

## اثر رنگ کریستال ویولت بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط *in vitro*

• محسن کاظمی (نویسنده مسئول)

استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

• الیاس ابراهیمی خرم‌آبادی

استادیار گروه علوم دامی مجتمع آموزش عالی تربت‌جام

• آمنه اسکندری تریقان

مربی گروه مهندسی بهداشت محیط دانشکده علوم پزشکی تربت‌جام

• رضا ولی‌زاده

استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۹-۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷-۰۴-۱۲

Email: phd1388@gmail.com



### چکیده

کریستال ویولت از جمله آلاینده‌های آبی محسوب می‌شود، بنابراین پژوهشی با هدف بررسی اثر افزودن رنگ کریستال ویولت (صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خرپزه (صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم به‌عنوان جاذب) به محیط کشت تهیه شده از مایع شکمبه گوسفند در قالب طرح فاکتوریل ۳×۲×۴ انجام شد. کارایی هر یک از جاذب‌های فوق (صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) در حذف کریستال ویولت اضافه شده به آب (صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) در زمان‌های ۳ و ۲۴ ساعت انکوباسیون، نیز ارزیابی شد. هر دو جاذب فوق (به‌ویژه بنتونیت سدیم) منجر به حذف کارآمد رنگ از آب شدند. افزودن رنگ تا سطح ۶ پی‌پی‌ام به محیط کشت، باعث کاهش معنی‌دار تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون، پتانسیل تولید گاز، میزان کل اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و نیز کلیه پارامترهای تخمیری برآورده شده از تولید گاز شامل تولید پروتئین میکروبی، قابلیت هضم ماده آلی، انرژی خالص شیردهی و انرژی قابل متابولیسم در مقایسه با تیمار شاهد شد ( $P < 0/0001$ ). مقدار pH محیط کشت تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. با افزودن هر یک از جاذب‌ها (به‌ویژه سطح ۴ درصد)، کلیه پارامترهای تولید گاز و فراسنجه‌های برآورد شده از تولید گاز، کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0/0001$ ). نتایج کلی نشان داد کاربرد کریستال ویولت حتی در سطوح پایین، اثر منفی بر فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌های محیط کشت دارد. اگرچه که هر دو جاذب منجر به حذف کارآمد رنگ از آب شدند، ولی نتوانستند از اثرات منفی آن بر محیط کشت بکاهند.

کلمات کلیدی: کریستال ویولت، رنگ، آلوده‌کننده آب، محیط کشت، جاذب

- Veterinary Researches & Biological Products No 121 pp: 43-56

#### Effect of crystal violet dye on rumen fermentation *in vitro*

By: Kazemi, M., (Corresponding Author) Assistant professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran. Ibrahimi Khoram Abadi, E., Assistant professor, Department of Animal Science, Higher Education Complex of Torbat-e Jam, Torbat-e Jam, Iran. Eskandary Torbaghan, A., Professional engineering, Department of Environmental Health Engineering, Torbat-e Jam Faculty of Medical Sciences. and Valizadeh, R., Professor, Department of Animal science, College of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 2017-12-16 Accepted: 2018-07-03

Emali: phd1388@gmail.com

Crystal Violet is considered as a source of water pollution, therefore, An experiment was carried out to determine the effect of adding crystal violet (0, 3, 6, and 9 ppm) with different levels of sodium bentonite or melon peel ash (0, 4, and 8 mg as adsorbent) to a culture medium prepared from rumen fluid of sheep in a 4×2×3 factorial design. The effect of two adsorbents (0, 4, and 8 mg) on the removal of the violet crystal added to water (0, 3, 6, and 9 ppm) at 3 and 24 h incubation was also evaluated. The effective removal of dye was observed for above adsorbents (especially sodium bentonite). The gas production at 12 and 24 h, potential gas production as well as TVFA, NH<sub>3</sub>-N and all the fermentation parameters estimated from gas production including microbial protein yield, organic matter digestibility, net energy for lactation (NEL) and metabolism energy (ME) was decreased compared to control when the dye was added to media at 6 ppm (p<0.0001). The culture medium pH was not affected by the experimental treatments. By adding adsorbents (especially at 4%), most of gas production parameters and estimated parameters from gas production showed a significant decrease (p<0.0001). The overall results showed that the use of crystal violet even at low levels has a negative effect on fermentation activities of microorganisms in the media. Although two adsorbents led to a dye significant decrease in water, however they could not reduce the negative effects of dye in the media.

**Key words:** Crystal Violet, Dye, Water pollutant, Media, Adsorbent

دامپروری هم به‌عنوان یک عامل باکتریواستاتیک بکار برده می‌شود. این رنگ غیرقابل تجزیه بیولوژیکی و پایدار در محیط است و باعث سرطان، افزایش تپش قلبی، سوزش شدید چشم، استفراغ، سیانوزیس، زردی و نکروز بافت در انسان می‌شود. هنوز اطلاعات دقیقی در خصوص اثر این رنگ‌ها بر سلامت دام‌های نشخوارکننده گزارش نشده است، از طرفی اولین سد دفاعی بدن در مواجهه با این نوع رنگ‌ها، شکمبه بوده که به احتمال زیاد اولین موجودات زنده‌ای که متأثر از این رنگ‌ها خواهند شد، نیز میکروارگانیسم‌های مستقر در محیط شکمبه می‌باشند، از طرفی اطلاعات در خصوص تأثیر رنگ کریستال ویولت بر جمعیت میکروبی و پارامترهای تخمیری ناشی از آنها در محیط شکمبه وجود ندارد ولی عنوان شده که رنگ‌زدایی اغلب رنگ‌ها با دو روش جذب توسط توده میکروبی و یا تجزیه رنگ با کمک سلول‌های زنده اتفاق می‌افتد (۳۰). در تجزیه بیولوژیکی (ورود رنگ به ساختمان اصلی توده میکروبی) ساختار اصلی رنگ حفظ شده اما در تجزیه زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها، ساختار اصلی رنگ شکسته شده و در اغلب موارد تولید دی‌اکسید

#### مقدمه

یکی از مهم‌ترین آلوده‌کننده‌های منابع آبی، رنگ‌های ناشی از فاضلاب صنایع مختلف اعم از رنگرزی، نساجی، داروسازی و غیره می‌باشند که در برخی از موارد پساب حاصل از این صنایع با غلظت‌های مختلف به آب‌های رودخانه‌ای ریخته شده و متعاقباً برای انسان و محیط زیست مخاطراتی را ایجاد خواهند نمود. از سال ۱۸۵۶ بالغ بر ۱۰۵ نوع رنگ با ساختار مولکولی متفاوت تولید و به بازار عرضه شده است (۲). رنگ‌ها باعث ممانعت از انتقال کامل نور به داخل آب شده و باعث کاهش عمل فتوسنتز و کاهش اکسیژن محلول در آب می‌شوند. همچنین اکثر رنگ‌های مصرفی در صنایع نساجی، منشأ آلی داشته که می‌توانند سمی و سرطان‌زا باشد (۲). کریستال ویولت به‌عنوان یکی از رنگ‌های سنتتیک کاتیونی متعلق به گروه تری‌فنیل‌متان به‌شمار می‌رود که باعث ایجاد رنگ بنفش در محلول‌های آبی شده و به آسانی وارد غشای سلولی دارای بار منفی می‌شود. در صنایع نساجی، جوهرسازی و همچنین به‌عنوان یک رنگ بیولوژیکی در رنگ‌آمیزی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲). در صنایع

جمع‌آوری شد و بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی انتقال داده شد. پس از تفکیک بخش‌های مختلف میوه خربزه، پوست آن‌ها به‌طور کامل از بخش گوشتی میوه جدا و به قطعات کوچکتر ریز و جهت خشک شدن کامل آن‌ها به آن با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت انتقال داده شد. سپس نمونه‌های پوست خربزه به‌داخل ظرف مخصوص فلزی ریخته و پس از بسته شدن درب ظرف به‌طور کامل، بلافاصله به کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت انتقال داده شد. نمونه‌های خاکستر پس از خروج از کوره و سرد شدن، به‌داخل ظرف مخصوص انتقال داده شد و تا زمان انجام آزمایشات بعدی ذخیره گردید.

### اندازه‌گیری قابلیت حذف رنگ توسط جاذب‌ها و تکنیک تولید گاز

از سه سطح رنگ کریستال ویولت (صفر، ۳ و ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) همراه با دو نوع جاذب (هر کدام در سه سطح صفر، ۲ و ۴ درصد ماده خشک نمونه انکوبه شده در محیط کشت: معادل صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) برای برآورد قابلیت حذف رنگ توسط جاذب‌ها استفاده شد. غلظت‌های مورد نظر از یک محلول مادر (با غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام) تهیه شد. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از محلول‌های رنگی دارای کریستال ویولت با غلظت ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام در داخل لوله‌های آزمایشگاهی مخصوصی که از قبل در آن‌ها بنتونیت سدیم (صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) و یا خاکستر پوست خربزه تهیه شده از پوست خربزه (صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) ریخته شده بود، اضافه و بعد از چند تکان معمولی، بلافاصله به بن‌ماری با درجه حرارت ۳۹ درجه سانتی‌گراد (مشابه آزمون تولید گاز) برای زمان‌های انکوباسیون ۳ و ۲۴ ساعت انتقال داده شد. زمان‌های انکوباسیون فوق در دامنه زمان‌های انکوباسیون برای محیط کشت تهیه شده از مایع شکمبه در نظر گرفته شد. برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. پس از پایان دوره انکوباسیون، لوله‌های آزمایشی از بن‌ماری خارج و با دور ۴۰۰۰ به مدت ده دقیقه سانتریفیوژ شده و در نهایت میزان جذب هر یک از آن‌ها در طول موج ۵۹۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری (۲۰۱۷-Photonix-Ar) قرائت شد (۱۸). در روش تولید گاز، کریستال ویولت نیز به‌عنوان منبع آلاینده سنتتیک در سه سطح (۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) همراه با بنتونیت سدیم شسته شده و یا خاکستر تهیه شده از پوست خربزه هر کدام در سه سطح (۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) در ۴ درصد ماده خشک نمونه خوراکی محیط کشت معادل صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) به یک محیط کشت آزمایشگاهی اضافه گردید. غلظت‌های تهیه شده از کریستال ویولت (صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) برای محیط کشت ۳۰ میلی‌لیتری در نظر گرفته شده بود. مایع شکمبه جهت تهیه محیط کشت از سه رأس گوسفند نر مغانی که به‌مدت سه ماه با یک جیره‌ی (۲۲) شامل یونجه و کنسانتره (نسبت ۳۰ به ۷۰) تغذیه می‌شدند و کنسانتره آن‌ها دارای ۲/۹۴ مگا کالری انرژی قابل متابولیسم در هر کیلوگرم ماده خشک و ۱۴ درصد پروتئین خام بود، بلافاصله بعد از کشتار این حیوانات (میانگین وزن  $45 \pm 4/5$ ) و از شکمبه آن‌ها گرفته شد. مایع شکمبه گرفته شده با پارچه متقال چهار لایه صاف و در فلاکس مخصوص ریخته و بلافاصله به آزمایشگاه مرکزی مجتمع آموزش عالی تربت جام انتقال داده شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از یونجه خشک رقم همدانی (به‌عنوان تنها ماده خوراکی) و آسیاب شده با مش یک میلیمتری، در داخل شیشه‌های با حجم ۱۲۰

کربن، آب و برخی از نمک‌های با منشأ غیر آلی می‌نمایند (۲) و به‌نظر می‌رسد تجزیه بیولوژیکی به‌دلیل تجزیه نکردن ساختمان اصلی رنگ از اهمیت کمتری در مقایسه با تجزیه زیستی برای محیط زیست برخوردار باشد. میکروارگانیسم‌های مختلفی اعم از باکتری‌ها، قارچ‌ها، مخمرها و جلبک‌ها قادر به تجزیه زیستی رنگ‌ها و تبدیل آن‌ها به ترکیبات بی‌خطرتر بوده هر چند که خاصیت رنگ‌زدایی این میکروارگانیسم‌ها، بستگی به سازگاری و فعالیت میکروارگانیسم‌های منتخب خواهد داشت (۲). یکی از راهکارهای کاهش رنگ موجود در آب‌های سطحی، استفاده از انواع مختلفی از جاذب‌ها می‌باشد (۲). از بین تمامی روش‌های مؤثر در حذف رنگ، جذب سطحی و استفاده از جاذب‌های ارزان قیمتی همچون مواد زاید کشاورزی از قبیل کاه برنج و گندم، پوسته برنج، پوسته بادام، پوست موز، کلزا و ساقه آفتابگردان به‌عنوان متداول‌ترین روش، مطرح می‌باشد (۲، ۱۹، ۲۷). مواد زاید کشاورزی شامل لیگنین، سلولز با گروه‌های پلی‌فنیک بوده که نقش مهمی را برای ترکیب شدن با رنگ بر عهده دارند. در مطالعه‌ای افزودن کربن فعال تهیه شده از پوسته برنج، منجر به کاهش چشم‌گیر رنگ کریستال ویولت اضافه شده به آب شد (۱۹). از زغال فعال به‌دلیل دارا بودن سطح گسترده، تخلخل زیاد، ظرفیت بالا در جذب سطحی و واکنش‌پذیری سطحی بالای آن، برای حذف رنگ استفاده می‌شود (۱۹). در برخی موارد، هزینه تهیه زغال فعال (مثل مرک و...) زیاد بوده، از این‌رو استفاده از مواد جاذب ارزان قیمت و کارآمد، منطقی به‌نظر می‌رسد. گزارش شده که از خاکستر زغال سنگ، چوب، سیلیکاژل، ضایعات کشاورزی، سویای روغن‌گیری شده، گل قرمز، خاکستر باگاس و ضایعات پنبه برای حذف انواع مختلفی از رنگ‌ها استفاده شده است (۱۹). خربزه یکی از گیاهان پرکشت در ایران بوده که میوه آن پس از مصرف دارای ضایعاتی بوده که می‌توان از این ضایعات در جهت تهیه و تولید زغال و یا خاکستر فعال استفاده نمود. بنتونیت نیز از جمله ترکیبات آلومینوسیلیکاتی مؤثر در جذب بسیاری از سموم و رنگ‌ها بوده که در صنعت دامپروری نیز امروزه به‌وفور از آن استفاده می‌شود (۱۲، ۱۴). با توجه به احتمال بودن مصرف منابع آبی آلوده به رنگ کریستال ویولت توسط دام‌های نشخوارکننده، این آزمایش با هدف بررسی اثر استفاده از رنگ کریستال ویولت بر تخمیر شکمبه‌ای در شرایط *in vitro* انجام شد، همچنین کارایی استفاده از دو جاذب ارزان قیمت شامل خاکستر تهیه شده از پوست خربزه یا بنتونیت سدیم در حذف رنگ کریستال ویولت نیز مورد ارزیابی قرار گرفت.

### جاذب‌ها و رنگ شیمیایی

رنگ کریستال ویولت با فرمول ملکولی  $(C_{25}H_{30}ClN_3)$  از شرکت مرک آلمان تهیه شد. نمونه‌های بنتونیت سدیم (با نام تجاری بنتوفید) از گروه ویوان تهیه شد. برای فرآوری اولیه، نمونه‌ی بنتونیت تهیه شده چندین مرتبه با آب مقطر دوبار تقطیر شستشو و در ادامه با استفاده از کاغذ صافی معمولی، صاف و پس از جمع‌آوری از روی کاغذ صافی به‌درون کروزه چینی انتقال و بلافاصله به بن‌ماری با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت تا خشک شدن کامل، انتقال گردید. مزارعی از کشت خربزه در سطح تربت‌جام به‌صورت تصادفی انتخاب شد و از چندین نقطه این مزارع، میوه‌ی خربزه (رقم خاتون) به‌صورت تصادفی

باز کردن درب شیشه‌ها و صاف کردن آن‌ها با پارچه متقال چهار لایه، اندازه‌گیری شد.

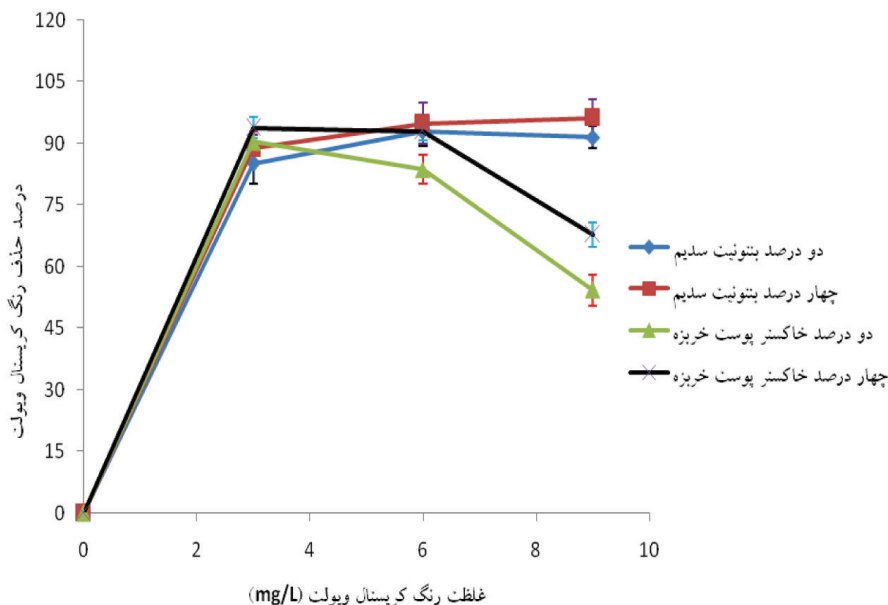
### تخمین‌ها و آنالیز آماری داده‌ها

با توجه به معادله  $R\% = [C_0 - Ct / C_0] \times 100$  درصد حذف رنگ کریستال ویولت (R) محاسبه شد که در این معادله  $C_0$  و  $C_t$  به ترتیب غلظت اولیه و نهایی رنگ (پس از جذب) می‌باشند (۲۰). نمودارهای مربوط به حذف رنگ کریستال ویولت در حضور جاذب‌ها به کمک نرم‌افزار Excel (۲۰۰۷) تهیه شد. آنالیز داده‌های تولید گاز نیز بر اساس معادله  $P = b(1 - e^{-ct})$  انجام شد (۲۳) که در این معادله، P برابر حجم گاز تولیدی در زمان t، b برابر تولید گاز از بخش نامحلول ولی قابل تخمیر پس از ۹۶ ساعت انکوباسیون (میلی‌لیتر به ازای ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک)، c برابر با ثابت نرخ تولید گاز برای b (میلی‌لیتر در ساعت) و t معادل زمان انکوباسیون (ساعت) می‌باشد. انرژی خالص شیردهی (NEI)، قابلیت هضم ماده‌ی آلی (OMD) و انرژی قابل متابولیسم (ME) بر اساس معادلات منک و استینگاس (۱۷) برآورد شدند:

$$NEI (MJ/kg DM) = 0/08 + 0/1101GP + 0/0022 XP + 0/0161XL$$

که در معادله بالا، GP معادل حجم گاز تجمعی تولید شده در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه انکوبه بوده و XP و

میلی‌لیتر ریخته شد و سپس غلظت (صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام) مشخصی از رنگ کریستال ویولت (تهیه شده از محلول مادر) همراه با جاذب‌های مختلف (بنتونیت سدیم و خاکستر پوست خربزه هر کدام به مقدار صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) در داخل شیشه‌ها ریخته شد و پس از افزودن مایع شکمبه و بزاق مصنوعی (به ترتیب با نسبت یک به دو: ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه + ۲۰ میلی‌لیتر بزاق مصنوعی) بلافاصله درب آن‌ها با استفاده از درپوش‌های لاستیکی و کپ‌های آلومینیومی به کمک ابزار کریمپر پلمپ شده و به بن‌ماری با دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد انتقال و در زمان‌های ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انکوبه شدند. در محیط کشت برای هر تیمار پنج تکرار در نظر گرفته شد. مقدار فشار گاز در زمان‌های فوق به کمک فشارسنج دیجیتالی (Env Company, Helsinki, Finland, PTB۳۰) ثبت گردید و همزمان میزان حجم گاز تولید شده اندازه‌گیری و ثبت شد (۲۸). محلول محیط کشت بر اساس دستورالعمل منک و استینگاس (۱۷) تهیه شد. از یک محیط کشت مشابه آزمون تولید گاز جهت تعیین میزان کل اسیدهای چرب فرار (TVFA)، pH و نیتروژن آمونیاکی در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون استفاده شد. برای جلوگیری از تجمع گاز، گاز درون هر یک از شیشه‌ها توسط سرسنگ مخصوص متناوباً تخلیه شد تا اثر منفی بر فعالیت‌های تخمیری میکروارگانیسم‌های محیط کشت نگذارد. میزان کل اسیدهای چرب فرار با دستگاه مارخام و به روش بارنت و رثید (۶) اندازه‌گیری شد. مقدار نیتروژن آمونیاکی محیط کشت نیز بر اساس روش کجلدال اندازه‌گیری شد (۱۶). میزان pH محیط کشت بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، با کمک pH متر (Metrohm, 691) بلافاصله بعد از



شکل ۱- روند حذف رنگ کریستال ویولت اضافه شده به آب توسط خاکستر پوست خربزه و بنتونیت سدیم در زمان ۳ ساعت انکوباسیون

( $AB$ ) $ij$  = اثر متقابل سطوح رنگ و نوع جاذب،  $Ck$  = اثر سطوح جاذب،  $ACik$  = اثر متقابل سطوح رنگ کریستال ویولت و سطوح جاذب،  $BCjk$  = اثر متقابل نوع جاذب و سطوح جاذب،  $ABCijk$  = اثر متقابل بین سطوح رنگ کریستال ویولت، نوع جاذب و سطوح جاذب بوده و  $\epsilon_{ijk}$  معادل خطای آزمایشی بود. اختلاف آماری بین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد و با استفاده از نرم افزار SAS نسخه ۹/۱ تعیین شد.

### نتایج

#### نتایج قدرت حذف رنگ به کمک جاذب‌ها

روند حذف رنگ کریستال ویولت اضافه شده به آب توسط خاکستر پوست خربزه و بنتونیت سدیم در زمان ۳ ساعت انکوباسیون در شکل ۱ نشان داده شده است. هر دو جاذب شامل خاکستر تهیه شده از پوست خربزه و بنتونیت سدیم، قابلیت حذف رنگ را از آب دارا بودند. در غلظت‌های پایین رنگ (سطح ۳ پی‌پی‌ام)، اختلاف معنی‌داری بین سطوح مختلف دو جاذب (۲ و ۴ درصد) برای حذف رنگ مشاهده نشد، هر چند که با بالا رفتن غلظت رنگ در آب به‌ویژه در سطح ۹ پی‌پی‌ام، کارایی بنتونیت سدیم در حذف رنگ کریستال ویولت نسبت به خاکستر پوست خربزه بیشتر بود. کمترین درصد حذف رنگ در سطح ۶ پی‌پی‌ام، مربوط به سطح دو درصد خاکستر تهیه شده از پوست خربزه بود. همچنین روند حذف رنگ کریستال ویولت اضافه شده به آب توسط خاکستر پوست خربزه و بنتونیت سدیم در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون

XL به ترتیب معادل درصد پروتئین خام و درصد چربی خام یونجه خشک انکوبه شده در محیط کشت بود.

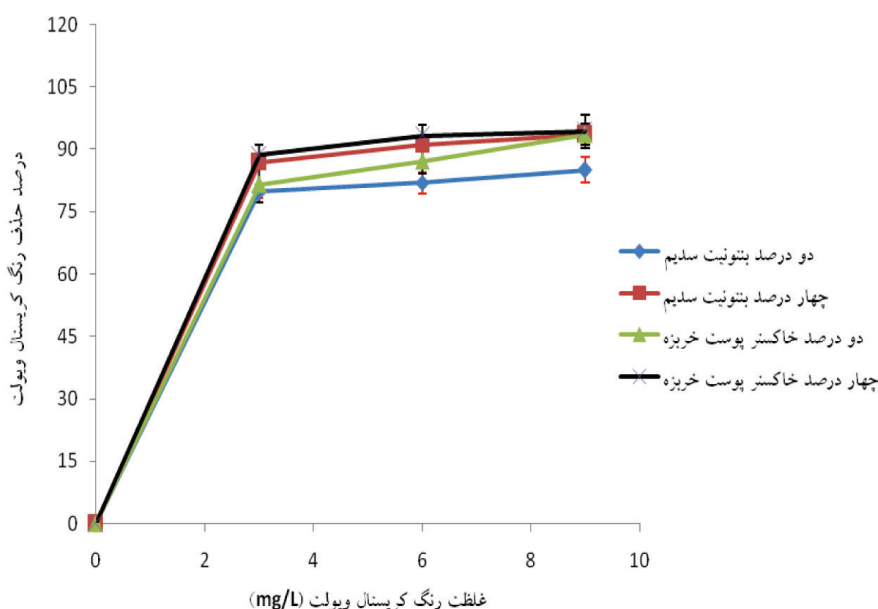
$$OMD (\%) = 33/71 + 0/7464GP$$

که در معادله بالا، GP معادل حجم گاز تجمعی تولید شده در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه انکوبه بود.

$$ME (MJ/kg DM) = 2/04 + 0/1448GP + 0/0036 XP + 0/0243XL$$

که در معادله فوق، GP معادل حجم تجمعی گاز تا زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون برای ۲۰۰ میلی‌گرم نمونه بوده و XP و XL به ترتیب معادل درصد پروتئین خام و درصد چربی خام نمونه انکوبه شده در محیط کشت می‌باشند.

بازده تولید پروتئین میکروبی به صورت ۱۹/۳ گرم نیتروژن میکروبی به ازای هر کیلوگرم ماده‌ی آلی قابل تخمیر، گزارش گردید (۱۰). همچنین از یک آزمایش فاکتوریل  $4 \times 2 \times 3$  (عامل اول چهار سطح کریستال ویولت، عامل دوم دو نوع جاذب شامل خاکستر پوست خربزه و بنتونیت سدیم و عامل سوم سه سطح جاذب) با طرح پایه کاملاً تصادفی استفاده گردید به طوری که مدل آماری طرح شامل  $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + C_k + AC_{ik} + BC_{jk} + ABC_{ijk} + \epsilon_{ijk}$  می‌انگین کل،  $A_i$  = اثر سطوح رنگ کریستال ویولت،  $B_j$  = اثر نوع جاذب،



شکل ۲- روند حذف رنگ کریستال ویولت اضافه شده به آب توسط خاکستر پوست خربزه و بنتونیت سدیم در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون

جدول ۱- تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خربزه بر برخی پارامترهای تخمیری تولید گاز در محیط کشت

| ثابت نرخ تولید گاز<br>( $h^{-1}$ ) | پتانسیل تولید گاز<br>(ml/96h) | تولید تجمعی گاز<br>(ml/24h) | تولید تجمعی گاز<br>(ml/12h) | سطح جاذب <sup>۲</sup> | نوع جاذب          | سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup><br>(ppm) |
|------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------|-------------------|---|
| ۰/۰۵۷ abc                          | ۷۳/۱۰ a                       | ۵۰/۵۰ a                     | ۳۷/۶۴ a                     | ۰                     | بنتونیت سدیم      | ۰                                       |
| ۰/۰۶۴ ab                           | ۶۸/۳۵ b                       | ۴۹/۲۵ ab                    | ۳۷/۳۹ a                     | ۲                     | بنتونیت سدیم      | ۰                                       |
| ۰/۰۵۵ abcd                         | ۶۸/۸۱ b                       | ۴۶/۹۳ bc                    | ۳۴/۴۱ bc                    | ۴                     | بنتونیت سدیم      | ۰                                       |
| ۰/۰۵۷ abc                          | ۷۳/۱۰ a                       | ۵۰/۵۰ a                     | ۳۷/۶۴ a                     | ۰                     | خاکستر پوست خربزه | ۰                                       |
| ۰/۰۵۵ abcd                         | ۶۸/۸۰ b                       | ۴۷/۵۴ abc                   | ۳۵/۱۶ ab                    | ۲                     | خاکستر پوست خربزه | ۰                                       |
| ۰/۰۵۳ abcd                         | ۶۴/۳۴ c                       | ۴۴/۷۲ c                     | ۳۱/۹۴ c                     | ۴                     | خاکستر پوست خربزه | ۰                                       |
| ۰/۰۶۷ a                            | ۲۶/۰۵ d                       | ۱۹/۵۶ d                     | ۱۴/۰۷ d                     | ۰                     | بنتونیت سدیم      | ۳                                       |
| ۰/۰۴۷ bcdef                        | ۲۲/۴۸ de                      | ۱۴/۸۶ ef                    | ۹/۱۹ ef                     | ۲                     | بنتونیت سدیم      | ۳                                       |
| ۰/۰۳۸ defg                         | ۲۲/۱۴ de                      | ۱۴/۰۷ ef                    | ۸/۴۰ efg                    | ۴                     | بنتونیت سدیم      | ۳                                       |
| ۰/۰۶۷ a                            | ۲۶/۰۵ d                       | ۱۹/۵۶ d                     | ۱۴/۰۷ d                     | ۰                     | خاکستر پوست خربزه | ۳                                       |
| ۰/۰۵۹ abc                          | ۲۲/۴۸ de                      | ۱۵/۸۰ e                     | ۹/۷۶ e                      | ۲                     | خاکستر پوست خربزه | ۳                                       |
| ۰/۰۵۰ abcde                        | ۲۱/۲۳ ef                      | ۱۴/۳۳ ef                    | ۸/۲۹ efg                    | ۴                     | خاکستر پوست خربزه | ۳                                       |
| ۰/۰۶۱ abc                          | ۱۶/۹۸ fgh                     | ۱۱/۹۳ fg                    | ۷/۴ efg                     | ۰                     | بنتونیت سدیم      | ۶                                       |
| ۰/۰۴۴ cdef                         | ۱۷/۵۸ fgh                     | ۱۰/۹۰ gh                    | ۶/۸۱ fghi                   | ۲                     | بنتونیت سدیم      | ۶                                       |
| ۰/۰۴۲ cdef                         | ۱۶/۴۵ gh                      | ۹/۶۵ gh                     | ۶/۱۹ ghij                   | ۴                     | بنتونیت سدیم      | ۶                                       |
| ۰/۰۶۱ abc                          | ۱۶/۹۸ fgh                     | ۱۱/۹۳ fg                    | ۷/۴ efg                     | ۰                     | خاکستر پوست خربزه | ۶                                       |
| ۰/۰۳۵ efg                          | ۱۷/۵۸ fgh                     | ۹/۵۲ gh                     | ۵/۲۵ hijk                   | ۲                     | خاکستر پوست خربزه | ۶                                       |
| ۰/۰۲۹ fgh                          | ۱۶/۱۶ gh                      | ۹/۶۰ gh                     | ۴/۳۸ ijk                    | ۴                     | خاکستر پوست خربزه | ۶                                       |
| ۰/۰۳۴ efg                          | ۱۸/۵۸ efg                     | ۹/۵۶ gh                     | ۴/۲۵ ijk                    | ۰                     | بنتونیت سدیم      | ۹                                       |
| ۰/۰۲ gh                            | ۱۸/۸۱ efg                     | ۹/۳۶ gh                     | ۳/۵۴ jk                     | ۲                     | بنتونیت سدیم      | ۹                                       |
| ۰/۰۱۷ h                            | ۱۹/۴۹ efg                     | ۸/۴۳ h                      | ۲/۶۳ k                      | ۴                     | بنتونیت سدیم      | ۹                                       |

ادامه در صفحه بعد



گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون مشاهده نشد. همچنین افزودن هر دو جاذب به‌ویژه در سطح ۴ درصد، منجر به کاهش معنی‌دار پتانسیل تولید گاز و تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون شد ( $P < 0/0001$ ) ولی ثابت نرخ تولید گاز تغییر ننمود. با افزایش سطح رنگ از صفر به ۶ پی‌پی‌ام، ثابت نرخ تولید گاز نسبت به شاهد تغییر نکرد ولی در سطح ۹ پی‌پی‌ام، این پارامتر کاهش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0/0001$ ). اثر متقابل کلیه پارامترهای گزارش شده در جدول ۱ بین سطح رنگ و سطح جاذب معنی‌دار شد، به‌طوری‌که کمترین میزان تولید گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون و نیز پتانسیل تولید گاز، در سطح ۹ پی‌پی‌ام کریستال ویولت همراه با سطح ۴ درصد خاکستر پوست خربزه مشاهده شد. همچنین اثرات متقابل سه‌گانه بین سطح رنگ، نوع جاذب و سطح جاذب تنها برای پتانسیل تولید گاز معنی‌دار شد ( $P = 0/006$ )، به طوری‌که بیشترین میزان پتانسیل تولید گاز در تیمار شاهد (فاقد کریستال ویولت، خاکستر پوست خربزه

در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون نیز هر دو جاذب کارایی بالایی در حذف رنگ داشتند. اختلاف معنی‌داری برای حذف رنگ کریستال ویولت در سطح ۳ پی‌پی‌ام در بین سطوح مختلف دو جاذب مشاهده نشد. بیشترین درصد حذف رنگ در سطوح مختلف رنگ، مربوط به سطح ۴ درصد بنتونیت سدیم بود.

### نتایج تکنیک Gas production

تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خربزه بر برخی پارامترهای تخمیری تولید گاز در جدول ۱ آورده شده است. افزایش سطح کریستال ویولت از صفر به ۶ پی‌پی‌ام به محیط کشت، منجر به کاهش معنی‌دار تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون و نیز پتانسیل تولید گاز در مقایسه با تیمار شاهد شد ( $P < 0/0001$ )، هر چند که اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۶ و ۹ پی‌پی‌ام برای پتانسیل تولید گاز و نیز تولید

ادامه جدول ۱-

| ثابت نرخ تولید گاز ( $h^{-1}$ ) | پتانسیل تولید گاز (ml/96h) | تولید تجمعی گاز (ml/24h) | تولید تجمعی (ml/12h) | سطح جاذب <sup>۲</sup> | نوع جاذب          | سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup> (ppm) |
|---------------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------|-----------------------|-------------------|--------------------------------------|
| ۰/۰۳۴efgh                       | ۱۸/۵۲efgh                  | ۹/۵۶gh                   | ۴/۲۵jzk              | ۰                     | خاکستر پوست خربزه | ۹                                    |
| ۰/۰۲۹fgh                        | ۱۶/۰۳gh                    | ۹/۷۴gh                   | ۳/۷۴jk               | ۲                     | خاکستر پوست خربزه | ۹                                    |
| ۰/۰۲۸fgh                        | ۱۴/۸۸h                     | ۸/۳۲h                    | ۴/۳۶jzk              | ۴                     | خاکستر پوست خربزه | ۹                                    |
| ۰/۰۰۵                           | ۱/۳۴                       | ۱/۰۲                     | ۰/۹۱                 | SEM                   |                   |                                      |
| P-Value                         |                            |                          |                      |                       |                   |                                      |
| <0/0001                         | <0/0001                    | <0/0001                  | <0/0001              |                       |                   | سطح رنگ                              |
| ۰/۶۸                            | ۰/۵۵                       | ۰/۴۴                     | ۰/۲۱                 |                       |                   | نوع جاذب                             |
| ۰/۰۳                            | ۰/۰۰۷                      | ۰/۴۹                     | ۰/۱۳                 |                       |                   | سطح رنگ × نوع جاذب                   |
| <0/0001                         | ۰/۰۰۲                      | <0/0001                  | <0/0001              |                       |                   | سطح جاذب                             |
| ۰/۰۵                            | <0/0001                    | ۰/۰۳                     | ۰/۰۰۲                |                       |                   | سطح رنگ × سطح جاذب                   |
| ۰/۸۸                            | ۰/۹۱                       | ۰/۸۶                     | ۰/۶۶                 |                       |                   | نوع جاذب × سطح جاذب                  |
| ۰/۵۴                            | ۰/۰۰۶                      | ۰/۹۳                     | ۰/۷۰                 |                       |                   | سطح رنگ × نوع جاذب × سطح جاذب        |

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0/05$ ).

<sup>۱</sup> سطح رنگ کریستال ویولت مصرفی در محیط کشت شامل صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام بود. <sup>۲</sup> سطح جاذب مورد استفاده در محیط کشت معادل صفر، ۲ و ۴ درصد ماده خشک نمونه انکوبه شده (یونجه) در محیط کشت (یا معادل صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) بود.

جدول ۲- تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خرپزه بر برخی پارامترهای تغذیه‌ای برآورد شده از تولید گاز

| سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup><br>(ppm) | نوع جاذب          | سطح جاذب <sup>۲</sup> | MPY <sup>۳</sup><br>(گرم نیترژن<br>میکروبی) | OMD <sup>۴</sup><br>(درصد) | NE (MJ/kgDM) <sup>۵</sup> | ME (MJ/kgDM) <sup>۶</sup> |
|---|-------------------|-----------------------|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۱۳/۷۸ a                                     | ۷۱/۴۰ a                    | ۵/۷۲a                     | ۹/۴۸a                     |
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۱۳/۶۸ ab                                    | ۷۰/۴۷ab                    | ۵/۵۸ab                    | ۹/۳۰ ab                   |
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۱۳/۲۷ bc                                    | ۶۸/۷۴bc                    | ۵/۳۳bc                    | ۸/۹۷bc                    |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۱۳/۷۸ a                                     | ۷۱/۴ a                     | ۵/۷۲a                     | ۹/۴۸a                     |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۱۳/۳۵abc                                    | ۶۹/۱۹abc                   | ۵/۴۰abc                   | ۹/۰۵abc                   |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۱۲/۹۵ c                                     | ۶۷/۰۹c                     | ۵/۰۹c                     | ۸/۶۵c                     |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۹/۳۲d                                       | ۴۸/۳۱d                     | ۲/۳۲d                     | ۵/۰۰d                     |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۸/۶۵ef                                      | ۴۴/۸۰ef                    | ۱/۸۰ef                    | ۴/۳۷ef                    |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۸/۵۳ef                                      | ۴۴/۲۱ef                    | ۱/۷۱ef                    | ۴/۲۰ef                    |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۹/۳۲d                                       | ۴۸/۳۱d                     | ۲/۳۲d                     | ۵/۰۰d                     |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۸/۷۸ e                                      | ۴۵/۵۰e                     | ۱/۹۰e                     | ۴/۴۶e                     |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۸/۵۷ef                                      | ۴۴/۴۰ef                    | ۱/۷۴ef                    | ۴/۲۵ef                    |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۸/۲۲fg                                      | ۴۲/۶۲fg                    | ۱/۴۸fg                    | ۳/۹۰fg                    |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۸/۰۸gh                                      | ۴۱/۸۵gh                    | ۱/۳۶gh                    | ۳/۷۵gh                    |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۷/۹۰gh                                      | ۴۰/۹۱gh                    | ۱/۲۲gh                    | ۳/۵۷gh                    |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۸/۲۲fg                                      | ۴۲/۶۲gh                    | ۱/۴۸fg                    | ۳/۹۰fg                    |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۷/۸۸gh                                      | ۴۰/۸۲gh                    | ۱/۲۱gh                    | ۳/۵۵gh                    |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۷/۸۹gh                                      | ۴۰/۸۷gh                    | ۱/۲۲gh                    | ۳/۵۶gh                    |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۷/۸۹gh                                      | ۴۰/۸۴gh                    | ۱/۲۱gh                    | ۳/۵۵gh                    |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۷/۸۵ gh                                     | ۴۰/۶۹gh                    | ۱/۱۹gh                    | ۳/۵۳gh                    |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۷/۷۲ h                                      | ۴۰/۰۱h                     | ۱/۰۹h                     | ۳/۳۹h                     |

ادامه در صفحه بعد



تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خربزه بر برخی پارامترهای تغذیه‌ای برآورد شده از تولید گاز در جدول ۲ ارائه شده است. با افزایش کریستال ویولت از صفر به ۶ پی‌پی‌ام، کلیه پارامترهای تغذیه‌ای برآورد شده از تولید گاز (جدول ۲)، در مقایسه با تیمار شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0/0001$ ). اضافه کردن هر دو جاذب خاکستر پوست خربزه یا بنتونیت سدیم به‌ویژه در سطح ۴ درصد، منجر به کاهش معنی‌دار کلیه پارامترهای گزارش شده در جدول ۲ در مقایسه با تیمار شاهد شد ( $P < 0/0001$ ). همچنین اثرات متقابل بین سطح رنگ و سطح جاذب برای کلیه این پارامترها نیز معنی‌دار شد ( $P = 0/03$ ) به‌طوری‌که کمترین مقادیر این پارامترها در سطح ۹ پی‌پی‌ام کریستال ویولت همراه با سطح ۴ درصد پوست خربزه مشاهده شد، هر چند که اختلاف معنی‌داری برای این پارامترها بین سطوح ۶ و ۹ پی‌پی‌ام رنگ مشاهده نشد. اختلاف

و یا بنتونیت سدیم) مشاهده شد. اثرات متقابل بین سطح رنگ و نوع جاذب برای پتانسیل تولید گاز و ثابت نرخ تولید گاز نیز معنی‌دار شد، به‌طوری‌که در سطح ۹ پی‌پی‌ام کریستال ویولت همراه با بنتونیت سدیم (در سطوح مختلف)، کمترین ثابت نرخ تولید گاز مشاهده شد. در اثر افزایش سطوح جاذب‌ها به محیط کشت به‌ویژه سطح ۴ درصد، پتانسیل تولید گاز و تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت انکوباسیون به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد کاهش یافت ( $P < 0/0001$ ). با افزایش همزمان سطح رنگ و سطح جاذب در محیط کشت، کلیه پارامترهای گزارش شده در جدول یک، کاهش معنی‌داری نشان داد. اختلاف آماری معنی‌داری در بین دو نوع جاذب بنتونیت سدیم و خاکستر پوست خربزه بکار برده شده در محیط کشت از لحاظ تأثیر بر روی پارامترهای تخمیری مورد مطالعه (ثابت نرخ تولید گاز و نیز تولید گاز در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۹۶ ساعت انکوباسیون) در جدول ۱ مشاهده نشد.

ادامه جدول ۲-

| سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup><br>(ppm) | نوع جاذب          | سطح جاذب <sup>۲</sup> | MPY <sup>۳</sup><br>(گرم نیتروژن میکروبی) | OMD <sup>۴</sup><br>(درصد) | NE (MJ/kgDM) <sup>۵</sup> | ME (MJ/kgDM) <sup>۶</sup> |
|---|-------------------|-----------------------|---|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۰                     | ۷/۸۸gh                                    | ۴۰/۸۴gh                    | ۱/۲۱gh                    | ۳/۵۵gh                    |
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۲                     | ۷/۹۱gh                                    | ۴۰/۹۸gh                    | ۱/۲۳gh                    | ۳/۵۸gh                    |
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۴                     | ۷/۷۰h                                     | ۳۹/۹۲h                     | ۱/۰۸h                     | ۳/۳۸h                     |
|   |                   | SEM                   | ۰/۱۵                                      | ۰/۷۶                       | ۰/۱۱                      | ۰/۱۵                      |
| P-Value                                 |                   |                       |   |                            |                           |                           |
| سطح رنگ                                 |                   |                       | <0/0001                                   | <0/0001                    | <0/0001                   | <0/0001                   |
| نوع جاذب                                |                   |                       | 0/44                                      | 0/44                       | 0/44                      | 0/44                      |
| سطح رنگ × نوع جاذب                      |                   |                       | 0/49                                      | 0/49                       | 0/49                      | 0/49                      |
| سطح جاذب                                |                   |                       | <0/0001                                   | <0/0001                    | 0/002                     | <0/0001                   |
| سطح رنگ × سطح جاذب                      |                   |                       | 0/03                                      | 0/03                       | 0/03                      | 0/03                      |
| نوع جاذب × سطح جاذب                     |                   |                       | 0/86                                      | 0/86                       | 0/86                      | 0/86                      |
| سطح رنگ × نوع جاذب × سطح جاذب           |                   |                       | 0/93                                      | 0/93                       | 0/93                      | 0/93                      |

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0/05$ ).

<sup>۱</sup> سطح رنگ کریستال ویولت مصرفی در محیط کشت شامل صفر، ۳، ۶ و ۹ پی‌پی‌ام بود. <sup>۲</sup> سطح جاذب مورد استفاده در محیط کشت معادل صفر، ۲ و ۴ درصد ماده خشک نمونه انکوبه شده (یونجه) در محیط کشت (یا معادل صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) بود. <sup>۳</sup> بازده تولید پروتئین میکروبی به‌صورت ۱۹/۳ گرم نیتروژن میکروبی به ازای هر کیلوگرم ماده‌ی آلی قابل تخمیر می‌باشد. <sup>۴</sup> معادل تجزیه‌پذیری ماده آلی می‌باشد. <sup>۵</sup> معادل انرژی خالص برای شیردهی می‌باشد. <sup>۶</sup> معادل انرژی قابل متابولیسم می‌باشد.

جدول ۳- تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خرپزه بر کل اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت

| سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup><br>(ppm) | نوع جاذب          | سطح جاذب <sup>۲</sup> | pH   | <sup>۳</sup> NH <sub>۳</sub> -N (mg/dL) | <sup>۴</sup> TVFA (mmol/L) |
|---|-------------------|-----------------------|------|---|----------------------------|
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۶/۴۹ | ۱۶/۴۲a                                  | ۷۳/۱۲cdef                  |
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۶/۵۳ | ۱۵/۲۵ abc                               | ۷۴/۸۷ab                    |
| ۰                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۶/۵۵ | ۱۴/۸۷abc                                | ۷۵/۸۵a                     |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۶/۴۹ | ۱۶/۴۲a                                  | ۷۳/۱۲cdef                  |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۶/۵۰ | ۱۴/۸۵abc                                | ۷۲/۸۰ defg                 |
| ۰                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۶/۴۹ | ۱۳/۹۷dc                                 | ۷۱/۸۲efg                   |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۶/۵۲ | ۱۵/۹۵ab                                 | ۷۲/۵۷fgh                   |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۶/۵۱ | ۱۵/۰۵abc                                | ۷۳/۲۷cde                   |
| ۳                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۶/۵۰ | ۱۴/۹۵abc                                | ۷۵/۷۵a                     |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۶/۵۲ | ۱۵/۹۵ab                                 | ۷۱/۵۷fgh                   |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۶/۴۹ | ۱۴/۸۵abc                                | ۷۳/۵۱bcd                   |
| ۳                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۶/۵۱ | ۱۴/۰۲bcd                                | ۷۴/۵۵ abc                  |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۶/۵۶ | ۱۳/۹۰cde                                | ۶۹/۸۲ i                    |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۶/۵۳ | ۱۲/۱۵def                                | ۷۳/۳۷cde                   |
| ۶                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۶/۵۰ | ۱۱/۵۰f                                  | ۷۵/۱۰a                     |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۰                     | ۶/۵۶ | ۱۳/۹۰cde                                | ۷۱/۵۵fgh                   |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۲                     | ۶/۵۲ | ۱۲/۲۷def                                | ۷۲/۲۰ defg                 |
| ۶                                       | خاکستر پوست خرپزه | ۴                     | ۶/۶۰ | ۱۱/۳۷f                                  | ۷۵/۴۵ a                    |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۰                     | ۶/۶۴ | ۱۲/۵۲def                                | ۶۹/۴۵ i                    |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۲                     | ۶/۵۸ | ۱۲/۱۳def                                | ۷۰/۲۷ hi                   |
| ۹                                       | بنتونیت سدیم      | ۴                     | ۶/۵۵ | ۱۲/۰۰ef                                 | ۷۲/۷۰ defg                 |

ادامه در صفحه بعد

جاذب، اثرات متقابل بین سطح رنگ و نوع جاذب و نیز اثرات متقابل بین سطح رنگ و سطح جاذب تنها برای هیچکدام از پارامترهای جدول ۳ معنی‌دار نشد. با افزایش سطح هر یک از جاذب‌های خاکستر پوست خربزه یا بنتونیت سدیم به محیط کشت، میزان نیتروژن آمونیاکی کاهش معنی‌داری نشان داد ( $P < 0.0001$ ).

### بحث

معمولاً پساب‌های حاصل از صنایع مختلف نساجی، آلوده به برخی از رنگ‌ها از جمله کریستال ویولت می‌باشند که این پساب‌ها ممکن است وارد رودخانه‌ها و یا مسیر آب‌های سطحی شده و مشکلاتی را برای محیط زیست و حیوانات مصرف کننده آن بوجود آورد. بنابراین به نظر می‌رسد که استفاده از جاذب‌های مختلف، راهکاری در جهت کاهش این

معنی‌داری در بین دو نوع جاذب بنتونیت سدیم و خاکستر پوست خربزه بکار برده شده در محیط کشت برای تأثیر بر روی پارامترهای تغذیه‌ای برآورد شده از تولید گاز (جدول ۲) مشاهده نشد. تأثیر سطوح مختلف رنگ کریستال ویولت همراه با سطوح مختلف بنتونیت سدیم یا خاکستر پوست خربزه بر کل اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و pH محیط کشت در جدول ۳ آورده شده است. هیچگونه اختلاف معنی‌داری در بین تیمارهای آزمایشی برای pH مشاهده نشد اما با افزایش سطح رنگ از صفر به ۶ پی‌پی‌ام، کل اسیدهای چرب و نیتروژن آمونیاکی محیط کشت، کاهش معنی‌داری را نشان دادند ( $P < 0.0001$ ) و هیچگونه اختلاف معنی‌داری برای این پارامترها بین سطح ۶ و ۹ پی‌پی‌ام رنگ مشاهده نشد. اثرات متقابل بین سطح رنگ، نوع جاذب و سطح جاذب، اثرات متقابل بین نوع جاذب و سطح

ادامه جدول ۳-

| سطح کریستال ویولت <sup>۱</sup><br>(ppm) | نوع جاذب          | سطح جاذب <sup>۲</sup> | pH   | ${}^3\text{NH}_4\text{-N}$ (mg/dL) | ${}^4\text{TVFA}$ (mmol/L) |
|---|-------------------|-----------------------|------|------------------------------------|----------------------------|
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۰                     | ۶/۶۴ | ۱۲/۵۲ def                          | ۷۰/۰۷hi                    |
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۲                     | ۶/۵۵ | ۱۲/۸۲def                           | ۶۹/۵۰.i                    |
| ۹                                       | خاکستر پوست خربزه | ۴                     | ۶/۵۲ | ۱۱/۸۰.f                            | ۷۱/۳۵gh                    |
|   |                   | SEM                   | ۰/۰۴ | ۰/۵۹                               | ۰/۴۸                       |
| P-Value                                 |                   |                       |      |                                    |                            |
| سطح رنگ                                 |                   |                       | ۰/۰۲ | <۰/۰۰۰۱                            | ۰/۰۲                       |
| نوع جاذب                                |                   |                       | ۰/۷۲ | ۰/۵۱                               | ۰/۷۲                       |
| سطح رنگ × نوع جاذب                      |                   |                       | ۰/۶۶ | ۰/۷۸                               | ۰/۶۶                       |
| سطح جاذب                                |                   |                       | ۰/۳۶ | <۰/۰۰۰۱                            | ۰/۳۶                       |
| سطح رنگ × سطح جاذب                      |                   |                       | ۰/۴۷ | ۰/۳۸                               | ۰/۴۷                       |
| نوع جاذب × سطح جاذب                     |                   |                       | ۰/۸۳ | ۰/۵۵                               | ۰/۸۳                       |
| سطح رنگ × نوع جاذب × سطح جاذب           |                   |                       | ۰/۸۹ | ۰/۹۹                               | ۰/۸۹                       |

میانگین‌های هر ستون با حروف غیرمشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ( $P < 0.05$ ).

<sup>۱</sup> سطح رنگ کریستال ویولت مصرفی در محیط کشت شامل صفر، ۳، ۶، ۹ پی‌پی‌ام بود. <sup>۲</sup> سطح جاذب مورد استفاده در محیط کشت معادل صفر، ۲ و ۴ درصد ماده خشک نمونه انکوبه شده (یونجه) در محیط کشت (یا معادل صفر، ۴ و ۸ میلی‌گرم) بود. <sup>۳</sup> معادل نیتروژن آمونیاکی. <sup>۴</sup> معادل کل اسیدهای چرب فرار اندازه‌گیری شده در محیط کشت به روش مارخام.

و سمیت را دارا می‌باشد (۱۱). در مطالعه حال حاضر نیز به نظر می‌رسد میکروارگانیسم‌های محیط شکمبه قادر به تجزیه و خنثی کردن اثرات منفی کریستال ویولت نمی‌باشند. خاصیت رنگ‌زدایی برخی از رنگ‌های شیمیایی با استفاده از سویه‌های مختلفی از باکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به آئوروموناس هیدروفیلا (*Aeromonas hydrophila*)، پزودوموناس لوتولا (*Pseudomonas luteola*)، اشرشیاکلی و پزودوموناس مندوسینا (*Pseudomonas mendocina*) اشاره نمود (۲). تجزیه رنگ‌های از دسته تری‌فنیل‌متان، به‌طور گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته است ولی این گروه از رنگ‌ها به‌ویژه در سیستم لجن‌های فعال شده در برابر تجزیه شدن از خود مقاومت نشان می‌دهند (۹)، بنابراین به نظر می‌رسد که در آزمایش حال حاضر نیز میکروارگانیسم‌های موجود در محیط کشت نتوانسته‌اند کریستال ویولت را خنثی سازی کرده و در نهایت از اثرات منفی آن بر فراسنجه‌های تخمیری محیط کشت بکاهند. ولی در مطالعه دیگری گونه باکتری *Sphingomonas paucimobilis* قادر به رنگ‌زدایی کریستال ویولت در سطح بیش از ۵۵ درصد بود (۹) هر چند که افزایش غلظت رنگ منجر به کاهش قدرت رنگ‌زدایی توسط این گونه باکتری شد. همچنین قدرت رنگ‌زدایی این گونه باکتری، بستگی به غلظت رنگ و میزان گلوکز و عصاره مخمری اضافه شده به محیط کشت داشت. بنابراین در مطالعه حال حاضر نیز به نظر می‌رسد که میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان یکی از اثرگذارترین مؤلفه بر پارامترهای تخمیری در محیط کشت، نیز نتوانسته‌اند از اثرات منفی کریستال ویولت بر محیط کشت در غلظت‌های ۳ و ۶ پی‌پی‌ام کریستال ویولت بکاهند. افزودن بنتونیت سدیم و خاکستر پوست خرزبه در مطالعه حاضر هر کدام به‌تنهایی منجر به کاهش فراسنجه‌های تولید گاز و پارامترهای شامل ME<sup>+</sup> NEL<sup>+</sup> MPY و OMD، به‌ویژه در سطح ۴ درصد شد. همچنین اضافه کردن توأم هر یک از جاذب‌ها همراه با سطوح مختلف کریستال ویولت، منجر به کاهش شدیدتر پارامترهای تولید گاز گردید. بنتونیت از گروه کانی‌های رسی-آتشفشانی بوده که با هدف افزایش عملکرد نشخوارکنندگان به‌دلیل ظرفیت بافری آن و نیز ظرفیت بالای تبادل یونی آن، مکرراً استفاده شده است (۱۲، ۱۳، ۱۴). همچنین در اثر افزودن بنتونیت سدیم (دو درصد ماده خشک جیره) به یک محیط کشت آزمایشگاهی، تولید تجمعی گاز در زمان‌های ۴۸، ۹۶ ساعت انکوباسیون، ثابت نرخ تولید گاز و نیز نیتروژن آمونیاکی در مقایسه با تیمار شاهد، کاهش معنی‌داری نشان داد (۱۳)، ولی تجزیه‌پذیری ماده خشک تغییر نکرد. هیچ گزارشی مبنی بر تأثیر زغال و یا خاکستر فعال بر محیط کشت تهیه شده از مایع شکمبه، تاکنون ارائه نشده است ولی در عین حال، مطالعات انسانی نشان داده که زغال فعال، گاز تولید شده (عمدتاً H<sub>2</sub> و CO<sub>2</sub>) که عمدتاً ناشی از مصرف خانواده بقولات (به‌خاطر وجود دو قند رافینوز و استاکیوز) در روده باریک می‌باشد را کاهش داده که علت آن را مربوط به نقش ممانعت‌کنندگی زغال در تولید باکتری‌ها، و جذب سطحی H<sub>2</sub> و CO<sub>2</sub> عنوان کرده‌اند (۲۴). بنابراین به نظر می‌رسد که بخشی از کاهش تولید گاز ناشی از افزودن خاکستر پوست خرزبه به محیط کشت حال حاضر با فرضیات بالا در تطابق باشد. تحت تأثیر قرار گرفتن فراسنجه‌های تخمیری به‌ویژه تولید تجمعی گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون، قاعدتاً بر روی ME<sup>+</sup> NEL<sup>+</sup> MPY و OMD تأثیرگذار خواهد

قبیل آلودگی‌ها باشد. در مطالعه‌ای استفاده از خاک اره درخت بلوط در آب آلوده به رنگ کریستال ویولت، منجر به حذف کارآمد آن شد (۳). عموماً در فرآیند جذب سطحی، یک ماده جامد با خاصیت جذب مواد، به محیط‌های آلوده به رنگ‌های مختلف اضافه شده که در نهایت منجر به حذف رنگ از آب از طریق تشکیل پیوندهای فیزیکی و شیمیایی می‌گردد، بنابراین بسیاری از جاذب‌های سطحی ارزان‌قیمت با هدف حذف رنگ استفاده شده است که از آن جمله می‌توان به استفاده از پوست موز، کاه برنج، دانه‌های پاپایا، پوست پرتقال، خاک اره، پوسته گندم و سیوس اشاره نمود (۱۸). با این وجود هنوز هم نیاز به شناسایی و ارائه جاذب‌هایی می‌باشد که علاوه بر ارزان و در دسترس بودن، کارآمدی لازم را در حذف رنگ نیز داشته باشند. در آزمایش ما سعی شده بود تا از جاذب‌های ارزان قیمت در حذف رنگ استفاده شود و نتایج نیز مؤید کارآمدی هر دو جاذب خاکستر پوست خرزبه و بنتونیت سدیم در حذف رنگ بوده به‌طوری‌که بنتونیت سدیم و خاکستر تهیه شده از پوست خرزبه هر کدام در سطح چهار درصد قادر به حذف کارآمد رنگ (در غلظت ۹ پی‌پی‌ام) به‌میزان ۹۶/۲ و ۶۷/۷۵ (به‌ترتیب برای بنتونیت سدیم و خاکستر پوست خرزبه) درصد در زمان ۳ ساعت انکوباسیون و ۹۳/۵۴ و ۹۴/۳۸ درصد (به‌ترتیب) در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون بود. همچنین به‌نظر می‌رسد یکسری فعل و انفعالاتی در خاکستر پوست خرزبه رخ می‌دهد که در زمان‌های بالاتر انکوباسیون قادر به جذب بیشتر رنگ خواهد بود که این آزمایش نیز خاکستر تهیه شده از پوست خرزبه در زمان‌های بالاتر انکوباسیون قادر به جذب بیشتر رنگ به‌ویژه در غلظت‌های بالاتر آن (۹ پی‌پی‌ام) بوده است. افزایش مقدار خاکستر به آب آلوده با رنگ کریستال ویولت، منجر به افزایش درصد جذب رنگ شد (۱۸) که به‌نظر می‌رسد با افزایش غلظت جاذب در محیط، تعداد سایت‌های جذبی پذیرای رنگ افزایش یافته و در نتیجه منجر به حذف بیشتر رنگ خواهد شد. نتیجه مطالعه‌ای نشان داد که کاه جو فرآوری شده می‌تواند با راندمان بالایی باعث حذف رنگ از محیط آب گردد (۴). همچنین در این مطالعه (۴) مشخص گردید که با افزایش غلظت رنگ در آب، راندمان جذب کاهش می‌یابد که شکل ۱ در مطالعه حاضر به‌ویژه در غلظت ۹ پی‌پی‌ام نیز مؤید این مطلب می‌باشد. در مطالعه دیگری نیز مشخص شد که پوسته برنج فرآوری شده با هیدروکسید سدیم، قابلیت جذب مطلوب رنگ کریستال ویولت را به‌میزان ۴۴/۸۷ میلی‌گرم به ازای هر گرم جاذب، دارا می‌باشد (۸).

در مطالعه ما، مشخص شد که افزودن رنگ کریستال ویولت از صفر به ۶ پی‌پی‌ام منجر به کاهش معنی‌دار پتانسیل تولید گاز و تولید تجمعی گاز در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون شده و نیز مؤید این مطلب است که فرآیند تخمیر میکروارگانیسم‌های محیط کشت، تحت تأثیر رنگ کریستال ویولت در محیط کشت قرار گرفته است. هنوز گزارشی در خصوص تأثیر کریستال ویولت بر محیط کشت تهیه شده از مایع شکمبه گزارش نشده است ولی در برخی از مطالعات، اثرات باکتری‌کشی این رنگ در سایر محیط‌های آزمایشگاهی به اثبات رسیده است. معمولاً اکثر رنگ‌های شیمیایی تولید شده، دارای ساختار کمپلکسی پیچیده آروماتیکی بوده که وقتی در محیط وارد می‌شوند، به‌راحتی تجزیه نمی‌گردند و نیز گزارش شده که این رنگ برای سلول‌های اغلب پستانداران، خاصیت موتاژنیک

خریزه منجر به حذف کارآمد رنگ کریستال ویولت از محیط آب شد اما استفاده از آن‌ها در محیط کشت نه تنها نتوانست از اثرات منفی کریستال ویولت بر محیط کشت بکاهد بلکه منجر به کاهش برخی از پارامترهای تخمیری مورد مطالعه در این آزمایش شدند. همچنین با بررسی نتایج این آزمایش، به نظر می‌رسد سطح ۳ و ۶ پی‌پی‌ام رنگ کریستال ویولت بیشترین تأثیر منفی را بر پارامترهای تخمیری محیط کشت گذاشته، هر چند که در بیشتر پارامترهای مورد مطالعه در این پژوهش (به‌غیر از تولید تجمعی گاز در زمان ۱۲ ساعت انکوباسیون و ثابت نرخ تولید گاز) اختلاف معنی‌داری بین سطوح ۶ و ۹ پی‌پی‌ام رنگ مشاهده نشد.

### تشکر و قدردانی

مقاله‌ی حاضر نتایج طرح تحقیقاتی مصوب در کمی‌ته‌ی پژوهشی مجتمع آموزش عالی تربت جام با کد ۱۳۹۶۱TP در بهار سال ۱۳۹۶ می‌باشد لذا نویسندگان مقاله، از مجتمع آموزش عالی تربت جام جهت حمایت‌های مالی از این طرح، کمال تشکر و قدردانی را دارند. از گروه ویوان نیز بخاطر در اختیار قرار دادن محصول تجاری‌شان به نام بنتوفید، تقدیر و تشکر می‌گردد.

### منابع مورد استفاده

1. Aghashahi, A. R., A. Nikkhah, S. A. Mirhadi, M. Zahedifar and H. Mansouri. 2006. Effect of different level of unprocessed bentonite, processed bentonite, and clinoptilolite of different rumen degradable protein level, on ammonia concentration, soluble and digestible protein (*In-vitro*). *Pajouhesh and sazanegi* 70: 80-90. (In Farsi).
2. Ali, H. 2010. Biodegradation of Synthetic Dyes-A Review. *Water Air Soil Pollution* 213: 251-273.
3. Aljeboree, A. M. 2016. Adsorption of crystal violet dye by fugas sawdust from aqueous solution. *International Journal of ChemTech Research* 9: 412-423.
4. Amoei, A., H. A. Asgharnia, K. Karimian, Y. Mahdavi, D. Balarak and S. M. Ghasemi. 2014. Efficiency of response surface methodology for optimizing removal of crystal violet (CV) from aqueous solutions by modified barley straw. *Journal of Environmental Health Engineering* 2: 65-75.
5. Bach, A., S. Calsamiglia and M. D. Stern. 2005. Nitrogen Metabolism in the Rumen. *Journal of Dairy Science* 88: (E. Suppl.): E9-E21.
6. Barnett, A. J. G., and R. Reid. 1957. Studies on the production of volatile fatty acids from artificial rumen. 1. Volatile fatty acids production from fresh grasses. *Journal of Agriculture Science* 48: 315-321.
7. Casas, N., T. Parella, T. Vicen, G. Caminal and M. Sarra. 2009. Metabolites from the biodegradation of triphenylmethane dyes by *Trametes versicolor* or laccase. *Chemosphere* 75: 1344-1349.

بود چرا که کلیه این پارامترها بر اساس گاز تولید شده در زمان ۲۴ ساعت انکوباسیون تخمین زده شدند. از سال‌های متعددی از کریستال ویولت به‌صورت تجویز خوراکی برای درمان کرم‌های انگلی و سایر بیماری‌ها به‌دلیل ویژگی متمایز آن در کنترل قارچ‌ها، استفاده می‌شده است (۷). نتایج برخی از مطالعات نشان داده که آنزیم‌های لیگنولیتیک موجود در قارچ‌ها قابلیت تغییر ساختار هیدروکربن‌های موجود در حلقه آروماتیک اکثر رنگ‌های شیمیایی را دارا می‌باشند (۲۶). در مطالعه دیگری نیز مشخص گردید که گونه قارچ *Phanerochaete chrysosporium* قابلیت تجزیه برخی از رنگ‌های شیمیایی و رنگ‌های پلیمری را دارا می‌باشد (۱۵). شکمبه به‌عنوان یک محفظه تخمیری ضروری، قادر به تولید محصولات نهایی تخمیر از قبیل اسیدهای چرب فرار، نیتروژن آمونیاکی و پروتئین میکروبی برای برطرف کردن نیازهای انرژی و پروتئینی حیوان میزبان خواهد بود (۲۹) بنابراین به‌نظر می‌رسد هر گونه تغییر در شرایط زندگی میکروارگانیسم‌ها و پتانسیل تولید گاز در محیط کشت، می‌تواند الگوی تخمیر و حتی pH شکمبه را دستخوش تغییرات جدی نماید. ولی در مطالعه ما افزودن بنتونیت سدیم، خاکستر پوست خریزه و یا کریستال ویولت هر کدام به‌تنهایی یا همراه با رنگ مورد مطالعه، تأثیری بر pH محیط کشت نداشت. گزارش شده است که بنتونیت می‌تواند الگوی تخمیر شکمبه‌ای را از طریق کاهش نسبت اسید پروپیونیک به اسید استیک تغییر داده و نیز ممکن است به‌عنوان یک بافر از کاهش ناگهانی pH شکمبه جلوگیری کند (۲۵). کاربرد ۲ درصد بنتونیت فرآوری شده یا نشده و یا کولینوپتیولیت، تأثیری بر غلظت نیتروژن آمونیاکی حاصل از سطوح مختلف پروتئین قابل تجزیه در شکمبه نداشت، اما کاربرد ۴ درصد بنتونیت، به‌طور مؤثری غلظت نیتروژن آمونیاکی را خصوصاً در ساعات اولیه پس از انکوباسیون کاهش داد، که این اثر با بالا رفتن میزان تجزیه‌پذیری پروتئین افزایش یافت (۱). همچنین بنتونیت سبب متعادل شدن غلظت آمونیاک محیط شکمبه نیز می‌گردد (۱). کاربرد سه نوع بنتونیت مختلف در جیره گوسفندان، تأثیر معنی‌داری بر تولید پشم، غلظت آمونیاک شکمبه، وزن زنده حیوان و غلظت اسیدهای چرب فرار موجود در شکمبه نداشت (۲۱). اگر چه که بر اساس مطالعات مختلف بنتونیت باعث کاهش نیتروژن آمونیاکی می‌گردد ولی در مطالعه حاضر اضافه کردن بنتونیت در مقایسه با شاهد تأثیری بر نیتروژن آمونیاکی محیط کشت نداشت. متابولیسم و تجزیه‌پذیری پروتئین در شکمبه می‌تواند تحت تأثیر فعالیت‌های متابولیسمی میکروارگانیسم‌های موجود در شکمبه، pH و جمعیت میکروبی غالب در شکمبه قرار بگیرد (۵) بنابراین در مطالعه حاضر به‌نظر می‌رسد که محیط پیرامون و یا جمعیت میکروارگانیسم‌های محیط کشت در اثر اضافه شدن کریستال ویولت به آن دستخوش تغییراتی شده که این تغییرات منجر به کاهش سطح آمونیاک تولیدی شده است.

### نتیجه‌گیری

افزودن رنگ کریستال ویولت به‌ویژه در سطوح ۳ و ۶ پی‌پی‌ام منجر به کاهش فراسنجه‌های تولید گاز، کلیه پارامترهای تخمین زده شده از تولید گاز (جدول ۲)، کل اسیدهای چرب فرار و نیتروژن آمونیاکی در این پژوهش شد. اگر چه که کاربرد دو جاذب بنتونیت سدیم و خاکستر پوست

8. Chakraborty, S., S. Chowdhury and P. D. Saha. 2011. Adsorption of crystal violet from aqueous solution onto NaOH-modified rice husk. *Carbohydrate Polymers* 86: 1533-1541.
9. Cheriaa, J., and A. Bakhrouf. 2009. Triphenylmethanes, malachite green and crystal violet dyes decolourisation by *Sphingomonas paucimobilis*. *Annals of Microbiology* 59: 57-61.
10. Czerkawski, J. W. 1986. An introduction to rumen studies. Pergamon Press. Oxford. New York.
11. Fessard, V., T. Godard, S. Huet, A. Mourot and J. M. Poul. 1999. Mutagenicity of malachite green and leucomalachite green *in vitro* tests. *Journal of Applied Toxicology* 19: 421-430.
12. Kazemi, M., A. Eskandary Torbaghan, A. M. Tahmasbi, R. Valizadeh, and A. A. Naserian. 2017. Effects of phosalone consumption via feeding with or without sodium bentonite on performance, blood metabolites and its transition to milk of Iranian Baluchi sheep. *Journal of Animal Science and Technology* 59: 1-11.
13. Kazemi, M., A. M. Tahmasbi, R. Valizadeh, A. A. Naserian, R. Afshari and A. Sonei. 2013. Effect of phosalone as an organophosphate pesticide with different levels of bentonite on fermentation parameters of a TMR ration according to *in vitro* condition. *Iranian Journal of Applied Animal Science* 5: 201-209. (In Farsi).
14. Kazemi, M., M. Khabbaz Sirjani, A.M. Tahmasbi, E. Ibrahim Khoram Abadi and A. Eskandary Torbaghan. 2017. Effects of sodium and calcium bentonite on growth performance and rumen ammonia in Holstein bulls. *Livestock Research for Rural Development* 29 (8). Available online at: <http://www.lrrd.org/lrrd29/8/phd29144.html>, Accessed 8 May 2018.
15. Kirby, N., G. McMullan and R. Marchant. 1995. Decolorization of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biotechnology Letters* 17: 761-764.
16. Komolong, M. K., D. G. Barber and D. M. McNeill. 2001. Post-ruminal protein supply and N retention of weaner sheep fed on a basal diet of lucerne hay (*Medicago sativa*) with increasing levels of quebracho tannins. *Animal Feed Science and Technology* 92: 59-72.
17. Menke, K. H., and H. Steingass. 1988. Estimation of the energetic feed value obtained from chemical analysis and *in vitro* gas production using rumen fluid. *Animal Research and Development* 28: 7-55.
18. Mittal, M., J. Mittal, A. Malviya, D. Kaur and V. K. Gupta. 2010. Adsorption of hazardous dye crystal violet from wastewater by waste materials. *Journal of Colloid and Interface Science* 343: 463-473.
19. Mohanty, K., J. T. Naidu, B. C. Meikap and M. N. Biswas. 2006. Removal of crystal violet from wastewater by activated carbons prepared from rice husk. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45: 5165-5171.
20. Mousavi, S. A., M. Khashij and P. Shahbazi. 2016. Adsorption isotherm study and factor affected on methylene blue decolorization using activated carbon powder prepared grapevine leaf. *Journal of Safety Promotion and Injury Prevention* 3: 249-256. (In Farsi).
21. Murray, P. J., Rowe, J. B. and Aitchison, E. M., 1990. The effect of bentonite on wool growth, liveweight change and rumen fermentation in sheep. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 30: 39-42.
22. NRC. 2007. Nutrient Requirements of Small Ruminants: Sheep, Goats, Cervids, and New World Camelids. 6rd ed. Washington: National Academy Press.
23. Ørskov, E. R., and I. McDonald. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *Journal of Agricultural Science* 92: 499-503.
24. Potter, T., C. Ellis and M. Levitt. 1985. Activated charcoal: *In vivo* and *in vitro* studies of effect on gas formation. *Gastroenterology* 88: 620-624.
25. Rindsig, R. B., L. H. Schultz and G. E. Shook. 1969. Effects of the addition of bentonite to high-grain dairy rations which depress milk fat percentage. *Journal of Dairy Science* 51: 1770-1775.
26. Shin, K. S., I. K. Oh and C. J. Kim. 1997. Production and purification of Remazol Brilliant Blue R decolorization peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1744-1748.
27. Singh, K., and S. Arora. 2011. Removal of synthetic textile dyes from wastewaters: A critical review on present treatment technologies. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 41: 807-878.
28. Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48: 185-197.
29. Wanapat, M. 2000. Rumen manipulation to increase the efficient use of local feed resources and productivity of ruminants in the tropics. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences Supplement* 13B: 59-67.
30. Zhou, W., and W. Zimmermann. 1993. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 107: 157-162.

