

اثر باکتری *Cellulomonas uda* بر تخمیر و ترکیب شیمیایی ذرت علوفه‌ای

ابراهیم روغنی حقیقی فرد^۱

چکیده

به منظور بررسی سطوح مختلف باکتری *Cellulomonas uda* بر روند تخمیر و ترکیب شیمیایی، گیاه کامل ذرت به مدت ۶۰ روز در سیلوهای کوچک ۷۰ گرمی سیلوگردید. در یک طرح کاملاً تصادفی، سه عدد سیلو از گروه تیمار ۱ (بدون باکتری) و تیمارهای ۲ و ۳ (به ترتیب $1/2 \times 10^5$ و $2/4 \times 10^5$ واحد تشکیل کلنی یا CFU، به ازای هر گرم گیاه تازه) در سومین و شصتمین روز بعد از سیلو کردن باز شدند. معیارهای مورد اندازه‌گیری عبارت بود از: ماده خشک، اسیدیته، ماده آلی، کربوهیدرات‌های محلول در آب، پروتئین خام، دیواره سلولی (NDF)، دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF)، همی سلولز، سلولز، سلولز و ازت آمونیاکی. افزودن باکتری در هر دو سطح باعث افزایش معنی‌دار اسیدیته سیلاژها در روز سوم گردید ($P < 0/05$). اسیدیته نهایی علوفه سیلو شده با بیشترین غلظت باکتری، به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیشتر بود، که احتمالاً نشان دهنده افزایش شدت تخمیر کربوهیدرات‌های ناشی از تجزیه سلولز در این سیلوهاست. با افزودن باکتری، میزان قندهای محلول در آب باقی مانده نهایی، به طور غیر معنی‌داری افزایش یافت. میزان ازت آمونیاکی نهایی همه سیلاژها کمتر از ۸ درصد ازت کل، و در تیمارهای ۲ و ۳ از این هم کمتر بود. افزودن باکتری باعث کاهش میزان دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF) به میزان $1/8$ و $11/9$ درصد، به ترتیب در تیمارهای ۲ و ۳ گردید. میزان دیواره سلولی در تیمارهای ۱ و ۳ افزایش، و در تیمار ۲ حدود $3/6$ گرم در هر کیلوگرم ماده خشک کاهش نشان داد. میزان همی سلولز در همه تیمارها افزایش داشت، اما میزان سلولز در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب $9/38$ ، $17/37$ و $12/49$ درصد کاهش یافت. به طور خلاصه، افزودن باکتری *Cellulomonas uda* در سطح $1/2 \times 10^5$ CFU به ازای هر گرم گیاه تازه در افزایش قندهای محلول در آب باقی مانده، کاهش دیواره سلولی و هیدرولیز سلولز از گیاه کامل ذرت مؤثر است.

واژه‌های کلیدی: *Cellulomonas uda*، گیاه کامل ذرت، قندهای محلول در آب، سلولز، دیواره سلولی

مقدمه

آزمایش‌های زیادی روی عوامل مؤثر بر کیفیت علوفه سیلو ثابت، و تهیه سیلو با کیفیت عالی و با حداقل کاهش مواد شده انجام گرفته است (۲۲). برای ایجاد یک تخمیر خوب و غذایی، از مواد افزودنی زیادی استفاده شده است. از طرف

۱. استادیار تغذیه دام، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

دیگر، مواد گیاهی دارای میزان قابل توجهی دیواره سلولی هستند که عامل محدود کننده میزان مصرف ماده خشک است (۲۰). ولی این مواد خود دارای ارزش غذایی زیادی در تغذیه دام می‌باشند. گیاه ذرت علوفه‌ای برای تولید یک تخمیر خوب به مقدار کافی کربوهیدرات محلول دارد، اما دارای مقدار زیادی فیبر نیز می‌باشد. با استفاده از آنزیم‌های تجزیه کننده فیبر دیواره سلولی، می‌توان مصرف ماده خشک را افزایش داده و ارزش غذایی آن را بهبود بخشید (۲۱).

استفاده از آنزیم‌های مختلف (از جمله سلولاز و همی سلولاز)، کربوهیدرات‌های دیواره سلولی گیاه را شکسته و قندهای محلول را آزاد می‌کند، که مورد استفاده باکتری‌های موجود در توده سیلو قرار گرفته و تولید اسید لاکتیک می‌کنند. در نتیجه شدت تخمیر در سیلو افزایش یافته، موجب ثبات سیلو می‌شود، و میزان فیبر گیاه کاهش می‌یابد (۱، ۵، ۱۱، ۱۳، ۱۴، ۱۶ و ۱۹). مزیت دیگر تجزیه و آزاد شدن قندهای محلول قابل تخمیر، افزایش قابلیت دسترسی مواد غذایی در شکمبه برای میکروارگانیسم‌ها (۱۰) و افزایش قابلیت هضم است (۵) و (۲۰). در سیستم تغذیه‌ای ایران، که بخش عمده مواد غذایی دام‌ها را علوفه‌های خشبی با مقدار زیادی مواد فیبری تشکیل می‌دهد، استفاده از آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی موجب بهبود کیفیت جیره، تجزیه فیبر خام، استفاده بهینه از منابع غذایی موجود و نهایتاً افزایش تولیدات دامی می‌گردد. تولید و تهیه این نوع میکروارگانیسم‌ها به صورت محلول یا پودر آماده مصرف، در ایران امکان پذیر بوده و کاربرد آنها توسط دامداران آسان و بی‌خطر است. هدف از انجام آزمایش حاضر، مطالعه اثر باکتری سلولولیتیک *Cellulomonas uda* (۳) بر ترکیب شیمیایی و میزان فیبر ذرت سیلو شده در مقیاس آزمایشگاهی است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، با استفاده از محلول غلیظ باکتری *Cellulomonas uda* که از مرکز کلکسیون

قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شده بود، اجرا گردید. آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. ترکیب شیمیایی مواد گیاهی تازه و سیلاژ آن در صفر، ۳ و ۶۰ روز بعد از سیلو کردن تعیین گردید.

گیاه تازه ذرت علوفه‌ای با حدود ۲۰٪ ماده خشک کاملاً خرد شد. سپس محلول رقیق شده باکتری به میزان صفر، $1/2 \times 10^5$ و $2/4 \times 10^5$ باکتری به ازای هر گرم گیاه تازه اضافه و به ترتیب تیمارهای ۱، ۲ و ۳ نامیده شدند. محلول باکتری با گیاه به خوبی مخلوط و حدود ۷۰ گرم از هر تیمار در استوانه‌های پلاستیکی به حجم ۱۰۰ میلی لیتر سیلو گردید (سه عدد سیلو برای هر تیمار و برای هر روز باز کردن سیلو، جمعاً ۱۸ عدد سیلو). برای جلوگیری از آلودگی با باکتری، ابتدا سیلوهای تیمار ۱ پر شد. میزان آبی که برای رقیق کردن محلول غلیظ باکتری مصرف شده بود به سیلوهای تیمار ۱ اضافه شد. درب سیلوها با درپوش لاستیکی، که در انتها دارای سوراخی برای خارج شدن گازها بود، بسته شد و به مدت ۶۰ روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

در روزهای ۳ و ۶۰، تعداد سه سیلو از هر تیمار تخلیه و محتویات آنها به خوبی مخلوط شد. ده گرم از گیاه تازه یا سیلاژ، با ۱۰۰ سی سی آب مقطر به مدت یک دقیقه در مخلوط کن به هم زده شد و با دو لایه پارچه ملول صاف گردید. pH هر نمونه بلافاصله توسط pH متر با استفاده از عصاره گیاه تعیین گردید (۶). برای اندازه گیری ازت آمونیاکی، به دو سی سی عصاره گیاه، اسید کلریدریک ۶ نرمال اضافه شد، و تا زمان اندازه گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید (۱۸).

ماده خشک گیاه و سیلو با استفاده از آون و در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت اندازه گیری شد. سپس نمونه‌ها آسیاب شده، و مقادیر دیواره سلولی (۲۴)، دیواره سلولی بدون همی سلولز (۲۳)، لیگنین (۹)، ماده آلی با سوزاندن نمونه خشک در ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد برای مدت چهار ساعت، و پروتئین خام ($N \times 6/25$) بعد از اندازه گیری

کاهش pH و شدت تخمیر بیشتر است. در روز ۶۰، pH تیمار ۳ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کمتر از بقیه، و در تیمار ۲ به طور غیر معنی‌داری کمتر از تیمار ۱ بود. میزان کاهش pH در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ بین روزهای صفر و ۶۰، به ترتیب ۱/۱۱، ۱/۳۸ و ۱/۴ واحد بود. این میزان کاهش بیانگر اثر بیشتر تیمار ۳ (باکتری زیادتر) بر شدت تخمیر (بر اثر تولید اسیدهای فرار بیشتر) نسبت به بقیه تیمارها (۱ و ۲) و اثر مثبت باکتری افزوده شده بر شدت و سرعت کاهش pH و تثبیت سریع‌تر سیلوها، و جلوگیری از فعالیت میکروارگانیسم‌های نامطلوب است.

در هر سه تیمار میزان کربوهیدرات محلول در آب گیاه تازه، بیشتر از حداقل مورد نیاز (۱۲٪) برای یک تخمیر مطلوب بود (۲۰). در روز سوم، میزان کربوهیدرات محلول در آب باقی مانده در تیمار ۳، به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بیش از بقیه تیمارها، و در تیمار ۲ به طور عددی بالاتر از تیمار ۱ بود. این روند نشان می‌دهد که با مصرف کمتر قند، pH در روز سوم در تیمار ۳ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کمتر از تیمار ۱ شد، که می‌تواند در اثر تجزیه بیشتر دیواره سلولی توسط باکتری باشد (۲۱). در شصتمین روز، میزان کربوهیدرات محلول در آب باقی مانده در تیمار ۲ بیشتر از بقیه تیمارها، و در تیمار ۳ بیش از تیمار ۱ بود، ولی اختلاف بین میانگین‌ها معنی‌دار نبود. با توجه به pH نهایی کمتر در تیمار ۳ نسبت به بقیه، چنین استنباط می‌شود که کربوهیدرات محلول بیشتری برای کاهش pH مصرف شده، بنابراین، با افزایش تعداد باکتری در تیمار ۳ روند تخمیر تغییر، و شدت تخمیر افزایش یافته است. این روند بر خلاف مشاهدات هندرسون و همکاران (۱۲) است، ولی با مشاهدات استوکس (۲۰) مطابقت دارد.

در روز صفر، ماده آلی در تیمار ۳ بیش از بقیه و در تیمار ۲ بیش از تیمار ۱ بود. در روز ۶۰ ماده آلی در تیمار ۳ اندکی از تیمار ۲ بیشتر، و کمتر از تیمار ۱ بود. کاهش ماده آلی در تیمار ۲ در روز ۶۰ بیشتر از بقیه تیمارها بود، ولی این اختلافات از نظر آماری معنی‌دار نبود.

میزان ازت کل (۴) تعیین گردید. میزان همی سلولز از تفاضل دیواره سلولی (NDF) و دیواره سلولی بدون همی سلولز (ADF)، و سلولز از تفاضل ADF و لیگنین (ADL) تعیین شد. با استفاده از عصاره گیاه، میزان کربوهیدرات‌های محلول در آب مشخص گردید (۷ و ۱۷). به علت مهم نبودن و عدم تغییر سریع در روز سوم، تجزیه شیمیایی مواد برای اندازه‌گیری ماده آلی، پروتئین خام، دیواره سلولی، دیواره سلولی بدون همی سلولز و ازت آمونیاکی انجام نشد. اما چون هدف اصلی بررسی روند تغییرات تخمیر بود، تجزیه شیمیایی برای ماده خشک، اسیدیته و کربوهیدرات‌های محلول صورت گرفت.

داده‌های حاصل با استفاده از نرم‌افزار مینی‌تب^۱ تجزیه آماری شد و آزمون توکی برای مقایسه میانگین‌هایی که در سطح ۵٪ معنی‌دار بودند، مورد استفاده قرار گرفت (۸).

نتایج و بحث

جدول ۱ خصوصیات تخمیر و میزان فیبر خام گیاه تازه و سیلاژ ذرت علوفه‌ای را پس از ۶۰ روز تخمیر نشان می‌دهد. کیفیت کلیه سیلاژها از نظر رنگ، بو و بافت پس از ۶۰ روز خوب و قابل قبول بود. در روز صفر اختلاف معنی‌داری بین میانگین‌ها برای ماده خشک، اسیدیته، ماده آلی، پروتئین خام، دیواره سلولی، دیواره سلولی بدون همی سلولز، سلولز، همی سلولز و کربوهیدرات‌های محلول در آب مشاهده نشد.

میانگین ماده خشک در روز صفر برای تیمارها مشابه، اما در روزهای ۳ و ۶۰، در تیمار ۳ کمتر از بقیه بود، که نشان دهنده شدت تخمیر در این تیمار است.

pH گیاه تازه ذرت مطلوب (حدود ۵) بود، که کمتر از pH مورد انتظار برای یونجه است (۲۱). اختلاف بین میانگین معیارهای مختلف در روز صفر (گیاه تازه) معنی‌دار نبود. روز سوم، pH تیمارهای ۲ و ۳ به طور معنی‌داری ($P < 0/05$) کمتر از تیمار ۱ بود، ولی بین تیمارهای مذکور اختلاف معنی‌دار مشاهده نشد. این اختلاف نشان دهنده اثر باکتری‌ها در سرعت

جدول ۱. خصوصیات تخمیر و میزان فیبر خام گیاه تازه و سیلاژ ذرت علوفه‌ای (گرم در هر کیلوگرم ماده خشک) پس از ۶۰ روز تخمیر

تیمار	ماده خشک (%)	pH	ماده آلی هیدرات‌های کربو پروتئین	دیواره سلولی بدون همی سلولز	دیواره سلولی همی سلولز	ازت آمونیاکی
تیمار ۱	۲۰/۷۰	۴/۹۴ ^a	۱۵۹/۴۳ ^a	۷/۸ ^a	۵۴۳/۳۳ ^a	۲۲۰ ^a
تیمار ۲	۲۰/۶۰	۵/۰۳ ^a	۱۵۳/۸۰ ^a	۷/۷۴ ^a	۵۶۰/۶۷ ^a	۳۷۷ ^a
تیمار ۳	۲۰/۶۷	۴/۹ ^a	۱۵۱/۶۰ ^a	۷/۸۹ ^a	۵۵۳/۳۳ ^a	۳۴۰ ^a
اشتباه معیار مشترک ^۴	۰/۲۳	۰/۰۴۳۲	۱/۸۹	۳/۵	۲/۴۹	۳۰/۹۱
روز ۳						
تیمار ۱	۲۱/۳۲	۴/۴۷ ^b	۱۴/۸۶ ^a	ت	ت	ت
تیمار ۲	۲۰/۶۲	۴/۱۸ ^a	۱۶/۰۴ ^a	ت	ت	ت
تیمار ۳	۱۹/۳۵	۴/۱۹ ^a	۳۰/۰۵ ^b	ت	ت	ت
اشتباه معیار مشترک	۱/۰۹	۰/۰۸۹	۲/۸۵	-	-	-
روز ۶۰						
تیمار ۱	۲۰/۵۷	۳/۸۳ ^b	۳۸/۰۱ ^a	۶/۶۸ ^a	۵۸۷/۶۷ ^a	۲۹۰/۰ ^a
تیمار ۲	۲۰/۳۷	۳/۶۵ ^b	۸۹/۷۱ ^a	۶/۷۷ ^a	۵۵۷/۰۷ ^a	۳۱۱/۵۳ ^a
تیمار ۳	۱۹/۸۷	۳/۵ ^a	۳۸/۸۰ ^a	۶/۲۸ ^a	۵۷۳/۳۳ ^a	۲۹۷/۵۷ ^a
اشتباه معیار مشترک	۲/۴۹	۰/۱۰۴۷	۱/۳۰	۷/۸۴	۴۹/۷۱	۱۸/۶۹

۱. بدون باکتری

۲. دارای $1/2 \times 10^5$ باکتری در هر گرم ماده تر گیاه

۳. دارای $2/4 \times 10^5$ باکتری در هر گرم ماده تر گیاه

۴. Pooled standard error از جدول ANOVA

a و b: میانگین‌های هر ستون در هر روز با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار هستند ($P < 0/05$). ارقام تجزیه شده میانگین آزمایش‌های سه

تکراری برای هر فاکتور است.

ت: تعیین نشده

افزایش به ترتیب ۳۴/۳۴، ۴۶/۷۴ و ۲۶/۶۶ گرم در هر کیلوگرم ماده خشک در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ است که می‌تواند به علت کاهش ماده خشک در طول سیلو کردن باشد.

در روز صفر میزان سلولز در تیمار ۱ کمتر و در ۲ بیشتر از بقیه بود. میزان کاهش سلولز بین روز صفر و ۶۰ برای تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۳۰، ۴۷/۶۵ و ۴۳/۴۲ گرم در ماده خشک بود. به عبارت دیگر، میزان سلولز در تیمارهای ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۹/۳۸، ۱۷/۳۷ و ۱۲/۴۸ درصد کاهش نشان داد، گرچه اختلاف بین میانگین‌ها معنی‌دار نبود. آتری و همکاران (۲) از آزمایش خود با علوفه ذرت عمل آورده شده با آنزیم سلولاز، تا ۱۳ درصد کاهش سلولز را پس از یک سال سیلو کردن گزارش کردند، که با نتایج آزمایش حاضر در مورد تیمارهای ۲ و ۳ هماهنگی دارد. از طرف دیگر، چن و همکاران (۶) گزارش کردند که آنزیم سلولاز روی فیبر گیاه ذرت هیچ اثری ندارد، که با نتایج این آزمایش مغایرت دارد. البته مقایسه نتایج مطالعه با گیاهانی که با آنزیم تیمار می‌شوند، به علت تفاوت پیچیده بین آنزیم‌ها، تفاوت در فعالیت آنها و اثر متقابل بین ماده خشک، رسیدگی گیاه و گونه‌های گیاهی مشکل است (۱۵). از آن‌جا که به طور سنتی میزان انرژی علوفه یا سیلو بر اساس میزان دیواره سلولی بدون همی سلولز آنها و از طریق فرمول محاسبه می‌گردد (۱۸)، و میزان فیبر دیواره سلولی عامل محدود کننده مصرف ماده خشک است (۲۱)، بنابراین، سیلویی که با آنزیم یا باکتری تولید کننده آنزیم سلولاز تیمار شده است میزان فیبر نهایی کمتری خواهد داشت، در نتیجه میزان انرژی محاسبه شده بیشتری را به دست می‌دهد. لذا، می‌توان از میزان انرژی کنسانتره جیره کاست، و جیره‌ای ارزان‌تر، با میزان مصرف بیشتر، و ارزش غذایی بهتر تهیه نمود، که بتواند در روند تخمیر شکمبه و تولید دام اثر مثبتی داشته باشد.

نتیجه‌گیری

با اتکا به پژوهش حاضر، استفاده از باکتری سلولولیتیک *Cellulomonas uda* در هر دو سطح غلظت برای گیاه ذرت

در روز ۶۰ میزان ازت آمونیاکی در تیمار ۲ کمتر از بقیه و در تیمار ۳ کمتر از تیمار ۱ بود، ولی اختلاف بین میانگین‌ها معنی‌دار نبود. میزان ازت آمونیاکی در روز ۶۰، در هر سه تیمار کمتر از ۸٪ ازت کل بود، که نشان دهنده تخمیر خوب و تجزیه کمتر پروتئین است. این نشان می‌دهد که تیمار ۲ در کاهش تجزیه پروتئین توانایی بیشتری داشته، و سیلاژی با کیفیت بهتر تولید نموده است. میزان پروتئین خام در هر ۳ تیمار نسبت به گیاه تازه کاهش نشان داد، اگر چه اختلاف بین میانگین‌ها معنی‌دار نبود.

در روز صفر و ۶۰، اختلاف میانگین میزان دیواره سلولی بین تیمارها معنی‌دار نبود. روز ۶۰، میزان دیواره سلولی در تیمار ۱ و ۳ افزایش و فقط در تیمار ۲ کاهش یافت (۳/۶ گرم در کیلوگرم ماده خشک، بین روز صفر و ۶۰). روز ۶۰، در تیمار ۲ میزان کربوهیدرات محلول باقی مانده بیشترین، میزان دیواره سلولی کمترین، و میزان کاهش سلولز بیشترین (۶۵/۴۷ گرم در کیلوگرم ماده خشک، روز ۶۰ نسبت به روز صفر) مقدار بود، که نشان دهنده فعالیت تجزیه دیواره سلولی بیشتر در این تیمار در اثر فعالیت باکتری در شرایط آزمایش است.

مقایسه میزان دیواره سلولی بدون همی سلولز بین تیمارها در روز صفر، مبین افزون‌تر بودن تیمار ۲ نسبت به بقیه تیمارها بود. در روز ۶۰ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر میزان دیواره سلولی بدون همی سلولز وجود نداشت، ولی در مقایسه بین تیمارهای مشابه بین روز صفر و روز ۶۰، تفاوت‌هایی به شرح زیر مشاهده گردید: افزایش در تیمار ۱ به میزان ۱۰ گرم (۳۴۰-۳۵۰) و کاهش در تیمارهای ۲ و ۳ به ترتیب به میزان ۵۰/۳۴ (۳۷۳/۳۳-۴۲۳/۶۷) و ۶/۶۷ (۳۸۰-۳۸۶/۶۷) گرم در کیلوگرم ماده خشک.

هم‌چنین، مقایسه میزان همی سلولز بین تیمارها در روز صفر، نشان‌دهنده زیاد بودن آن در تیمار ۱ و کمتر بودن آن در تیمار ۲ نسبت به بقیه می‌باشد. در روز ۶۰، اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر میزان همی سلولز وجود نداشت، ولی مقایسه بین تیمارهای مشابه در فاصله روز صفر و ۶۰ بیانگر

و از هزینه جیره نیز بکاهد، یعنی انرژی بیشتری در اختیار دام قرار داده و در تولید دام اثر مثبت داشته باشد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه و دانشکده کشاورزی دانشگاه شیراز، به خاطر تأمین اعتبار مالی، و مهندس فخرالدین شهیدیان، به خاطر کمک‌های ایشان تشکر و قدردانی می‌شود.

علوفه‌ای، موجب بهبود تخمیر با توجه به کاهش سریع تر pH سیلو گردید، اگر چه در غلظت بیشتر، pH نهایی کمتری به دست آمد (به علت اسیدهای چرب فرار بیشتر که منبع انرژی برای دام و میکروارگانیسم‌ها هستند). اما استفاده از باکتری در غلظت $1/2 \times 10^5$ واحد تشکیل کلنی به ازای هر گرم گیاه تازه، موجب تجزیه بیشتر فیبر خام گیاه (دیواره سلولی بدون همی سلولز و سلولز) و زیاده‌ترین میزان کربوهیدرات محلول در آب باقی مانده می‌گردد، که می‌تواند خوراکی را با ارزش غذایی بهتر تولید کرده

منابع مورد استفاده

1. Adgola-Bessa, T. 1990. Enzyme treatment of whole-crop wheat silage. Ph. D. Thesis, University of Reading.
2. Autrey, K. M., T. A. McCaskey and J. A. Little. 1975. Cellulose digestibility of fibrous materials treated with *Trichoderma viride* cellulase. J. Dairy Sci. 58: 67-71.
3. Breed, R. S. 1994. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 602-658.
4. Bradstreet, R. B. 1965. The Kjeldahl Method of Organic Nitrogen. Academic Press, New York.
5. Chamberlain, D. G. and S. Robertson. 1992. The effects of the addition of various enzyme mixtures on the perennial ryegrass silage and on its nutritional value for milk production in dairy cows. Anim. Feed Sci. Tec. 37: 257-261.
6. Chen, J., M. R. Stokes and C. K. Wallace. 1994. Effects of enzyme-inoculant systems on preservation and nutritive value of haycrop and corn silage. J. Dairy Sci. 77: 501-507.
7. Deriaz, R. E. 1961. Routine analysis of carbohydrates and lignin in herbage. J. Sci. Agric. 12: 152-160.
8. Fisher, R. A. and F. Yates. 1963. Statistical Tables for Biological, Agricultural and Medical Research. Table III. Oliver and Boyd, Ltd. Edinburgh and London.
9. Goering, H. K. and P. J. Van Soest. 1970. Forage Fiber Analysis. Agric. Handbook No. 379. ARS. USDA, Washington, D. C.
10. Gonzalez-Yanez, M., A. R. Henderson, R. McGinn and W. D. Kerr. 1990. The effect of commercial enzymes of grass cellulase and hemicellulase. Proceedings of the 9th Silage Conference, University of Newcastle upon Tyne. pp. 16-17.
11. Henderson, A. R. and P. McDonald. 1997. The effect of cellulase preparations on the chemical changes during the ensilage of grass in laboratory silos. J. Food and Agric. 28: 486-490.
12. Henderson, A. R., P. McDonald and D. H. Anderson. 1982a. The effect of silage additives containing formaldehyde on the fermentation of ryegrass ensiled at different drymatter levels and upon nutritive value of direct cut silage. Anim. Feed Sci. Tec. 7: 303-314.
13. Henderson, A. R., P. McDonald and D. H. Anderson. 1982b. The effect of a cellulase preparation derived from *Trichoderma viride* on the chemical changes during the ensilage of grass, lucerne and clover. J. Sci. Food Agric. 33: 16-20.
14. Jaakola, S. 1990. The effect of cell wall degrading enzymes on the preservation of grass and on the silage

- intake and digestibility in sheep. J. Scientific and Agric. Soc. Finland 62: 51-62.
15. Kung, L. Jr., B. R. Carmean and R. S. Tung. 1990. Microbial inoculation or cellulase enzyme treatment of barley and vetch harvested at three maturities. J. Dairy Sci. 73: 1304-1309.
 16. McHan, F. 1986. Cellulase-treated coastal bermudagrass silage and production of soluble carbohydrates, silage acids and digestibility. J. Dairy Sci. 69: 431-438.
 17. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. 1979. The Analysis of Agricultural Materials. Second edition.
 18. Sheperd, A. C., M. Maslanka, D. Quinn and L. Kung. 1995. Additives containing bacterium and enzymes for alfalfa silage. J. Dairy Sci. 78: 565-572.
 19. Selmer-Olsen, I., A. R. Henderson, S. Robertson and R. McGinn. 1993. Cell wall degrading enzymes for silages. I. The fermentation of enzyme-treated ryegrass in laboratory silos. Grass and Forage Sci. 48: 45-49.
 20. Stockes, M. R. 1992. Effects of enzyme mixture, an inoculant, and their interaction on silage fermentation and dairy production. J. Dairy Sci. 75: 764-770.
 21. Stockes M. R. and J. Chen. 1994. Effects of an enzyme-inoculant mixture on the course of fermentation of corn silage. J. Dairy Sci. 77: 3401-3409.
 22. Thomas, P. C. and P. P. Thomas. 1985. Factors affecting the intakes of grass silage. *In: Recent Advances in Animal Nutrition*. pp. 223-256. Edited by Haresign and Cole, Butterworths Publication, London.
 23. Van Soest, P. J. 1963. The use of detergents in the analysis of fiber feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin. A. O. A. C. 46: 829-835.
 24. Van Soest, P. J. 1967. The use of detergents in the analysis of fibrous feeds. IV. Determination of plant cell wall constituents. A. O. A. C. 50: 50-55.