیر اکریلات ..... ۱۸
شکل ۱-۲- روند توسعه اسیدوز ..... ۲۱
شکل ۲-۱- آماده سازی جار بی‌هوازی ..... ۳٤
شکل ۲-۲- کلنی‌های رشد یافته روی محیط کشت MRS Agar درون پتری دیش ..... ۳٤
شکل ۲-۳- تهیه محیط کشت BM10: الف) شروع مرحله بی هوازی کردن محیط کشت ب) محیط کشت آماده پس از بی هوازی شدن ..... ۳۷
شکل ۲-٤- تهیه محلول گلیسرول الف) محلول گلیسرول در شروع بی‌هوازی شدن ب) محلول گلیسرول آماده پس از بی‌هوازی شدن ..... ٤۰
شکل ۲-۵- میکروسانتریفیوژ استفاده شده در آزمایش ..... ٤۳
شکل ۳-۵- تصویر DNA استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ ..... ٤٤
شکل ۲-٦- دستگاه ترموسایکلر ..... ٤۵
شکل ۲-۷- هیتر مخصوص میکروتیوب ..... ٤۸
شکل ۳-۱- باکتری‌های خالص شده (با بزرگنمایی ۱۰۰) ..... ۵۱
شکل ۳-۲- (الف) محصول PCR روی ژل ۱/۵٪ و (ب): محصول RFLP ..... ۵۱
شکل ۳-۳ - درخت فیلوژنی جدایه‌های خالص شده انتروکوکوس و لاکتوباسیل ..... ۵۳
شکل ۳-٤- آزمایش ایندول جدایه‌های انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس ..... ۵٤
شکل ۳-۵- آزمایش مصرف سوبسترای کربن جدایه‌های انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس ..... ۵٤
شکل ۳-٦- درخت فیلوژنی جدایه های خالص شده مگاسفرا السدنی ..... ۵٦
شکل ۳-۷- آزمایش سوبسترای کربن جدایه‌های مگاسفرا السدنی ..... ۵۷
شکل ۳-۸- آزمایش ایندول جدایه‌های مگاسفرا السدنی ..... ۵۸

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

**عنوان:**

**جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیکی از شکمبه گوسفند مهربان**


**نام نویسنده: نرگس آشوری همدان**

**نام استاد راهنما: دکتر داریوش علیپور**

**نام استاد مشاور: دکتر عبدالمجید محمدزاده**


| | | |
|---|---|---|
| **دانشکده: کشاورزی** | **گروه آموزشی: علوم دامی** | |
| **رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی** | **گرایش: تغذیه نشخوارکنندگان** | **مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد** |
| **تاریخ تصویب پروپزال: ۱۳۹۰/۱۱/۳۰** | **تاریخ دفاع: ۱۳۹۲/۷/۸** | **تعداد صفحات: ۷۹** |


**چکیده:**

**اختلالات متابولیکی نظیر اسیدوز شکمبه، یکی از مشکلات عمده‌ی صنعت دام‌پروری است که راه‌کارهای متعددی برای پیش‌گیری و کنترل این اختلال استفاده می‌شود. یکی از جدیدترین روش‌ها، دستکاری تخمیر شکمبه با استفاده از میکروب‌های زنده است. هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده لاکتات است که می‌توانند به‌عنوان پروبیوتیک، برای تعدیل فعالیت میکروبی شکمبه استفاده شوند.**

**به این منظور دو آزمایش طراحی شد. آزمایش اول، به منظور جداسازی باکتری‌های تولید کننده لاکتات به‌ترتیب زیر انجام شد. ابتدا گوسفندان نر فیستوله شده مهربان به جیره ۷۰٪ کنسانتره سازگار شدند. پس از دو هفته شیرابه شکمبه آن‌ها روی محیط کشت MRS Agar کشت داده شد و پس از ۴۸ ساعت انکوباسیون در دمای $39^{\circ}C$، کلنی‌های منفرد تولید شده در شرایط بی‌هوازی، به محیط کشت مایع MRS Broth دارای L-سیستئین، منتقل شدند. در مرحله بعد ۰/۲ میلی‌لیتر از محیط کشت رقیق شده با محلول ADS (رقت های $10^{-8}$، $10^{-9}$ و $10^{-10}$) به لوله هانگیت دارای ۰/۴۵ میلی‌گرم آگار و ۲/۸ میلی‌لیتر محیط کشت مایع تلقیح و روی یخ رل تیوب شد. دو روز بعد، کلنی‌های منفرد و مشخص برداشته شده و به لوله‌های دارای محیط کشت پایه (BM) برای آزمایشات بیش‌تر منتقل شدند. در آزمایش دوم باکتری‌های مصرف کننده لاکتات جداسازی شد. شیرابه شکمبه گوسفندان فیستوله مهربان، روی محیط کشت LH دارای L-سیستئن، درون پتری‌دیش کشت داده شد. پس از ۷-۳ روز کلنی‌های منفرد به لوله هانگیت حاوی ۰/۴۵ میلی‌گرم آگار و ۲/۸ میلی‌لیتر محیط کشت LH دارای L-سیستئین، منتقل و روی یخ رل تیوب شدند. خلوص و خصوصیات مورفولوژی باکتری‌ها با روش رنگ‌آمیزی گرم بررسی شد. برای تشخیص باکتری های جداشده تست‌های بیوشیمیایی انجام شد و DNA به روش جوشاندن و سرد کردن استخراج گردید. DNA استخراج شده با تکنیک PCR تکثیر شدند. تکنیک RFLP برای امتحان یکنواختی ژنتیکی جدایه‌ها با هضم DNA استخراج آنها با آنزیم‌های برش دهنده DdeI و AluI هضم شدند. توالی محصول PCR حاوی ژن 16s rRNA توسط شرکت Bioneer کره جنوبی تعیین شد. توالی نوکلئوتیدها توسط نرم افزار تحت وب BLAST برای تشخیص نزدیکترین جدایه خویشاوند در پایگاه داده‌های بانک ژن آنالیز شد. درخت فیلوژنی برای توالی‌های به دست آمده توسط نرم افزار MEGA 5.2 رسم گردید.**

**نتایج آزمایش اول نشان داد که باکتری‌های خالص شده از جنس کوکسی و باسیل گرم مثبت بودند. نزدیکترین خویشاوند (۹۹٪) جدایه-های کوکسی *Entrococcus casseliflavus* EC20 با شماره بانک ژن NR 102793.1 و نزدیکترین خویشاوند جدایه باسیل *Lactobacillus mucosae* CCUG43179 با شماره بانک ژن NR 102793.1 بودند. این باکتری‌ها فعالیت کاتالازی نداشتند و توانایی تولید ایندول را ندارند. جدایه‌های انتروکوکوس تمامی قندها را تخمیر کرداند. جدایه‌های لاکتوباسیل را به صورت کامل تخمیر کردند؛ در حالی که گلوکز و مالتوز تاحدی و لاکتوز را به صورت ضعیف تخمیر کردند. در طی تخمیر گاز تولید نشد. نتایج آزمایش دوم نشان داد که این باکتری‌ها کوکسی‌های گرم منفی بودند که ۹۹٪ با جدایه *Megasphaera elsdenii* DSM 20460 با شماره بانک ژن NC 015873.1 مشابه بودند. این جدایه‌ها فعالیت کاتالازی داشتند اما ایندول تولید نکردند. این باکتری‌ها گلوکز و ساکارز را به خوبی و**

مالتوز را تا حدی مصرف کردند که با تولید گاز همراه بوده است. اما لاکتوز را تخمیر نکردند.

با توجه به این‌که جدایه‌هایی از لاکتوباسیل‌ها و حتی انتروکوکوس‌ها در تک‌معده‌ای‌هایی مثل خوک و طیور و نیز انسان به عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند، توصیه می‌شود که جدایه‌های اختصاصی برای تغذیه نشخوارکنندگان استفاده شوند. مگاسفرا السدنی مهم‌ترین باکتری مصرف کننده لاکتات در شکمبه است. تحقیقات نشان داده است که استفاده از این میکروارگانیسم به‌ویژه همراه با مخمرهایی نظیر ساکارومایسس سرویزیه، اثرات بسیار مفیدی بر تعادل میکروفلور شکمبه و فعالیت تخمیری آن دارد. جدایه جداسازی شده این میکروارگانیسم از شکمبه گوسفند مهربان با توجه به تفاوت آن با جدایه های موجود در بانک ژن می‌تواند آغازی برای تحقیق بیش‌تر در زمینه تولید پروبیوتیک حیوانی در ایران باشد.

واژه‌های کلیدی: میکروارگانیسم، VFA، اسیدوز، پروبیوتیک، *مگاسفرا السدنی*.

# مقدمه

**مقدمه:**

نشخوارکنندگان و انسان‌ها تاریخ‌چه مشترکی دارند. شکارچیان ماقبل تاریخ و اغلب چادرنشین، دریافتند که می‌توانند از توان بالقوه گیاهان فتوسنتز کننده چمن‌زارها، توسط نشخوارکنندگان بهره ببرند. در نتیجه، افزایش غذای فراهم شده به آن‌ها اجازه داد که به شکل جامعه گروهی درآیند. بیشترگوشت و به‌طور کلی تمام شیر مورد نیاز، هنوز توسط حیوانات اهلی تولید می‌شود اما انسان‌ها نوع خوراک مصرفی این حیوانات را تغییر می‌دهند (کامرا[1]، ۲۰۰۵).

عملکرد اصلی تولیدات دامی، تامین پروتئین، انرژی، مواد معدنی و ویتامین‌ها برای تکمیل غلات و حبوبات در جیره غذایی انسان است. فرآورده‌های دامی نقش اساسی در تنوع بخشیدن به جیره غذایی انسان دارند. حیوانات نشخوارکننده می‌توانند بخش اعظم انرژی و پروتئین مورد نیاز خود را از غذاهای غیرقابل استفاده برای انسان از قبیل علوفه‌ها، غلات نامرغوب، مراتع، اوره و دیگر منابع پروتئینی به‌دست آورند. در واقع حیوانات نشخوارکننده مبدل‌های بسیار مطلوبی برای تبدیل پروتئین‌های گیاهی به پروتئین‌های حیوانی هستند (قربانی و خسروی نیا، ۱۳۷۹).

موفقیت نشخوارکنندگان را می‌توان تا حد زیادی به دلیل توانایی آن‌ها در هضم فیبر مواد گیاهی فیبری دانست (هابسون و استوارت[2]، ۱۹۹۷). نشخوارکنندگان نمی‌توانند آنزیم‌های هضم کننده فیبر را تولید کنند، اما شکمبه آن‌ها زیستگاه میکروارگانیسم‌هایی است که قادر به تولید این آنزیم‌ها هستند. میزبان، زیستگاه مناسب برای رشد میکروارگانیسم‌ها را فراهم می‌کند و میکروب‌ها نیز پروتئین، ویتامین‌ها و اسیدهای کوتاه زنجیر را برای حیوان تامین می‌کنند (کامرا، ۲۰۰۵).

میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش حیوانات نشخوارکننده، تاثیر شگرفی بر تبدیل مواد خوراکی به فرآورده‌های نهایی دارند که تاثیر به‌سزایی بر حیوان و محیط زیست خواهد داشت. باید توجه داشت که در بررسی سیستم تغذیه‌ای نشخوارکنندگان، سیستمی درون سیستم دیگر بررسی می‌شود. نشخوارکنندگان خودشان به انرژی، پروتئین و املاح نیاز دارند، اما این حیوانات دارای احتیاجات ثانویه‌ای هستند که مربوط به میکروب‌هایی است که وظیفه تجزیه اجزای ساختمانی گیاهان را بر عهده دارند و حداکثر پروتئین قابل جذب در روده باریک حیوان را تولید می‌کنند (دانش مسگران و همکاران، ۱۳۸۳).

شکمبه اکوسیستمی است که در آن جمعیت میکروبی با حیوان نشخوار کننده (میزبان) رابطه هم‌زیستی دارند و در هضم جیره مصرفی به حیوان کمک می‌کنند. خوراک مصرفی، سوبسترای دائمی برای جمعیت میکروبی را فراهم می‌کند و در عین حال محیط بی‌هوازی با pH و دمای

[1] Kamra
[2] Hobson and Stewart

ثابت، فضای لازم و تحرک مورد نیاز برای تخمیر میکروبی را در اختیار آن‌ها قرار می‌دهد. فرآورده‌های نهایی تخمیر میکروبی از قبیل اسیدهای چرب فرار (VFAs) ( استات، پروپیونات و بوتیرات) و نیز پروتئین میکروبی توسط حیوان میزبان مصرف می‌شود (استین[1]، ۲۰۰۴).

زمانی که میکروارگانیسم‌ها بتوانند نیاز خود را برطرف نمایند، شکمبه فعالیت بهینه خود را به‌دست آورده است و بهترین وضعیت استفاده از مواد خوراکی، به‌خصوص تجزیه دیواره سلولی علوفه‌ها به‌وجود می‌آید. فعالیت شکمبه زمانی بازدهی بهینه و پایدار خواهد داشت که جیره‌های غذایی بتوانند نیاز میکروب‌های شکمبه و خود حیوان را برآورده سازند (دانش مسگران و همکاران، ۱۳۸۳). در چنین وضعیتی، با عملکرد بهینه حیوان، عوارض تغذیه‌ای نیز به حداقل خواهد رسید. در حیواناتی مثل گاوهای شیری، حداکثر مصرف خوراک باید زمانی به‌وجود آید که شکمبه دارای فعالیت بهینه بوده و تجزیه مواد گیاهی در آن به حداکثر مقدار خود برسد (دانش مسگران و همکاران، ۱۳۸۳).

امروزه به‌دلیل تنوع بیش‌تر مواد خوراکی قابل دسترس و مسائل محیطی، نیاز به آگاهی از چگونگی تغذیه شکمبه وجود دارد. یکی از چالش‌های تحقیق در زمینه تغذیه نشخوارکنندگان، ادغام شدن محدودیت‌های بیولوژیکی با عملیات تغذیه‌ای است که به‌منظور شناخت تغییرات شکمبه، افزایش بازدهی دست‌کاری تخمیر شکمبه و حداکثر تولید حیوان نشخوارکننده انجام می‌شود (کریستوفر[2]، ۲۰۱۲).

[1] Stein
[2] Kristopher

# فصل اول:

# بررسی منابع

## ۱- بررسی منابع:

### ۱-۱ آناتومی و فیزیولوژی طبیعی شکمبه:

کل مجموعه معده در نشخوارکنندگان بالغ، تقریباً ۷۵٪ حفره شکمی آن‌ها را اشغال می‌کند (طباطبایی، ۱۳۸۲). حجم شکمبه به تنهایی حدود ۱۳-۹٪ وزن بدن را تشکیل می‌دهد. حجم آن در گاوها و گوسفند سازگار شده به تغذیه با کاه، به ۳۰-۲۰٪ هم می‌رسد. حجم بزرگ شکمبه اجازه می‌دهد که مقدار زیادی علوفه مصرف شود و امکان ماندگاری زیاد و تخمیر فیبر در شکمبه-نگاری فراهم شود (فولر[1]، ۲۰۰۴). وجود پیش معده وسیع (شکمبه-نگاری) در حیوانات نشخوارکننده سبب می‌شود که جمعیت بزرگ و متنوعی از میکروب‌ها برای تبدیل مواد خوراکی اولیه به محصولات تخمیر و توده سلول میکروبی به‌وجود آید (پین‌لوک[2] و همکاران، ۲۰۱۳). محیط بی‌هوازی، دما و pH ثابت سبب شده است تا میلیاردها کمپلکس میکروبی در این محفظه بزرگ تخمیر وجود داشته باشند (جووانی و مورقاوی[3]، ۲۰۰۷).

شکمبه زیست‌گاه مجموعه عظیمی از میکروب‌ها اعم از باکتری‌ها[4]، آرکیاها[5]، قارچ‌ها[6] و پروتوزوآهای[7] مژک‌دار است که برای تخمیر ترکیبات گیاهی خورده شده توسط حیوان نشخوار کننده، با یکدیگر فعالیت می‌کنند (کیتل‌مان و جانسن[8]، ۲۰۱۱). نشخوارکنندگان بعضاً برای تغذیه، تغذیه، با چالش‌های متعددی مواجه هستند زیرا هضم مواد گیاهی سخت است، چربی و پروتئین نسبتاً کمی دارند و عمده مواد مغذی آن‌ها درون بخش دیواره سلولی محکم جای گرفته است. بسیاری از میکروب‌ها، آنزیم‌های تجزیه کننده سلولز را می‌سازند که آن‌ها را قادر به تجزیه سلولز جیره غذایی مصرف شده و سایر ترکیبات دیواره سلولی گیاه می‌کند (دشاک[9]، ۲۰۱۲).

در این میان جمعیت باکتری‌های شکمبه مورد توجه‌اند. زیرا این گروه، میکروارگانیسم‌های بسیار متنوعی هستند و بیش از نیمی از توده میکروبی شکمبه ($10^{10}$ تا $10^{11}$ سلول در هر میلی‌لیتر) را تشکیل می‌دهند (دشاک، ۲۰۱۳). باکتری‌ها، قارچ‌ها و برخی سویه‌های مژک‌دار، اولین میکروب‌هایی هستند که به ترکیبات گیاهی حمله می‌کنند، پلی‌مرها را تجزیه و به مونومرها و الیگومرها تخمیر و اسیدهای چرب فرار را تولید می‌کنندو اسیدهای چرب فرار به‌عنوان منابع عمده انرژی و کربن توسط نشخوار کنندگان مصرف می‌شوند (کیتل‌مان و جانسن، ۲۰۱۱). باکتری‌های

---

[1] Fuller
[2] Pinloche
[3] Jouany and Morgavi
[4] Bacteria
[5] Archea
[6] Fungi
[7] Protozoa
[8] Kittelmann and Janssen
[9] Dschaak

شکمبه به دو گروه عمده تقسیم می‌شوند: آن‌هایی که تجزیه کننده فیبر هستند (سلولایتیک‌ها) و آن‌هایی که منابع کربوهیدرات‌های غیر فیبری (در ابتدا قندها و نشاسته) را مصرف می‌کنند. تخمیر میکروبی، فرآیند کندی است و نیاز به زمان و فضای مناسب دارد (دشاک، ۲۰۱۲).

چندین فرآیند در تخمیر شکمبه دخیل هستند:

کاهش اندازه ذرات خوراک، تجزیه سوبسترا، مصرف سوبسترا توسط میکروارگانیسم‌ها، سنتز توده میکروبی، تشکیل VFA، آمونیاک ($NH_3$)، متان و دی‌اکسید کربن به‌عنوان فرآورده نهایی تخمیر، بازیافت درون شکمبه‌ای میکروب‌ها (مرگ و تغذیه آن‌ها به‌عنوان شکار)، جذب VFA و آمونیاک و در نهایت جریان خروجی محتویات شکمبه (دشاک، ۲۰۱۲).

وقتی ذرات درشت خوراک نشخوار می‌شوند، سطح تماس این ذرات و سرعت تخمیر افزایش می‌یابد. نشخوار کردن موجب جریان بیش‌تر بزاق می‌شود که pH شکمبه را در حد مطلوب حیوان و میکروب‌ها نگه می‌دارد. با انقباضات ماهیچه‌ای شکمبه، خوراک تازه وارد شده با میکروارگانیسم‌ها مخلوط و بافت پوششی شکمبه (اپی‌تلیوم) با مایعات تخمیری شستشو داده می‌شود. بنابراین اسیدهای آلی کوتاه زنجیر می‌توانند جذب شوند (راسل و ریچلیک[1]، ۲۰۰۱). انقباضات خاص شکمبه، مواد خوراکی را از مری دور نگه می‌دارد تا گازهای تخمیری بتوانند توسط فرآیند آروغ زدن خارج شوند. اگر نشخوارکنندگان با جیره‌های دارای کمبود فیبر تغذیه شوند، حرکات گردشی، آروغ زدن، نشخوار کردن و جریان بزاق کاهش می‌یابد و با تجمع اسیدهای حاصل از تخمیر، pH شکمبه افت می‌کند (راسل و ریچلیک، ۲۰۰۱).

**۱-۲ محدودیت‌های طبیعی شکمبه:**

اکوسیستم میکروبی شکمبه پایدار، پویا و فعال است. در نشخوارکنندگان سالم، با وجود میلیون‌ها میکروبی که هر روزه با مواد خوراکی، آب آشامیدنی و هوا به شکمبه هجوم می‌آورند، آلودگی اکوسیستم رخ نمی‌دهد. در این اکوسیستم پویا، با تغییر جیره و سازگاری با ترکیبات جیره جدید، تغییرات قابل توجهی در جمعیت میکروبی رخ می‌دهد. میکروب‌های شکمبه برای زنده ماندن، با محدودیت‌های موجود در شکمبه سازگار می‌شوند (کامرا، ۲۰۰۵). از محدودیت‌های مهم محیطی می‌توان به مواردی از قبیل بی‌هوازی بودن، ظرفیت بافرینگ بالا و فشار اسمزی اشاره کرد. شرایط بی‌هوازی شکمبه با گازهای تولید شده در تخمیر مثل دی‌اکسید کربن، متان و مقادیر کمی هیدروژن حفظ می‌شود (کامرا، ۲۰۰۵).

[1] Russel and Rychlik

**۱-۲-۱ دما:**

به‌طور کلی دمای شکمبه نسبتاً ثابت و در حدود ٤٠-٣٨ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. تثبیت این دمای نسبتاً بالا، به‌دلیل تخمیر سریعی است که در شکمبه رخ می‌دهد. بلافاصله پس از خوردن خوراک که تخمیر فعال‌تر است، ممکن است دما به ٤١ درجه هم برسد. زمانی‌که مقدار زیادی آب سرد مصرف شود، ممکن است تغییرات زیادی در دمای شکمبه دیده شود. حدود یک تا دو ساعت زمان لازم است تا دما دوباره به حالت عادی برگردد (علیپور، ۱۳۸۹).

**۱-۲-۲ pH:**

pH شکمبه در حقیقت بازتابی از مقدار اسید تولید شده در شکمبه توسط جمعیت میکروبی است و یکی از متغیرترین فاکتورهای محیط شکمبه به شمار می‌آید. pH محیط شکمبه با مکانیسم‌های مختلف و با اثر متقابل اسیدها و بافرها ایجاد می‌شود. در دامنه بالاتر pH، ترکیبات بافری مهم عبارتند از: یون بیکربنات و بافر فسفات که با مقدار زیاد از طریق جریان بزاق تولید می‌شوند (حسین[1] و همکاران، ۲۰۱۱). احتمالاً pH محتویات شکمبه مهم‌ترین فاکتور شکمبه‌ای موثر بر جمعیت میکروبی و فعالیت آن‌هاست. فرآورده‌های تخمیر شکمبه خصوصاً استات، پروپیونات، لاکتات و متان به‌شدت تحت تاثیر pH شکمبه هستند. بنابراین pH به‌طور غیر مستقیم بر میکروب‌ها اثر دارد (لانا[2] و همکاران، ۱۹۹۸). pH شکمبه در طی روز نوسان داشته و تاثیر مهمی بر تخمیر و هضم شکمبه دارد.

میکروارگانیسم‌های مختلف شکمبه در سطوح مختلف pH فعالیت دارند. برای مثال رشد باکتری‌های هضم کننده فیبر در pH بین ٦ تا ٦/٩ و رشد باکتری‌های هضم کننده نشاسته زمانی‌که pH ٥/٥ تا ٦ است، قابل توجه خواهد بود (هاتجنس[3]، ۲۰۰۲ ). نوع جیره (علوفه یا کنسانتره)، شکل فیزیکی خوراک (آسیاب شده، پلت یا قطعه قطعه شده)، سطح خوراک مصرفی، میزان رطوبت خوراک و روش خوراک‌دهی بر pH شکمبه اثرگذار هستند (هاگ[4]، ۲۰۰۷). دی‌وت و کولور[5] (۲۰۰۱) نشان دادند که اگر مقدار pH در یک دوره ٤ ساعته ٥/٤ باشد، کاهش قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و NDF مشهود است.

**۱-۲-۳ ظرفیت بافری شکمبه:**

ظرفیت بافرینگ به صورت تعداد مول $H^+$ در هر لیتر از سیستم آزمایش تعریف می‌شود که

---

[1] Hussain
[2] Lana
[3] Hutjens
[4] Hagg
[5] De Veth and Kolver

برای تغییر مشخص pH لازم است (کوانوت[1] و همکاران، ۱۹۷۹). ظرفیت بافرینگ سبب می‌شود تا pH شکمبه در اغلب شرایط در دامنه ۷-٦ حفظ شود. وقتی مقدار زیادی از کربوهیدرات‌های قابل تخمیر مصرف شود، به دلیل تخمیر سریع، pH از دامنه ٦ تا ۷ به ۵/۵ و حتی کمتر از آن می‌رسد. میزان کاهش pH پس از افزایش نرخ تخمیر به ظرفیت بافرینگ شکمبه بستگی دارد (کوانوت و همکاران، ۱۹۷۹). ظرفیت بافری محتویات شکمبه نسبتاً زیاد است که به تثبیت pH در دامنه مناسب برای رشد میکروب‌ها کمک می‌کند.

عواملی نظیر مقدار و ترکیب بزاق، غلظت محصولات نهایی اسیدی به‌ویژه اسیدهای چرب فرار و $CO_2$، بر ظرفیت بافری شکمبه اثر دارند. بزاق نشخوارکنندگان دارای مقدار زیادی بی‌کربنات و فسفات است و pH آن حدود ۸ یا بالاتر است. این ترکیبات، اسیدهای چرب فرار تولید شده توسط میکروفلور شکمبه را خنثی می‌کنند (علیپور، ۱۳۸۹). کووانوت و همکاران (۱۹۷۹) دریافتند که مهم‌ترین اجزاء سیستم بافری، بی‌کربنات و اسیدهای چرب فرار هستند و فسفات ارزش کم‌تری به‌عنوان سیستم بافری دارد. ظرفیت بافرینگ بالا و فشار اسمزی، رشد تهاجمی میکروب‌ها را بسیار محدود می‌کند. چرا که برخی از میکروب‌های شکمبه با تولید ترکیبات ضد‌میکروبی، از رشد دیگر میکروب‌ها ممانعت می‌کنند (کامرا، ۲۰۰۵).

**۱-۲-٤ فشار اسمزی:**

وارنر و استیسی[2] (۱۹٦۵) طی آزمایشی دریافتند که قبل از خوراک‌دهی، مایع شکمبه نسبت به پلاسما، هیپوتونیک (رقیق‌تر) است، همچنین اسمولالیته مایع شکمبه حدود ۲۵۰ میلی اسمول در کیلوگرم و مقدار آن در پلاسما حدود ۳۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم بود. بلافاصله پس از خوراک‌دهی، اسمولالیته مایع شکمبه به حدود ٤۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم رسید و سپس به‌تدریج کاهش یافت تا حدی که در مدت ۱۰-۸ ساعت، نسبت به پلاسما هیپوتونیک شد (علیپور، ۱۳۸۹). غلظت یون پتاسیم عامل مهمی در افزایش اسمولالیته محتویات شکمبه پس از تغذیه است. برگن[3] (۱۹۷۲) دریافت که وقتی اسمولالیته محتویات شکمبه به‌طور مصنوعی (با استفاده از نمک طعام یا استات سدیم) بیش از ٤۰۰ میلی اسمول در کیلوگرم می‌شود، مصرف خوراک در گوسفند به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد.

[1] Counotte
[2] Warner and Stacy
[3] Bergen