اثر افزودن *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹ بر روند تغییرات میکروبی سیلاژ ذرت بعد از قرار گرفتن در معرض هوا

لیلا طاهرآبادی[۱*]، فرخ کفیل زاده[۲]
۱. دانشجوی دوره دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲. استاد، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
* نویسنده مسئول: Email: taherabadi.le@razi.ac.ir

چکیده

پژوهش حاضر به منظور تعیین اثر افزودن *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹ (*Lactobacillus fermentum*) بر روند تغییرات جمعیت میکروبی، pH و دمای سیلاژ ذرت بعد از قرار گرفتن در معرض هوا انجام شد. بعد از استاندارد کردن باکتری، سیلاژها با استفاده از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* به عنوان تلقیح کننده با غلظت ۲×۱۰^{۶} cfu به ازای هر گرم علوفه ذرت تازه (LF) یا بدون تلقیح کننده (کنترل) تهیه شدند. به منظور بررسی پایداری هوازی، بعد از باز کردن سیلو ها، نمونه های سیلاژ در معرض هوا قرار گرفتند و دمای آن ها هر ۵ ساعت یکبار ثبت شد. در روزهای صفر، ۴، ۸ و ۱۲، اندازه گیری pH، جمعیت مخمر و کپک انجام شد. داده های آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه MIXED و به صورت اندازه گیری های تکرار شونده آنالیز شد. جمعیت مخمر، کپک و pH سیلاژ کنترل و LF بعد از قرار گرفتن در معرض هوا تا رسیدن به حداکثر مقدار در روز ۱۲ افزایش مستمر داشت ($P<۰/۰۵$). اختلاف معنی داری بین تیمارها در جمعیت مخمر وجود نداشت ($P>۰/۰۵$) اما جمعیت قارچ سیلاژ LF تا ۴ روز بعد از قرار گرفتن در معرض هوا کمتر از کنترل بود ($P<۰/۰۵$). pH سیلاژ LF نسبت به کنترل در روز صفر و ۸، بطور معنی داری پایین تر بود ($P<۰/۰۵$). سیلاژ LF از نظر تغییرات دمایی پایدارتر از کنترل بود ($P<۰/۰۵$). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که افزودن *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹ به علوفه ذرت باعث کاهش رشد جمعیت میکروبی و در نتیجه بهبود پایداری هوازی سیلاژ شد.

کلید واژه ها: پایداری هوازی، جمعیت میکروبی، سیلاژ ذرت، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*.

مقدمه

یکی از روش هایی که جهت نگهداری گیاهان به کار می رود، استفاده از فرایند تخمیر بی هوازی (سیلو کردن) است که در آن باکتری های مولد اسید لاکتیک با کاهش pH، از رشد و تکثیر میکروارگانیسم های نامطلوب جلوگیری می کنند (مک دونالد و همکاران،۱۹۹۱). بنابراین افزایش جمعیت باکتری های مولد اسیدلاکتیک می تواند باعث بهبود کیفیت سیلاژ گردد (روک و کفیل زاده، ۱۹۹۴). اما پس از باز کردن سیلو و قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا، فعالیت میکروارگانیسم هایی از قبیل مخمر و کپک باعث اتلاف کربوهیدرات های محلول و محصولات نهایی حاصل از تخمیر مرحله بی هوازی شده که منجر به کاهش کیفیت و قابلیت هضم سیلاژ خواهد شد (پانتیلو و همکاران، ۲۰۲۰). لذا استفاده از ممانعت کننده های فساد هوازی می تواند باعث کنترل فساد سیلاژ در برابر هوا شود. نتایج مثبتی از افزودن باکتری های اسید لاکتیک تخمیر کننده همگن به علوفه هنگام سیلو کردن بر کیفیت تخمیر و قابلیت هضم سیلاژ گزارش شده است (روک و کفیل زاده، ۱۹۹۱). اما این باکتری ها غالبا به دلیل تولید ناکافی اسیدهایی از قبیل اسید استیک، نمی توانند در جلوگیری از فساد هوازی سیلاژ موثر باشند. بدین منظور از باکتری های اسیدلاکتیک تخمیرکننده ناهمگن جهت پایداری هوازی سیلاژ استفاده می شود. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (*Lactobacillus fermentum*) به عنوان باکتری اسید لاکتیک تخمیر کننده ناهمگن دارای پتانسیل تولید اسید لاکتیک و کاهش pH می باشد. همچنین، این باکتری می تواند با تبدیل اسید لاکتیک به اسید استیک تحت شرایط بی هوازی باعث افزایش پایداری هوازی سیلاژ گردد (آدسوگان و همکاران، ۲۰۰۳). با این حال با توجه به اطلاعات محدود استفاده از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر پایداری هوازی سیلاژ (گوا و همکاران، ۲۰۲۰؛ جالک و همکاران، ۲۰۰۹) از یک سو و عدم وجود اطلاعات منتشر شده در رابطه با اثر استفاده از این سویه باکتری (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹) در سیلاژ از سوی دیگر، این پژوهش با هدف بررسی تغییرات جمعیت میکروبی و پایداری هوازی سیلاژ ذرت بعد از قرار گرفتن در معرض هوا انجام شد.

مواد و روش ها

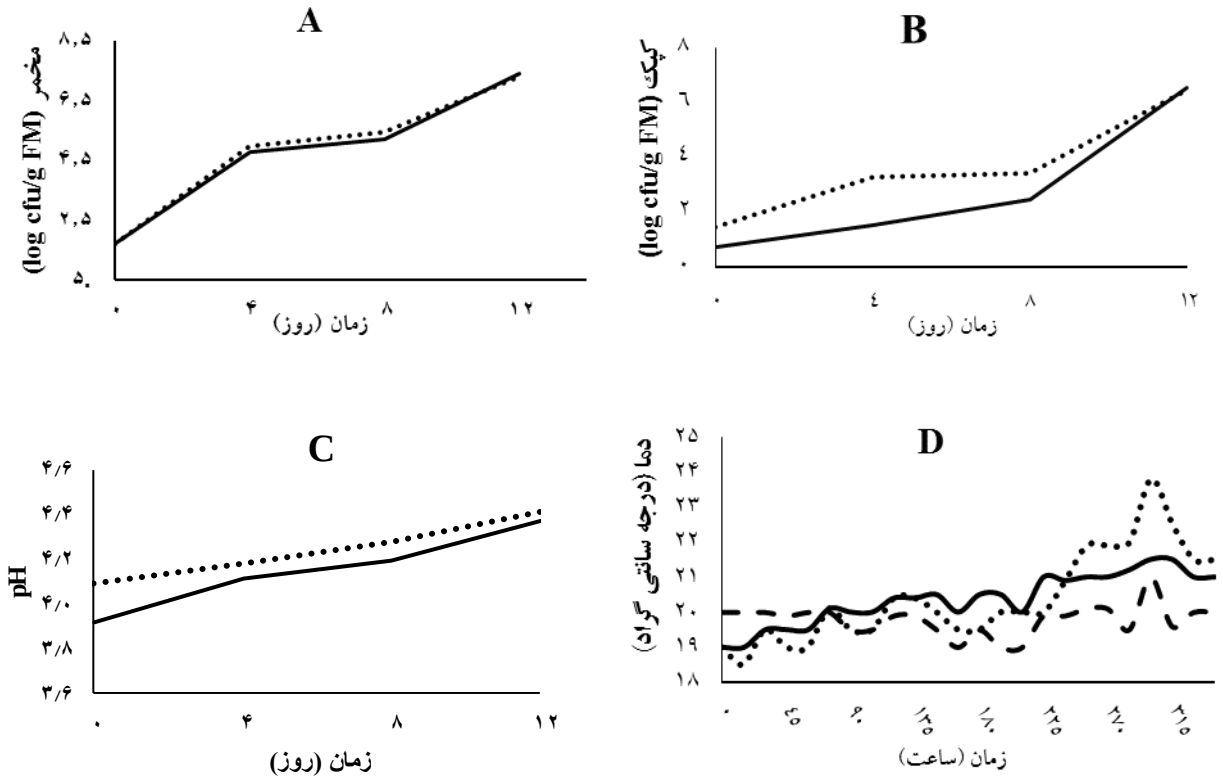
در این آزمایش، علوفه ذرت در مرحله شیری با رطوبت بالا (ماده خشک ۲۳/۴۷ درصد، کربوهیدرات محلول ۷/۰۴ درصد و جمعیت باکتری های لاکتیک اسید، مخمر و کپک به ترتیب ۳/۱۵، ۴/۷۱ و ۳/۹۰ بر حسب log ۱۰ واحد کلنی فرمینگ به ازای هر گرم علوفه تازه) برداشت و به طول دو سانتی متر

خرد شد. علوفه خرد شده جهت تهیه سیلوهای با علوفه تلقیح نشده (کنترل) یا تلقیح شده با cfu $۱۰^{۶}$ ×۲ *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹ به ازای هر گرم علوفه تازه (LF) با ۳ تکرار استفاده شد. غلظت مورد استفاده باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در این آزمایش، با استفاده از روش تکثیر در محیط MRS broth و کدورت سنجی و اندازه گیری جذب نمونه ها با دستگاه اسپکروفتومتر تهیه شد (کالیچیا و همکاران، ۱۹۹۳). سیلاژها در سیلوهای آزمایشگاهی (با ابعاد ۱۸ سانتی متر قطر و ۳۵ سانتی متر ارتفاع) تهیه شدند. سیلوها بعد از پر شدن و غیر قابل نفوذ شدن نسبت به هوا تا زمان مورد نظر در دمای اتاق نگهداری شد.

بعد از بازکردن سیلوهای آزمایشگاهی در روز ۹۰، عصاره گیری نمونه ها جهت اندازه گیری pH، جمعیت مخمر و کپک صورت گرفت و pH بلافاصله قرائت شد (امادا و همکاران، ۲۰۱۲). مخمر و کپک در محیط PDA کشت و سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. جمعیت مخمر و کپک به ترتیب یک و پنج روز بعد از انکوباسیون شمارش و با واحد کلنی فرمینگ در هر گرم علوفه تازه گزارش شد (رابی و همکاران، ۱۹۹۷). به منظور بررسی پایداری هوازی سیلاژها، مقدار ۶۰۰ گرم سیلاژ از هر تکرار در سطل های پلاستیکی قرار داده و درب آن ها جهت جلوگیری از نفوذ گرد و غبار با پارچه پنیر دولایه پوشانده شد. دمای سیلاژها با استفاده از ترمومتر با فواصل زمانی پنج ساعت یکبار به مدت ۱۳ روز قرائت شد. اندازه گیری pH، جمعیت مخمر و کپک در ۴، ۸ و ۱۲روز بعد از قرار گیری سیلاژها در معرض هوا انجام شد. داده های مربوط به آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از رویه MIXED و به صورت اندازه گیری های تکرار شونده با استفاده از نرم افزار آماری SAS (نسخه ۹/۴) مورد آنالیز قرار گرفت.

نتایج و بحث

روند تغییرات pH، جمعیت میکروبی و دمایی سیلاژ کنترل و LF بعد از باز کردن سیلو و قرار گرفتن در معرض هوا در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱A و ۱B نشان داده شده است، جعیت مخمر و کپک بعد از باز کردن و قرار گرفتن در برابر هوا افزایش یافت ($P<۰/۰۵$).



شکل۱- تاثیر *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر پایداری هوازی سیلاژ ذرت. تیمارها: کنترل (....) و LF (—). (A) جمعیت مخمر برحسب log cfu به ازای هر گرم علوفه تازه، (B) جمعیت کپک برحسب log cfu به ازای هر گرم علوفه تازه، (C) تغیرات pH ، و (D) تغییرات دمایی تیمارها نسبت به دمای محیط (- - -) در طول زمان پایداری هوازی.

جمعیت مخمر بین تیمارها اختلاف معنی داری نداشت (P>۰/۰۵) اما جمعیت قارچ تیمار LF تا ۴ روز بعد از قرار گرفتن در برابر هوا کمتر از کنترل بود (P<۰/۰۵). pH سیلاژ کنترل و LF بعد از قرار گرفتن در معرض هوا نسبت به روز صفر افزایش یافت (شکل ۱C) (P<۰/۰۵). میزان pH سیلاژ LF در روز صفر و ۸ نسبت به کنترل به طور معنی داری پایین تر بود (P<۰/۰۵). تغیرات دمایی سیلاژها بعد از بازکردن سیلوها در برابر هوا در شکل ۱D نشان داد که سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از نظر تغییرات دمایی پایدارتر از کنترل بود (P<۰/۰۵).

زمانی که سیلاژ در معرض هوا قرار می گیرد، حضور اکسیژن سیلاژ امکان فعال شدن میکروارگانیسم های فساد هوازی را فراهم می کند. استفاده از باکتری های اسید لاکتیک هتروفرمنتیتیو در تلقیح سیلاژ، به دلیل پتانسیل بالای تولید اسیدهای آلی با خاصیت ضد میکروبی باعث کاهش نرخ فساد سیلاژ در برابر هوا می شوند (جالک و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین، کاهش معنی دار جمعیت کپک در تیمار ۲×۱۰^{۶}cfu *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نسبت به کنترل تا ۴ روز بعد از قرار گر فتن در برابر هوا می تواند موید نقش این باکتری در کاهش فساد هوازی باشد. افزایش جمعیت میکروارگانیسم ها از طریق اکسیداسیون مواد مغذی منجر افزایش pH سیلاژ می شوند. مطابق با نتایج سایر مطالعات، با افزایش زمان قرار گرفتن سیلاژها در معرض هوا جمعیت میکروبی، pH و دما افزایش یافت (آدسوگان و همکاران، ۲۰۰۳؛ گوا و همکاران، ۲۰۲۰). افزایش حرارت اولیه تولید شده در سیلاژ کنترل می تواند آغازگر تغییر جمعیت میکروارگانیسم ها به نفع میکروارگانیسم های حرارت دوست باشد (مک دونالد و همکاران،۱۹۹۱) که با توجه به پایدارتر بودن دمای تیمار LF نسبت به کنترل، احتمال میرود *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* پتانسیل مهار این میکروارگانیسم ها را داشته است. اثرات مثبت استفاده از *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر کاهش جمعیت کپک تا ۴ روز بعد از قرار گرفتن در معرض هوا و پایین تر بودن pH و دمای سیلاژ ذرت تلقیح شده با این باکتری نشان داد که افزودن *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* ۹۲۰۶۹ به سیلاژ می تواند در بهبود پایداری هوازی موثر باشد.

منابع

Adesogan, A.T., Salawu, M.B., Ross, A.B., Davies, D.R. and Brooks, A.E. 2003. Effect of Lactobacillus buchneri, Lactobacillus fermentum, Leuconostoc mesenteroides inoculants, or a chemical additive on the fermentation, aerobic stability, and nutritive value of crimped wheat grains. Journal of dairy science. 86(5): 1789-1796.

Amado, I.R., Fuciños, C., Fajardo, P., Guerra, N.P. and Pastrana, L. 2012. Evaluation of two bacteriocin-producing probiotic lactic acid bacteria as inoculants for controlling Listeria monocytogenes in grass and maize silages. Animal feed science and technology. 175(3-4): 137-149.

Calicchia, M,L., Wang, C.I., Nomura, T., Yotsuzuka, F. and Osato, D.W. 1993. Selective enumeration of Bifidobacterium bifidum, Enterococcus faecium, and streptomycin-resistant Lactobacillus acidophilus from a mixed probiotic product. Journal of food protection. 56(11): 954-957.

Guo, L., Yao, D., Li, D., Lin, Y., Bureenok, S., Ni, K. and Yang, F. 2020. Effects of lactic acid bacteria isolated from rumen fluid and feces of dairy cows on fermentation quality, microbial community, and in vitro digestibility of alfalfa silage. Frontiers in microbiology. 10: 2998.

Jalč, D., Lauková, A., Simonová, M., Váradyová, Z. and Homolka, P. 2009. The use of bacterial inoculants for grass silage: their effects on nutrient composition and fermentation parameters in grass silages. Czech Journal of Animal Science. 54(2): 84-91.

McDonald, P., Henderson, A.R. and Heron, S.J.E. 1991. The biochemistry of silage 2nd ed. Marlow, UK: Chalcombe Publications.

Puntillo, M., Gaggiotti, M., Oteiza, J.M., Binetti, A., Massera, A. and Vinderola, G. 2020. Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated From Different Forages as Silage Inoculants for Improving Fermentation Quality and Aerobic Stability. Frontiers in Microbiology.11: 3091.

Rabie, C.J., Lübben, A., Marais, G.J. and Van Vuuren, H.J. 1997. Enumeration of fungi in barley. International Journal of Food Microbiology. 35(2): 117-127.

Rooke, J. A. and Kafilzadeh, F. 1991. The voluntary intake and digestibility by sheep of grass silages treated with different silage inoculants. Proceedings of the British Society of Animal Production . 1991: 82-84.

Rooke J.A. and Kafilzadeh F. 1994. The effect upon fermentation and nutritive value of silages produced after treatment by three different inoculants of lactic acid bacteria applied alone or in combination. Grass and Forage Science. 49(3): 324-333.

Zielińska, K.J. and Fabiszewska A.U. 2018. Improvement of the quality of maize grain silage by a synergistic action of selected lactobacilli strains. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 34(1): 1-8.

Effect of *Lactobacillus fermentum 92069* on pattern of microbial changes of corn silage after exposure to air

Leila Taherabadi[1*], Farokh Kafilzadeh[2]
1. Ph.D Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.
2. Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.
* Corresponding Author's Email: taherabadi.le@razi.ac.ir

Abstract

This study was carried out to determine the effect of adding *Lactobacillus fermentum* 92069 on changes in microbial population, pH and temperature of corn silage following opening of silos. After standardization of bacteria, silages were made using *lactobacillus fermentum* as an inoculant at either a concentration of 2 ×106 cfu (LF) per gram of fresh corn forage or with no inoculant (control). In order to evaluate the aerobic stability, silage samples were exposed to the air after opening the silos and their temperature was recorded every 5 hours. On days 0, 4, 8 and 12, pH, yeast and mold populations were determined. Experimental data were analyzed using the PROC MIXED procedure of SAS as a completely randomized design. Yeast and mold population and pH of control and LF silages increased continuously and reached their highest on day12 after exposure to air ($P<0.05$). There was no significant difference between treatments in yeast population ($P> 0.05$) but, the fungal population of LF silage was less than the control up to 4 days following the exposure to air ($P <0.05$). The pH of LF silage was significantly lower compared to that of the control on 0 and 8 days after exposure to air ($P <0.05$). Bacterial inoculated treatment was more stable than control in terms of temperature changes ($P <0.05$). The results of the present study showed that the addition of *Lactobacillus fermentum* 92069 *to* corn forage decreased microbial growth rate and hence improved aerobic stability of the silage.

Keywords*:* Aerobic stability, Corn silage, *Lactobacillus fermentum*, Microbial popula