نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد نهم، شماره دوم، ۱۴۰۰
http://ejrr.gau.ac.ir
۳۹-۵۸
DOI: 10.22069/ejrr.2021.18537.1770

غربالگری و انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک مناسب برای افزایش کیفیت سیلاژ ذرت

ناهید آقامحمدی[۱]، *فردین هژبری[۲] و داریوش علیپور[۳]

[۱]دانشجوی دکتری و [۲]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه،
[۳]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

تاریخ دریافت: ۹۹/۸/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۹

چکیده

سابقه و هدف: اثرات استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان مکمل میکروبی بر ویژگی‌های تخمیر سیلاژ عمدتاً به‌دلیل تولید متابولیت‌های مفیدی است که می‌توانند رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مخرب را مهار کنند. بنابراین، توانایی یک سویه در استفاده از سوبستراهای متعدد موجود در گیاه علوفه‌ای و تولید متابولیت‌های مختلف می‌تواند در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها مفید باشد. از این توانایی می‌توان به‌عنوان یک اصل برای انتخاب مواد تلقیحی استفاده کرد. با این وجود، تحقیقات نشان داده‌اند که مقالات منتشر شده در انتخاب ماده تلقیحی با هدف محدود کردن رشد این میکروارگانیسم‌های مخرب و بیماری‌زا هنوز کمیاب است. برخی از محققان اثرات مواد تلقیحی میکروبی بر تخمیر سیلاژ را گزارش کرده‌اند. با این حال، با وجود مقالات متعددی که در مورد اثرات ماده تلقیحی بر تخمیر سیلاژ منتشر شده‌اند، در مورد انتخاب سیستماتیک سویه‌ها توضیحات کمی وجود دارد. هدف از مطالعه حاضر جداسازی، شناسایی و انتخاب سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک با قابلیت بهبود ویژگی‌های تخمیری و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مخرب و ارزیابی اثر تلقیح این سویه‌ها بر ارزش غذایی و پایداری هوازی سیلاژهای ذرت بود.

مواد و روش‌ها: این تحقیق به‌منظور انتخاب سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف و ارزیابی تأثیر آن‌ها بر کیفیت سیلاژ ذرت انجام شد. سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک برای ارزیابی تولید متابولیت‌ها و کاهش pH در عصاره آبی به‌دست آمده از علوفه ذرت تلقیح شدند. یکصدوبیست ویک سویه از منابع مختلف در آزمایشگاه جدا شد. همه سویه‌های جدا شده گرم مثبت، کاتالاز منفی و عمدتاً تولیدکننده اسیدلاکتیک، که باکتری‌های اسیدلاکتیک در نظر گرفته شدند. تجزیه و تحلیل توالی 16S ریبوزومی DNA، ۲۲سویه نماینده برای تأیید حضور گروه‌های غالب استفاده شد. توالی جدایه‌های مختلف باکتری‌های اسیدلاکتیک درجه شباهت بالایی به سویه‌های نوع بانک‌ژن داشتند که بین ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نشان دادند. چهار سویه باکتری‌های اسیدلاکتیک که بهترین نتایج را نشان دادند، در سیلوهای‌آزمایشی مورد ارزیابی قرار گرفتند. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تیمار (چهار سویه باکتری‌های اسیدلاکتیک و یک شاهد بدون ماده تلقیحی) و نه تکرار انجام شد. مواد تلقیحی در 10^6 واحد تشکیل دهنده کلنی/ گرم علوفه تازه به علوفه ذرت خرد شده که پس از آن به مدت ۱۰۵ روز سیلو شدند، استفاده شد. پس از باز شدن سیلوها، از سیلاژها برای تجزیه و تحلیل ترکیبات شیمیایی و فرآورده‌های تخمیری نمونه‌برداری شد.

*نویسنده مسئول: hozhabri@razi.ac.ir

یافته‌ها: تلقیح سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک بر ترکیب شیمیایی، خصوصیات تخمیری و جمعیت میکروبی سیلاژها تأثیرگذاشت. تلقیح سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک بر ترکیب شیمیایی و غلظت اسیدهای لاکتیک و استیک، اتانول و ۱،۲-پروپان‌دی‌ال سیلاژها تأثیر معنی‌دار داشت. در میان تیمارها، سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* دارای غلظت استات بالاتر (P<۰/۰۰۰۱)، اما غلظت لاکتات (P<۰/۰۰۸) و تعداد مخمر کمتر (P<۰/۰۰۰۱) نسبت به سایر سیلاژها بود. همچنین، تلقیح سیلاژ با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (سویه‌ی ۱۶) منجر به سیلاژی با جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک بیشتر و بهبود پایداری هوازی پس از در معرض قرار گرفتن هوا شد (P<۰/۰۰۰۱). سیلاژهای تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و به‌دنبال آن *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* حاوی کمترین تعداد مخمر (P<۰/۰۰۰۱) و قارچ‌های رشته‌ای در طول تخمیر بودند. بین سیلاژها، سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، پایداری هوازی بالاتری را نشان داد (P<۰/۰۰۰۱).

نتیجه‌گیری: روش پیش انتخاب بر اساس تولید متابولیت‌ها در انتخاب سویه‌های جدید تلقیحی و همبستگی بالا با سیلوهای آزمایشگاهی، کارآمد بود. تلقیح سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک در سیلاژ ذرت منجر به‌تفاوت در ارزش غذایی یا جمعیت میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و مخرب شد. سویه های ۱۶ و ۷، که به‌عنوان *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* شناخته شدند، منابع امیدوارکننده‌ای برای استفاده به‌عنوان ماده تلقیحی در سیلاژهای ذرت در نظر گرفته شدند، زیرا آنها سیلاژهایی با ویژگی‌های تخمیری بهتر فراهم می‌کنند و باعث بهبودی پایداری هوازی پس از قرار گرفتن در معرض هوا می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: اسیداستیک، پایداری هوازی، پروپان‌دی‌ال، گرم مثبت، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*

مقدمه

ذرت گیاهی علوفه‌ای است که علی‌رغم ارزش غذایی خوب و دارا بودن ویژگی‌های مطلوب برای تهیه یک سیلاژ خوب و علاقه زیاد دامداران در استفاده از آن برای تولید سیلاژ (۲۲ و ۲۳)، بسیار مستعد فساد و زوال هوازی است (۲۲). پایداری هوازی فراسنجه بسیار مهمی برای اطمینان از کیفیت سیلاژ ذرت است و پایین بودن این فراسنجه باعث کاهش ارزش غذایی و استفاده از آن در تغذیه دام می‌شود (۱۲). بنابراین، استفاده از مواد تلقیحی میکروبی در این سیلاژها با هدف اصلی کاهش زوال هوازی، افزایش کارایی تخمیر و حفظ ارزش غذایی سیلاژ توصیه شده است (۲۲ و ۲۳). اثرات استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک به‌عنوان مکمل میکروبی بر ویژگی‌های تخمیر سیلاژ عمدتاً به‌دلیل تولید متابولیت‌های مفید است که می‌تواند از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نامطلوب جلوگیری کند. بنابراین، توانایی یک سویه در استفاده از سوبستراهای متعدد موجود در گیاه علوفه‌ای و تولید متابولیت‌های مختلف می‌تواند در رقابت با سایر میکروارگانیسم‌ها مفید باشد؛ این توانایی می‌تواند به‌عنوان یک اصل برای انتخاب سویه‌های باکتریایی تلقی شود (۲۱). با این وجود، مطالعات در زمینه انتخاب ماده‌های تلقیحی با هدف جلوگیری از رشد این میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا هنوز ناکافی و کمیاب است (۲۱ و ۲۲). مطالعات نشان می‌دهد که برخی از سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌توانند فعالیت ضدمیکروبی از خود نشان دهند و در نتیجه بر بسیاری از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نامطلوب تأثیر بگذارند (۲۲). سازگاری بین گیاه علوفه‌ای و میکروارگانیسم تلقیح‌شده عاملی است که به استفاده موفقیت‌آمیز از مایع تلقیح میکروبی در سیلاژها کمک می‌کند (٤، ٦ و۲۳). علاوه بر این، تعداد سلول‌های زنده موجود در ماده تلقیحی و توانایی آن برای تسلط

بر میکروبیوتای اپی فیتیک نیز از فاکتورهای مهمی هستند که احتمالاً تنوع زیاد بین نتایج آزمایشی بدست آمده از تلقیح باکتری‌های اسیدلاکتیک را توضیح می‌دهد (٤ و٢٣). در مطالعه‌ای که توسط برخی محققین انجام شد، سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از سیلاژهای نیشکر را در تهیه سیلاژ ذرت آزمایش کردند؛ نتایج حاصل نشان‌دهنده تفاوت بین سویه‌های آزمایش شده از نظر جمعیت سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای و پایداری هوازی سیلاژها بود (٢٢). هدف از مطالعه حاضر انتخاب سویه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک با قابلیت بهبود ویژگی‌های تخمیری و جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نامطلوب و ارزیابی اثر تلقیح این سویه‌ها بر کیفیت و پایداری هوازی سیلاژ ذرت بود.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در آزمایشگاه‌های گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی همدان و در دو مرحله انجام شد:

١) جداسازی باکتری‌های اسیدلاکتیک از سیلاژ ذرت، محتویات روده (ایلئوم و سکوم) مرغ‌های تخمگذار، گوشتی، بوقلمون و شترمرغ، و انتخاب سویه‌های با نتایج بهتر از طریق آزمون‌های آزمایشگاهی که بطور خلاصه توضیح داده می‌شود:

کشت و جداسازی سویه‌های باکتری‌ها طبق روش ارائه شده توسط آویلا و همکاران، (٢٠٠٩، ٢٠١٤) انجام شد (٤ و ٦). به‌منظور جداسازی باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک، یک نمونه‌ی ٨٠ گرمی از سیلاژ ذرت و محتویات روده (ایلئوم و سکوم) بطور مجزا با ٧٢٠ میلی‌لیتر آب مقطر استریل محتوی پپتون (٠/١ درصد) رقیق شد و توسط یک شیکر در ١٢٠ دور در دقیقه، به‌مدت دو ساعت همگن شدند. از آخرین رقت نمونه‌ها، رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شد. از این رقت‌ها برای کشت، جداسازی و شمارش کلنی باکتری‌ها استفاده شد. باکتری‌های مولد اسیدلاکتیک پس از انکوباسیون بی‌هوازی با استفاده از محیط کشت آگار ام آر اس حاوی سیستئین هیدروکلراید (٠/١ درصد) و سیکلوهگزامید (٠/٤ درصد) کشت شدند. کلنی باکتری‌های رشدیافته روی پتری‌دیش‌ها دارای حداقل ٣٠ تا حداکثر ٣٠٠ واحد تشکیل‌دهنده کلنی شمرده شدند و از پتری‌های حاوی کلنی‌های منفرد و با کیفیت خوب، به‌طور تصادفی یک کلنی انتخاب، علامت‌گذاری و برای شناسایی، جداسازی شدند.

خصوصیات مورفولوژیکی و رنگ‌آمیزی گرم باکتری‌های رشدیافته روی محیط کشت آگار ام آر اس پس از ٢٤ ساعت انکوباسیون بررسی شد. جدایه‌ها برای بررسی کلنی، ظاهر سلولی، رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی و تولید گاز از گلوکز و گلوکونات با استفاده از لوله‌های دُرهام در محیط کشت ام آر اس مایع تحت آزمایش قرار گرفتند (٤، ٦ و١٩). همچنین، رشد در دما و pHهای مختلف، در محیط کشت مایع، پس از انکوباسیون در ٣٠ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٧٢ ساعت تعیین شد. تحمل به نمک در محیط کشت ام آر اس مایع حاوی کلریدسدیم در دو غلظت ٣ و ٦/٥ درصد اندازه‌گیری شد (١٩). بر اساس تولید متابولیت‌ها، رشد و کاهش در مقدار pH، پیش انتخاب گونه‌های باکتریایی انجام شد. رشد با دستگاه اسپکتروفتومتر[1] در طول موج ٦٠٠ نانومتر ارزیابی شد. از pH متر دیجیتال[2] برای اندازه گیری pH استفاده شد و از دستگاه

1. VARIAN, Cary100 UV-Vis spectrophotometer, Australia
2. JENWAY, 350 pH meter manual, England.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] برای تجزیه و تحلیل تولید متابولیت‌ها استفاده شد (٦، ٢٢ و ٢٤).

پس از انجام این آزمایشات، بهترین سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک با توجه به توانایی تولید متابولیت‌ها انتخاب شدند. در مرحله بعد با استفاده از روش‌های مولکولی، مراحل استخراج DNA ، باکتری‌های جدا و انتخاب شده و تکثیر DNA استخراج شده توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[2] انجام شد. سویه‌های جداسازی و انتخاب شده برای ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی با تعیین توالی DNA شناسایی شدند. استخراج DNA از باکتری‌های جدا شده و خالص‌سازی آن‌ها و همچنین تکثیر DNA استخراج شده طبق روش‌های توصیف شده (٢٢ و ٢٤) انجام شد. DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت تجاری[3] استخراج شد. غلظت DNAهای استخراج شده با استفاده از طیف سنجی نانودراپ[4] مورد بررسی قرار گرفت و در دمای ٢٠- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندورف (اپندورف، هامبورگ، آلمان) استفاده شد. منطقه کدکننده توالی ژن 16S rDNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در یک سیکلر حرارتی PCR تکثیر شد. مطابق روش سیلوا و همکاران (٢٠١٨)، از آغازگرهای عمومی برای شناسایی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده از آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی RNA بودند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مستقیماً با کیت تعیین توالی با استفاده از آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی DNA، P027F (50-GAGTTTGATCCTGGCTCA-30) و 1492R (50-ACCTTGTTACGACTT-30) تعیین شد (٢٤). محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز بدست آمده برای تصفیه و تعیین توالی به شرکت ماکروژن[5] ارسال و توسط این شرکت تعیین توالی شدند. توالی نوکلئوتید هر جدایه توسط نرم افزار بیوادیت[6] ویرایش ٧.٢ مشاهده و بخش مورد نظر آن انتخاب شد. سپس توالی انتخاب شده بوسیله ابزار بلاست[7] وارد و با توالی‌های موجود در پایگاه داده‌های بانک ژن، موجود در وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[8] مقایسه شدند. پس از تجزیه توالی‌ها توسط بلاست، میکروارگانیسم‌های ثبت شده‌ای که بیشترین قرابت ژنتیکی را با جدایه‌های خالص‌شده آزمایش داشتند، شناسایی شدند. سپس، توالی‌ها با روش اتصالات مجاور توسط نرم افزار مگا[9] ویرایش٦ بررسی شد.

٢) تلقیح سویه‌های جدا و شناسایی شده به علوفه ذرت برای تهیه سیلاژهای ذرت آزمایشگاهی:

با توجه به نتایج تعیین توالی سویه‌های توالی‌یابی شده و نتایج حاصل از آزمایش‌های قبل نظیر نرخ رشد سریع‌تر در طی تخمیر، کاهش موثر pH و تولید غلظت‌های مناسب متابولیت‌ها، چهار سویه که بهترین نتایج را نشان دادند به‌منظور تلقیح به ذرت علوفه‌ای برای تهیه سیلاژ انتخاب شدند. برای این آزمایش پنج تیمار در نظر گرفته شدند: تیمار شاهد (سیلاژ شاهد بدون هیچ افزودنی میکروبی)، و چهار تیمار (*لاکتوباسیلوس سالیواریوس*، *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *انتروکوکوس فاسیوم*) محتوی باکتری‌های جداسازی شده و انتخاب شده. برای هر تیمار نه تکرار در نظر گرفته شد (پنج تیمار و ٤٥ مینی‌سیلو). علوفه تازه

1. HPLC, Shimadzu model LC-10Ai
2. Polymerase chain reaction (PCR)
3. Wizard_ Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, WI, USA
4. Thermo Scientific 2000, Waltham, MA, USA
5. Macrogen (Seoul, South Korea)
6. BioEdite
7. Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)
8. NCBI: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST).
9. MEGA

ذرت با طول برش ۱/۵ سانتی‌متر خردشده با باکتری‌های انتخابی مخلوط شد و در سیلوهای آزمایشی پلی‌وینیل‌کلرید با قطر ۳۰ سانتی‌متر و ارتفاع ۸۰ سانتی‌متر، مجهز به درهای محکم که فقط امکان انتشار گاز را فراهم می‌کند، ذخیره شد. هر مینی‌سیلو با حدود ۳۰۰۰ گرم (وزن مرطوب) علوفه خرد شده پر و به چگالی تقریباً ۶۰۰ کیلوگرم در مترمکعب فشرده شد. سویه‌های باکتری تولیدکننده اسیدلاکتیک مطابق با استانداردهای کدورت مقیاس مک‌فارلند آماده‌سازی شدند و تلقیح با جمعیت 10^6 کلنی به ازای هر گرم علوفه تازه انجام شد. مینی‌سیلوها در دمای اتاق (به‌طور متوسط ۲۳ درجه سانتیگراد) ذخیره شده و پس از ۱۰۵ روز نگهداری باز شدند.

تلقیح باکتری‌ها براساس روش‌های پیشنهاد شده توسط سانتوس و همکاران (۲۰۱۳) و آویلا و همکاران (۲۰۱٤)، انجام شد (٤ و٦). تیمار کنترل (شاهد) بدون هیچ‌گونه تلقیح باکتریایی، فقط آب مقطر به علوفه اضافه و ذخیره شد. در همه تیمارها باکتری‌های تلقیح شده با غلظت 1×10^6 واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی به ازای هر گرم ماده تازه[1] برای اطمینان از تسلط بر تخمیر استفاده شد. مقدار ذرت خردشده برای یک سیلو با تکرارهای آن مشخص شده، توزین، سپس با محلول محتوی باکتری تلقیحی مخلوط شد. باکتری‌ها با استفاده از سمپاش گیاهی (برای جلوگیری از آلودگی از یک سمپاش جداگانه برای هر تیمار) روی علوفه ذرت اسپری، با دست مخلوط و سپس مینی‌سیلوها پر شدند. سیلوها قبل و بعد از پر شدن توزین شدند، تا مقدار واقعی علوفه سیلوشده مشخص شود. پس از هواگیری و فشرده‌سازی کامل، سیلوها در دمای اتاق (به طور متوسط ۲۳ درجه‌سانتی‌گراد) نگهداری شده و از نور خورشید و باران محافظت شدند. پس از ۱۰۵ روز از سیلوکردن، سیلوها ابتدا توزین و سپس باز شدند. بازیابی ماده‌خشک با استفاده از وزن و محتوای ماده‌خشک علوفه تازه و سیلاژ پس از ۱۰۵ روز محاسبه شد (٦ و ۲۲).

نمونه‌برداری‌ها از علوفه تازه قبل از سیلوکردن و همچنین از علوفه سیلوشده بعد از ۳/۵ ماه سیلوکردن (پس از ۱۰۵ روز تخمیر در داخل سیلو) پس از باز شدن سیلوها، برای تجزیه و تحلیل شیمیایی و میکروبی، انجام شد. یک‌بخش از نمونه‌ها وزن و به‌مدت ۷۲ ساعت در آون دارای فن در دمای ۵۵ درجه‌سانتی‌گراد خشک شد. بخش‌دیگری از نمونه‌ها در نایلون‌های برچسب‌دار برای تجزیه‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد ذخیره شد. بخش‌سوم نمونه‌ها برای تهیه عصاره آبی به‌منظور تعیین مقدار pH، ارزیابی جمعیت میکروبی و محصولات نهایی تخمیر استفاده شد. پس از خشک شدن، نمونه‌های خشک شده با استفاده از آسیاب یک میلی‌متری خرد شده و در ظروف پلاستیکی دارای برچسب در دمای اتاق ذخیره تا تجزیه شیمیایی نمونه‌ها انجام شود. برای اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ از روش‌های استاندارد استفاده شد (۲). برای تجزیه الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی از نمونه‌های جداگانه‌ای استفاده شد و هر دو عاری از خاکستر[2] بودند.

یک نمونه‌ی ۲۵ گرمی از علوفه تازه قبل سیلوکردن و همچنین، از هر یک از سیلاژها بعد بازکردن آنها جمع‌آوری و با ۲۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل محتوی پپتون ۰/۱ درصد مخلوط شد و در یک مخلوط‌کن به‌مدت ۲۰ دقیقه باسرعت ۲۰ دور در دقیقه همگن شد، سپس از طریق کاغذ فیلتر واتمن شماره چهار صاف شد (۲۳). از عصاره آبی تهیه شده

1. Colony forming units per gram of fresh matter (cfu (cfu /g FM)

2. NDFom and ADFom, respectively

برای تعیین pH ، کربوهیدرات‌های محلول در آب، اسیدهای چرب فرار و اسیدلاکتیک استفاده شد. کربوهیدرات‌های محلول در آب با استفاده از روش استاندارد توصیه شده تعیین شد (۲۲). بخشی از عصاره‌های آبی (دو میلی‌لیتر) با ۱۰ میکرولیتر اسیدسولفوریک ۵۰ درصد (حجمی/ حجمی) اسیدی شدند و قبل از تجزیه و تحلیل برای اندازه‌گیری محصولات نهایی تخمیر منجمد شدند (۲۲). عصاره‌های آبی اسیدی شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای تعیین غلظت اسیدهای‌لاکتیک، استیک، پروپیونیک، بوتیریک، ۱،۲- پروپان‌دی‌ال و اتانول مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل میکروبی در ذرت علوفه‌ای تازه قبل از سیلوکردن و در سیلاژها در زمان باز شدن مینی‌سیلوها، انجام شد. برای بررسی و شمارش جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در علوفه تازه و سیلاژها از محیط کشت آگار ام آر اس طبق روش (٦)، جمعیت مخمرهای موجود در علوفه تازه و سیلاژها در محیط آگار مخمر- پپتون- دکستروز طبق روش (٤) و جمعیت قارچ‌های رشته‌ای موجود در علوفه تازه و سیلاژها در محیط سیب زمینی دکستروز-آگار حاوی ۱/۵ درصد از محلول اسید تارتاریک (۱۰ درصد وزنی/ حجمی) جهت اسیدی شدن طبق روش (٢٤) انجام شد. کلنی‌های رشدیافته روی پتری‌دیش‌های دارای حداقل ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی شمرده و به‌صورت لگاریتم واحد تشکیل‌دهنده کلنی[1] نشان داده شدند.

جهت ارزیابی پایداری هوازی سیلاژها طبق روش (٦) اقدام شد. به‌طور خلاصه، پس از ۱۰۵ روز سیلوکردن، مینی‌سیلوها باز شدند و نمونه‌های تقریباً دو کیلوگرمی از هر مینی‌سیلو برداشته در سطل‌های پلاستیکی پنج کیلوگرمی قرار گرفتند و در اتاقی با دمای کنترل‌شده ۲۳ درجه سانتی‌گراد (۱/۵ ±) نگهداری شدند. برای ارزیابی ثبات هوازی آن‌ها یک دماسنج به‌مدت هشت روز در توده سیلاژ، در عمق ۱۰ سانتی‌متر قرار داده شد. دماسنجی که برای اندازه‌گیری دما هر ۱۲۰ دقیقه برنامه‌ریزی شده بود در مرکز هر سطل قرار گرفت. دمای سیلاژها هر دو ساعت ثبت شد. دمای محیط با استفاده از دماسنج واقع در نزدیکی سطل‌ها اندازه‌گیری شد. پایداری هوازی به‌عنوان مجموع ساعاتی که سیلاژ قبل از افزایش دمای آن بیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط پایدار ماند، تعریف شد.

این پژوهش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۹ تکرار انجام شد. رابطه ۱ مدل آماری طرح را نشان می‌دهد:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$ رابطه (۱)

در این مدل Y_{ij} مقدار هر مشاهده، μ میانگین صفت مورد مطالعه، T_i اثر تیمار و e_{ij} اثر خطای آزمایشی بود. تجزیه اطلاعات با استفاده از نرم افزار آماری SAS ویرایش ۹/٤ ، با رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و سطح معنی‌داری ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ انجام شد. تمام شمارش‌های میکروبی بر پایه لگاریتمی تبدیل شدند.

نتایج و بحث

تمامی ۱۲۱ سویه باکتری‌های‌اسیدلاکتیک جداشده از منابع مختلف مورد بررسی حاصل از آزمایش‌های مربوط به‌خصوصیات فنوتیپی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای یا کروی شکل، کاتالاز و اکسیداز منفی و تحرک (قدرت حرکت و جنبندگی) منفی بودند، که به جنس لاکتوباسیلوس تعلق داشتند و همچنین، با توانایی خود در تولید گاز کربن‌دی‌اکسید از گلوکز و گلوکونات به‌عنوان لاکتوباسیل‌های با تخمیرهمگن اجباری،

1. Log cfu/g

لاکتوباسیل‌های با تخمیر ناهمگن اختیاری و لاکتوباسیل‌های با تخمیرناهمگن اجباری طبقه‌بندی شدند (٤، ٦ و ١٩). انتخاب اولیه سویه‌های باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک بر اساس مشخصات فنوتیپی و تولید متابولیت‌ها بود. الگوی کلی؛ خصوصیات فنوتیپی، مقادیر کمتر pH محیط کشت (کاهش سریع pH محیط کشت باکتری در واحد زمان)، رشد سریع سویه‌های باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک (اندازه‌گیری شده در واحد جذب) و تولید متابولیت‌ها توسط این باکتری‌ها بود. طی٤٨ ساعت کشت ١٢١ سویه باکتری در محیط کشت عصاره ذرت علوفه‌ای، رشد سویه‌های باکتری‌های‌اسیدلاکتیک (اندازه‌گیری در واحد جذب) و کاهش مقادیر pH در عصاره بین سویه‌های مختلف متغیر بود. از ١٢١ سویه باکتری اسیدلاکتیک آزمایش شده، ١٠٠ سویه نتایج قابل قبولی نشان دادند. برخی از سویه‌ها (٢١ سویه جدا شده از محتویات روده بوقلمون) در فرآیند انتخاب حذف شدند، زیرا رشد آن‌ها در عصاره ذرت از شدت کمتری برخوردار بود یا برخی رشد نکردند.

به استثنای باکتری‌های جدا شده از محتویات روده بوقلمون (٢١ سویه)، تمامی سویه‌های جدا شده در عصاره گیاه ذرت رشد کرده و تکثیر شدند (١٠٠ سویه). برای بیشتر سویه‌های آزمایشی (١٠٠ سویه) مشاهده‌ی ارتباط بین رشد، از طریق قرائت جذب و کاهش pH محیط امکان‌پذیر بود. همبستگی بین این دو فاکتور با تولید اسیدها توسط باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک توضیح داده می‌شود (٢٢). نتایج حاصل از مطالعه سانتوس و همکاران (٢٠١٣)، که انتخاب سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک برای سیلاژ ذرت را بر اساس این دو فاکتور مورد مطالعه قرار دادند همسو با نتایج مطالعه حاضر بود (٢٢). بنابراین، علاوه بر کاهش pH، ارزیابی متابولیت‌های تشکیل‌شده یک روش مناسب برای انتخاب مواد تلقیحی است.

در این پژوهش غلظت متابولیت‌های تولید شده توسط سویه‌های باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در محیط کشت ذرت بسیار متغیر بود. اختلافات موجود در تولید متابولیت‌ها بین سویه‌ها به‌دلیل متابولیسم باکتری‌ها بود. سویه‌هایی که تولید بالایی از اسیدلاکتیک را نشان دادند، به عنوان باکتری‌های با تخمیرناهمگن اختیاری شناخته شدند، در حالی‌که سویه‌هایی که اسیدهای‌استیک تولید می‌کردند، باکتری‌های با تخمیرناهمگن اجباری در نظر گرفته شدند. در این تحقیق برخی سویه‌ها تولید غلظت‌های بالایی از اسیدهای استیک و پروپیونیک داشتند. اسیدهای پروپیونیک و استیک یک‌اثر هم‌افزایی نشان می‌دهند که قادرند رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای را کاهش داده و ثبات هوازی سیلاژ را افزایش دهند (٨ و٢٢). اثرات ماده تلقیحی میکروبی بر تخمیر سیلاژ، علاوه بر تغییر pH ، عمدتاً به‌دلیل توانایی تسلط سریع بر تخمیر و تولید متابولیت‌هاست (٦ و٢١).

در مطالعه حاضر، انتخاب سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک برای تلقیح در سیلوها عمدتاً بر اساس سرعت رشد و تولید متابولیت‌ها برای بهبود تخمیر و یا پایداری هوازی بود. بر اساس نتایج به‌دست آمده، ٢٢ سویه از ١٠٠ سویه ارزیابی شده که نتایج بهتری را از نظر تولید متابولیت‌ها، کاهش pH و سرعت رشد نشان دادند، جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. نتایج تعیین‌توالی منطقه 16S rRNA، ٢٢ جدایه‌ی انتخاب‌شده نشان داد که همه آن‌ها حداقل ٩٩ درصد شباهت را با توالی میکروارگانیسم‌های موجود در بانک ژن نشان دادند. اگر شباهت ژنتیکی بین میکروارگانیسم موردنظر و میکروارگانیسم بانک ژن، ٩٩ درصد باشد می‌توان با اطمینان گفت که همان

باکتری یا همان گونه است (۱۹). مطابق با نتایج تعیین‌توالی منطقه 16S rRNA و همچنین، نتایج حاصل از آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری فراسنجه‌های رشد، کاهش pH، تولید متابولیت‌ها و خصوصیات فنوتیپی در میان ۲۲ سویه‌ی مختلف چهار سویه برای ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی انتخاب شدند. شباهت توالی 16S rRNA در مقایسه با کد دسترسی موجود در بانک ژن برای این سویه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱- تشخیص مولکولی سویه‌های باکتری اسید لاکتیک

Table 1. Molecular identification of LAB strains

سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک LAB Strains	منبع جداسازی Isolation source	هم ترازی در BLAST BLAST alignment	کد در NCBI Code at NCBI[1] accession no.	درصد شباهت Similarity (%)
سویه ۷ Strain 7	محتویات روده مرغ‌های گوشتی Isolated from the intestinal contents of Broilers	*لاکتوباسیلوس سالیواریوس* *Lactobacillus salivarius* (LS)	LT852760.1	100
سویه ۱۱ Strain 11	سیلاژ ذرت Isolated from Corn Silage	*پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیس* *Pedicoccus acidilatici* (PA)	KY549392.1	99
سویه ۱۶ Strain 16	محتویات روده مرغ‌های تخم گذار Isolated from the intestinal contents of laying hens	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* *Lactobacillus fermentum* (LF)	GQ231445.1	100
سویه ۱۹ Strain 19	محتویات روده شترمرغ Isolated from Ostrich intestinal contents	*انتروکوکوس فاسیوم* *Enterococcus faecium* (EF)	KY682304.1	100

[1]National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/).

یک سویه که برای تلقیح انتخاب می‌شود باید سریع رشد کند تا بتواند با موفقیت با سایر میکروب‌ها رقابت کند (۲۱). در این آزمایش فراسنجه‌های رشد ۲۲ سویه توالی‌یابی شده اندازه‌گیری شد که شامل زمان تأخیر، رشد بعد از ۱۲ ساعت و زمان مورد نیاز برای حداکثر غلظت در عصاره ذرت بود. از سویه‌های آزمایش و توالی‌یابی شده، سویه‌های ۷، ۱۱، ۱۶ و ۱۹ سریع‌ترین رشد در ۱۲ ساعت را نشان دادند. با این حال، رشد سریع به‌تنهایی کافی نیست. همچنین، تخمیر باید باعث کاهش سریع pH در نتیجه تولید اسیدلاکتیک شود. بسیاری از سویه‌ها بسیار سریع رشد کردند اما قادر به کاهش pH نبودند و بنابراین، حذف شدند. لذا سویه‌های ۷، ۱۱، ۱۶ و ۱۹ در کاهش pH بسیار موثر بوده و رشد خوبی داشتند، بنابراین، چهار سویه باکتری برای تلقیح به سیلو، مناسب ارزیابی شدند (جدول ۲). همچنین، براساس اندازه‌گیری خصوصیات فنوتیپی، مورفولوژیکی و فیزیولوژیکی، این باکتری‌ها قادر به رشد در pH برابر ۳/۵ تا ۸ و دمای ۱۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد بودند و در محیط کشت محتوی ۳ و ۶/۵ درصد کلریدسدیم به‌خوبی رشد کردند. سویه *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* جدا شده از سیلاژ ذرت در دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد و در pH برابر ۳ نیز قادر به رشد بود. اما در سه سویه‌ی دیگر، این توانایی نسبتاً ضعیف بود. البته اکثر سویه‌ها وقتی که در pH برابر ۳ یا دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد کشت شدند، رشدشان کاهش یافت یا متوقف شد. این باکتری‌های جداشده پس از ارزیابی در آزمون‌های آزمایشگاهی به‌عنوان گرم

مثبت، کاتالاز منفی، اکسیداز منفی شناخته شدند که به جنس لاکتوباسیلوس متعلق بودند و همچنین، با توانایی خود در تولید گاز کربن‌دی‌اکسید از گلوکز و گلوکونات به‌عنوان لاکتوباسیل‌های با تخمیرهمگن و لاکتوباسیل‌های با تخمیرناهمگن طبقه‌بندی شدند (٦ و٢٢). لذا با توجه به نتایج حاصل از بررسی خصوصیات فنوتیپی و با توجه به غلظت متابولیت‌ها، این چهار سویه نتایج قابل قبولی را نشان داده و برای تلقیح در سیلوهای آزمایشی انتخاب شدند.

جدول ۲- رشد سویه‌ها و تغییر در pH محیط رشد پس از ۱۲ ساعت و در پایان دوره رشد؛ pH اولیه= ۵/۲۰.

Table 2. Growth of strains and changes in pH of growth media after 12 h and at the end of the growth period, initial pH =5.20

سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک LAB Strains	فاز تاخیر (ساعت) Lag phase (hour)	رشد (Growth) ($\log CFU\ ml^{-1}$)		کاهش در pH Drop in pH	
		۱۲ساعت 12h	حداکثر Max	۱۲ ساعت 12h	حداکثر Max
لاکتوباسیلوس سالیواریوس (LS) *Lactobacillus salivarius*	6	2.04	2.10(14h)	1.45	1.80(17h)
پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیس (PA) *Pedicoccus acidilatici*	5	2.05	2.31(15h)	1.51	2.00(17h)
لاکتوباسیلوس فرمنتوم (LF) *Lactobacillus fermentum*	7	2.10	2.30(15h)	1.32	1.65(17h)
انتروکوکوس فاسیوم (EF) *Enterococcus faecium*	6	2.03	2.30(13h)	1.50	1.95(17h)

ترکیبات شیمیایی، خصوصیات تخمیری و جمعیت میکروبی علوفه ذرت قبل و بعد از سیلوکردن در جدول ۳ نشان داده شده است. فرآیند سیلوکردن باعث افزایش غلظت پروتئین‌خام در سیلاژ شاهد و سیلاژهای محتوی باکتری‌های تلقیحی در مقایسه با علوفه تازه ذرت قبل سیلوکردن شد، در حالی که غلظت‌های ماده خشک، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی (بدون خاکستر)، کاهش یافت ($P<۰/۰۰۰۱$). همچنین، استفاده از سویه‌های باکتری تلقیحی بر مقادیر ماده خشک، پروتئین‌خام، الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی در سیلاژها تأثیر گذاشت و تفاوت معنی‌داری بین سیلاژ شاهد و سیلاژهای محتوی باکتری تلقیحی پس از ۱۰۵ روز سیلوکردن مشاهده شد ($P<۰/۰۰۰۱$). با این حال، افزایش پروتئین‌خام درنتیجه تخمیر پس از سیلوکردن در مقایسه با علوفه تازه می‌تواند مربوط به سنتز پروتئین میکروبی باشد (۳). همچنین، کاهش سریع pH سیلاژ به کاهش تجزیه پروتئین با غیرفعال‌سازی پروتئازهای گیاهی کمک خواهد کرد (۱۵). از طرفی غلظت پروتئین‌خام در سیلاژهای محتوی باکتری‌های تلقیح شده در مقایسه با سیلاژ شاهد بالاتر ($P<۰/۰۰۰۱$). بود. این را می‌توان به کاهش پروتئولیز درنتیجه تلقیح باکتری در مقایسه با سیلاژ شاهد نسبت داد (١٤). نتایج حاصل از این مطالعه با نتایج مطالعات دیگر که افزایش محتوای پروتئین‌خام را درنتیجه تلقیح به سیلاژ در مقایسه با سیلاژ شاهد گزارش کرده‌اند مطابقت دارد (۷، ۱۳، ١٤، ۱۵و ۲۵)؛ هرچند، در گزارش سانتوس و همکاران (۲۰۱۳)، این نتایج مشاهده نشد (۲۲).

علاوه بر این، بخش‌های الیافی علوفه (الیاف نامحلول در شوینده خنثی و اسیدی) در تمامی سیلاژها پس از سیلوکردن در مقایسه با غلظت آن‌ها در علوفه اولیه به طور قابل‌توجهی کاهش یافت. این موضوع ممکن است نتیجه‌ی ترکیبی از فعالیت تجزیه

آنزیمی و هیدرولیز اسیدی بخش‌های دیواره سلولی (سلولز، همی‌سلولز)، طی فرآیند سیلوکردن باشد (۷، ۱۴، ۱۸ و ۲۲). با این حال، کاهش مقدار الیاف نامحلول در شوینده خنثی بدون خاکستر نشان می‌دهد که بخشی از الیاف، احتمالاً بخش همی‌سلولز، تجزیه و حل شده است (۲۳)، زیرا همی‌سلولز به کاهش pH حساس است و در شرایط اسیدی تا حدی هیدرولیز می‌شود (۹ و ۲۳). به‌علاوه غلظت الیاف سیلاژهای تیمار شده کمتر از غلظت الیاف علوفه اصلی بود؛ این کاهش مقدار الیاف در سیلاژهای ذرت رایج است و این نتیجه را مطالعات دیگر نیز پشتیبانی می‌کند (۱۴، ۲۰ و ۲۳). از طرفی، کاهش مقدار الیاف نامحلول در شوینده خنثی بدون خاکستر در سیلاژهای تیمارشده در مقایسه با سیلاژ شاهد بیشتر (P<۰/۰۰۰۱). بود. این تیمارها درمقایسه با تیمار شاهد حاوی مقادیر کمتری دیواره سلولی بودند، زیرا باکتری‌های تلقیحی احتمالاً حاوی آنزیم‌های فیبرولیتیک بودند. نتایج مشابهی توسط محققین دیگر مبنی برکاهش در بخش‌های دیواره سلولی گزارش شده است (۱، ۷، ۱۴ و ۲۰). هرچند، برخی محققین کاهش بخش‌های دیواره سلولی سیلاژهای تلقیح شده با باکتری را درمقایسه با تیمار شاهد مشاهده نکردند (۱۳ و ۲۵). این امر به دمای پایین محیطی که تجزیه همی‌سلولز را مهار می‌کند، نسبت داده شده است (۱۴ و ۱۵). تجزیه بیشتر بخش‌های الیافی در سیلاژ تلقیح شده با سویه *انتروکوکوس‌فاسیوم* و مقادیر کمتر دیواره سلولی در این سیلاژ، متعاقباً افزایش کربوهیدرات‌های محلول در آب باقیمانده می‌تواند به آنزیم‌های موجود در این باکتری نسبت داده شود. نتایج مطالعه نکوسی و همکاران (۲۰۱۹) مشابه این یافته‌ها بود (۱۶).

بازیافت ماده‌خشک برای همه تیمارها زیاد بود (< ۹۱درصد)، که حاکی از اتلاف پائین ماده‌خشک ناشی از تخمیر ثانویه است. کاهش pH سیلاژها طی فرایند ذخیره‌سازی در کل تیمارها اتفاق افتاد و تمامی تیمارها با یا بدون تلقیح باکتری‌ها دارای pH زیر ۳/۹ بودند. بیشترین کاهش pH در سیلاژ شاهد بود، اما کاهش کمتری در مقدار pH سیلاژ تلقیح شده با سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نسبت‌به سایرین مشاهده شد، زیرا این باکتری به‌عنوان باکتری با تخمیرناهمگن اجباری شناخته شده است و عمدتاً باکتری‌های با تخمیرناهمگن می‌توانند اسیدلاکتیک را به اسیداستیک، ۱،۲-پروپان‌دی‌ال و مقادیر ناچیزی اتانول تجزیه کنند (۱۱، ۱۷ و ۲۰) و غالباً pH آنها ۰/۱ تا ۰/۲ واحد بالاتر از سیلاژ شاهد خواهد بود (۱۱). این نتیجه به‌دلیل متابولیسم میکروارگانیسم تولیدکننده اسیدلاکتیک، اسیداستیک، اتانول و کربن‌دی‌اکسید از هگزوزها و پنتوزها انتظار می‌رفت. این متابولیت‌ها به کاهش کمتر مقادیر pH کمک می‌کنند. با این حال، تحت شرایط آزمایشی، مقادیر pH نهایی برای سیلاژ با کیفیت، مناسب در نظر گرفته شد (۲۲). pH سیلاژ یکی از معیارهای اصلی منعکس‌کننده میزان تخمیر و کیفیت علوفه‌ی سیلوشده است (۷ و۱۶). به‌طورکلی یک دامنه مناسب از pH در محدوده ۴/۲-۳/۷ برای حفظ سیلاژ علوفه ذرت توصیه شده است (۱۰) و در مطالعه حاضر مقادیر متوسط pH به‌دست آمده بعد از ۱۰۵ روز تخمیر برای تمام سیلاژها در بازه pH مطلوب قرار داشت که نشان دهنده این است که سیلاژ به‌خوبی محافظت‌شده و خصوصیت یک سیلاژی را داشت که به خوبی ذخیره شده بود (۷ و ۱۶)؛ لذا شاخص اسیدی‌شدن کافی برای جلوگیری از رشد میکروب‌های نامطلوب را دارا بود (۱۲ و ۲۴).

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی، خصوصیات تخمیری و ترکیب میکروبی در علوفه تازه، سیلاژ ذرت تلقیح شده و سیلاژهای ذرت تلقیح‌شده با سویه‌های باکتری اسیدلاکتیک بعد از ۱۰۵ روز تخمیر در سیلو

Table 3. Chemical composition, fermentation characteristics and microbial composition of fresh maize and maize silage inoculated with lactic acid bacteria strains after 105 d of fermentation in silo

سطح‌معنی‌داری P-value	اشتباه معیار میانگین SEM	Treatments[1] تیمارها[1] (سیلوهای آزمایشی) EF	LF	PA	LS	شاهد Control	علوفه تازه Forage	فراسنجه‌ها (Parameters)
		ترکیب شیمیایی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) Chemical composition (g kg^{-1}DM)						
0.005	2.03	345.00^{a}	338.34^{ab}	337.03^{ab}	343.37^{a}	335.07^{b}	350.02	ماده خشک Dry matter
0.0001	1.30	435.00^{c}	447.00^{b}	451.00^{ab}	446.00^{b}	456.00^{a}	480.00	الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber
0.0001	0.87	245.00^{d}	263.00^{a}	257.00^{b}	250.00^{c}	260.00^{ab}	265.00	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber
0.0001	0.35	86.33^{a}	85.40^{ab}	84.46^{b}	85.64^{ab}	82.54^{c}	80.04	پروتئین خام Crude protein
0.0001	0.35	977.20^{a}	958.48^{c}	954.93^{d}	973.21^{b}	950.16^{e}	-	بازیافت ماده خشک Dry Matter recovery
0.0001	0.00	3.76^{b}	3.81^{a}	3.77^{b}	3.76^{b}	3.74^{c}	5.20	pH
0.0001	0.07	9.36^{b}	5.70^{e}	7.27^{d}	7.78^{c}	10.01^{a}	97.16	کربوهیدرات محلول در آب Water soluble carbohydrates
0.0088	0.77	73.13^{ab}	71.70^{b}	74.90^{a}	73.98^{ab}	75.63^{a}	-	اسید لاکتیک Lactic acid
0.0001	0.41	35.67^{d}	50.06^{a}	37.39^{c}	40.66^{b}	30.89^{e}	-	اسید استیک Acetic acid
0.0001	0.82	0.97^{c}	1.86^{a}	1.31^{b}	1.37^{b}	0.96^{c}	-	اسید پروپیونیک Propionic acid
0.0001	0.00	0.018^{b}	0.018^{b}	0.015^{c}	0.017^{bc}	0.033^{a}	-	اسید بوتیریک Butyric acid
0.0001	0.00	1.50^{c}	6.00^{a}	1.50^{c}	4.50^{b}	0.00^{d}	-	۱،۲ پروپان دیول-1,2 propanediol
0.0001	0.40	10.32^{b}	10.70^{b}	11.92^{b}	10.50^{b}	15.02^{a}	-	اتانول Ethanol
		ترکیب میکروبی ($\log_{10}$cfu g^{-1} FM) Microbial composition						
0.0001	0.02	8.84^{c}	9.27^{a}	8.83^{c}	8.95^{b}	8.01^{d}	5.73	باکتری‌های اسید لاکتیک Lactic acid bacteria
0.0001	0.02	1.98^{c}	1.47^{e}	2.11^{b}	1.57^{d}	2.92^{a}	5.57	مخمرها Yeasts
--	--	ND	ND	ND	ND	ND	3.20	قارچ‌ها Molds

میانگین‌ها در هر ردیف با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$).

[a,b,c,d,e]The means within the same row with different letter have significant difference ($P < 0.05$)

لاکتوباسیلوس سالیواریوس (LS)، *پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* (PA)، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (LF)، *انتروکوکوس فاسیوم* (EF). ND: غیر قابل شناسایی در رقت $^{-1}$۱۰.

Lactobacillus salivarius (LS), *Pedicoccus acidilatici (PA), Lactobacillus fermentum (LF), Enterococcus faecium (EF)*, ND: non-detectable (dilution 10^{-1}).

غلظت کربوهیدرات محلول در آب علوفه تازه ذرت در مطالعه حاضر، به‌طور متوسط ۹۷/۱۶ گرم بر کیلوگرم ماده‌خشک بود که این مقدار بالاتر از حداقل سطح ۶۰ گرم بر کیلوگرم ماده‌خشک توصیه شده برای یک تخمیر کارآمد بود (۸ و ۱۴). با این حال، پس از ۱۰۵ روز ذخیره‌سازی، سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌ها، غلظت باقی‌مانده کربوهیدرات‌های محلول در آب کمتری نسبت‌به تیمار شاهد نشان دادند (P<۰/۰۰۰۱). این نتایج نشان می‌دهد که کربوهیدرات‌های محلول در آب بیشتری توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک در سیلاژهای تلقیح شده، استفاده شده است. این میکروارگانیسم‌ها مسئول مصرف کربوهیدرات‌ها همراه با تولید متابولیت‌ها، عمدتاً اسیدلاکتیک، هستند که به‌وضوح در کاهش مقدار pH نقش دارند (۱۴). مقدار کربوهیدرات محلول در آب کمتر موجود در سیلاژهای تلقیح شده پس از ۱۰۵ روز تخمیر در سیلو موافق با نتایج حاصل از مطالعات برخی محققین بود (۱۴، ۲۰ و ۲۲)، در حالی‌که با برخی نتایج گزارش شده تفاوت داشت (۷ و۱۳). سیلاژ تلقیح شده با سویه *انتروکوکوس‌فاسیوم* نیز در مقایسه با سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌های دیگر، غلظت باقی‌مانده کربوهیدرات محلول بیشتری داشت. این پاسخ را می‌توان به مهار مخمرها در طی تخمیر نسبت داد (۱۸) یا ممکن است این حالت به تجزیه بیشتر دیواره سلولی در این سیلاژ نسبت به دیگر سیلاژهای تلقیح شده مرتبط باشد که باعث ایجاد کربوهیدرات بیشتر برای تحریک تخمیر در سیلاژ می‌شود. تخریب دیواره سلولی سیلاژ تلقیح شده با این سویه، متعاقباً کربوهیدرات محلول در آب باقی‌مانده آن را افزایش می‌دهد که ممکن است این تجزیه به آنزیم‌های موجود در باکتری تلقیحی نسبت داده شود (۱۶).

ارزیابی متابولیت‌های تولید شده در طی فرآیند تخمیر، یکی از راه‌های درک تأثیرات باکتری‌های تلقیحی بر سیلاژها است. محتویات اسیدهای لاکتیک، استیک و پروپیونیک موجود در این مطالعه به آنچه در رابطه با سیلاژهای ذرت با ماده خشک ۳۰-۴۰ درصد توسط کانگ و شاور (۲۰۰۱) گزارش شده است (۱۰) نزدیکتر بود (جدول۳). انتظار می‌رفت که سویه‌های با تخمیرناهمگن اختیاری، سیلاژهایی با غلظت بالاتر اسیدلاکتیک تولید کنند. با توجه به نتایج مطالعه حاضر تلقیح باکتری‌ها باعث افزایش غلظت اسید لاکتیک در سیلاژها نشد. به‌جز سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که کمترین (P<۰/۰۰۸) مقدار اسیدلاکتیک در آن تولید شد، تفاوت آماری معنی‌داری بین تیمارهای دیگر با تیمار شاهد مشاهده نشد. انتظار می‌رفت که هنگام باز شدن سیلوها، سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌های تخمیرهمگن (ناهمگن اختیاری)، اسیدلاکتیک بیشتری داشته باشند؛ با این حال، این روند مشاهده نشد. سویه‌های تلقیح شده در این مطالعه گونه‌های مختلفی بودند که توانایی‌های متفاوتی برای تولید متابولیت‌ها درحین ذخیره‌سازی دارند (۳ و۲۲). از این رو انتظار می‌رفت که تفاوتی در تولید اسیدلاکتیک در بین تیمارها وجود داشته باشد. اگرچه، عوامل متعددی ممکن است با مقدار این اسید در سیلاژ تداخل ایجاد کنند. سویه‌های گونه‌های مشابه ممکن است تفاوت در متابولیسم و توانایی زنده ماندن در محیط سیلاژ را نشان دهند. یکی دیگر از عواملی که باید در نظر گرفته شود، مصرف اسیدلاکتیک توسط سایر میکروارگانیسم‌ها مانند مخمرها است (۳) یا حتی توسط باکتری‌های اسیدلاکتیک با تخمیرناهمگن، که در مراحل نهایی تخمیر حضور دارند و از اسیدلاکتیک استفاده می‌کنند (۳ و۱۷). هرچند مقدار اسیدلاکتیک در سیلاژهای مورد مطالعه در محدوده توصیه شده ۴۰ تا ۱۲۰ گرم

بر کیلوگرم ماده خشک (۱۵) قرار داشت که نشانه‌ای از سیلاژ خوب تخمیر شده است.

بیشترین غلظت اسیداستیک در مطالعه حاضر در سیلاژهای تلقیح شده با سویه‌ی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (به‌عنوان باکتری با تخمیرناهمگن) مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱؛ جدول ۳). با این حال، غلظت اسیدلاکتیک کمتر از سیلاژ شاهد بود؛ این نتایج انتظار می‌رفت، زیرا سویه فوق به عنوان باکتری با تخمیرناهمگن اجباری طبقه‌بندی شد. مشابه مطالعه حاضر در مطالعه دیگران (۲۲) که با ارزیابی اثرات تلقیح سیلاژ ذرت با *لاکتوباسیلوس بوکنری* انجام شد، افزایش غلظت اسیداستیک همزمان با کاهش غلظت اسیدلاکتیک مشاهده شد. با این حال، غلظت اسیداستیک در همه‌ی سیلاژهای مورد مطالعه ما به‌طور کلی در مقایسه با غلظت اسیدلاکتیک کمتر بود (جدول ۳)؛ این مطلب نشان‌دهنده محافظت خوب کیفیت سیلاژ است (۱۵). طبق گزارش اود الفرنیک (۲۰۰۱)، افزایش مقدار اسیداستیک می‌تواند نتیجه تبدیل بی‌هوازی اسیدلاکتیک به اسیداستیک و ۱،۲-پروپان‌دی‌ال باشد، که معمولاً با گونه‌های با تخمیرناهمگن اجباری همراه است (۱۷). سیلاژ تلقیح شده با *انتروکوکوس فاسیوم* در مقایسه با سایر سیلاژهای تلقیح شده کمترین مقدار اسیداستیک را تولید کرد (P<۰/۰۰۰۱). از طرفی مقدار اسیداستیک تولید شده در سیلاژ شاهد کمترین بود.

غلظت اسیدپروپیونیک در سیلاژهای تلقیح شده با سویه‌های مختلف به جز *انتروکوکوس فاسیوم* بیشتر از گروه شاهد بود (P<۰/۰۰۰۱). غلظت این اسید در تمام سیلاژهای تلقیح شده بیشتر از مقدار گزارش شده توسط فیلیا (۲۰۰٤)، بود (۹)، هرچند کمتر از مقادیر گزارش شده توسط سانتوس و همکاران (۲۰۱۳)، بود (۲۲). اسیدپروپیونیک بیشترین تأثیر را در مهار قارچ‌ها دارد و وجود آن در سیلاژ مطلوب ارزیابی می‌شود (۵). در این مطالعه، سیلاژهای دارای میزان بالاتر اسید پروپیونیک دارای کمترین مقدار مخمرها بودند. سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* نسبت به سایر تیمارها بیشترین مقدار اسید پروپیونیک را تولید کرد (P<۰/۰۰۰۱). همچنین، اسیدپروپیونیک از طریق متابولیسم باکتری‌های اسیدپروپیونیک، تولید می‌شود که با این وجود به pH کم حساس هستند (۵). در سیلاژ شاهد، احتمالاً pH به سرعت کاهش می‌یابد و این باکتری‌ها مهار می‌شوند. pH نهایی سیلاژ تلقیح شده با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از سیلاژهای دیگر بالاتر بود (جدول ۳). اگرچه، pH نهایی فقط به زمان باز شدن سیلوها اشاره دارد و میزان کاهش آن طی فرآیند، ناشناخته است. آویلا و همکاران (۲۰۰۹)، در مطالعه خود این موضوع را مورد ارزیابی قرار داده و مشاهده کردند که در سیلاژ حاوی سویه جدا شده، افت pH با کندی بیشتری نسبت به سیلاژ بدون باکتری صورت می‌گیرد (٤). بنابراین، ممکن است کاهش کندتر pH باعث زنده‌ماندن باکتری‌های اسیدپروپیونیک برای مدت طولانی‌تر شود و مقدار اسیدپروپیونیک را در آن سیلاژها افزایش دهد (٤ و ۵).

بیشترین مقدار اسیدبوتریک در سیلاژ شاهد مشاهده شد که نسبت به سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌های اسیدلاکتیک بالاتر بود (P<۰/۰۰۰۱). از طرفی کمترین مقدار این اسید در سیلاژهای تلقیح شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیس* اندازه‌گیری شد. بنابراین، سویه‌های ارزیابی‌شده در مطالعه حاضر در مقایسه با شاهد در کاهش مقدار اسیدبوتیریک سیلاژها، کارآمد بودند. با این حال، تمام سیلاژها غلظت اسیدبوتیریک زیر ۰/۰۳ گرم در کیلوگرم ماده‌خشک را نشان دادند. این مقدار تقریباً در محدوده‌ای قرار دارد که به‌طور معمول در سیلاژ ذرت مشاهده می‌شود، که عدم

وجود فعالیت کلستریدیوم طی تخمیر در علوفه‌های سیلوشده را منعکس می‌کند (۷، ۱۳، ۲۱ و۲۲)؛ این نتایج نشان‌دهنده سیلاژهای کاملاً محافظت شده است (۱۰ و۱۳).

افزودن باکتری‌های اسیدلاکتیک به سیلاژ ذرت سبب کاهش غلظت اتانول تولید شده نسبت به سیلاژ شاهد شد (P<۰/۰۰۰۱؛ جدول ۳). تفاوتی بین سویه‌های مختلف در توانایی کاهش میزان اتانول مشاهده نشد. وجود اتانول در سیلاژ نامطلوب است زیرا این نشان‌دهنده رشد مخمر و اتلاف ماده‌خشک است (۲۲). محتوای اتانول سیلاژها در این مطالعه در بازه مقادیری بود که برای اتانول (۱۰ تا ۳۰ گرم بر کیلوگرم ماده خشک) در سیلاژها ذرت، قابل قبول در نظرگرفته می‌شود (۱۰).

تلقیح سیلاژ ذرت با سویه‌های مختلف باکتریایی باعث افزایش تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک نسبت به سیلاژ شاهد شد (P<۰/۰۰۰۱). بیشترین جمعیت این باکتری‌ها در سیلاژهای تلقیح شده با سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد. این نتیجه ممکن است به‌دلیل توانایی زنده‌ماندن این سویه طی فرآیند تخمیر باشد، زیرا درمقایسه با علوفه تازه، بیشترین افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در این سیلاژ مشاهده شد. همچنین، این افزایش بالاتر جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در این سیلاژ می‌تواند به خصوصیات فیزیولوژیکی گونه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مربوط باشد که قادر به متابولیسم اسیدلاکتیک به اسیداستیک و زنده ماندن در آخرین لحظات فرآیند تخمیر سیلاژ است (۵).

عواملی که برای ارزیابی فساد هوازی در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند، تغییرات دما و افزایش درجه حرارت سیلاژها بود. وقتی سیلاژ در معرض هوا قرار می‌گیرد، طی فاز خوراک‌دهی، مدت زمانی که سیلاژ خنک باقی می‌ماند و دمای آن پائین است و فاسد نمی‌شود، ثبات یا پایداری هوازی نامیده می‌شود (۸). در این مطالعه، افزایش دما در سیلاژ شاهد پس از تقریباً ٦٦ ساعت قرارگرفتن در معرض هوا آغاز شد و سیلاژهای تلقیح شده نسبت به سیلاژ شاهد در طول ارزیابی اولیه افزایش دمای کندتری را نشان دادند (شکل ۱). در طول دوره ارزیابی، تغییرات زیادی در دمای سیلاژهای مختلف وجود داشت؛ از کمترین دما (۱۷ درجه سانتی‌گراد) تا بیشترین دما (۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد). در سیلاژهای تلقیح شده با سویه‌های *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* افزایش چشمگیر دما به‌ترتیب بعد از تقریباً ۱۵۰ و ۱۹۲ ساعت قرارگرفتن در معرض هوا رخ داد (شکل ۱). سیلاژ تلقیح شده با سویه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در کل دوره ارزیابی با سرعت کمتری گرم شد و دمای آن به دمای محیط نزدیکتر بود، که نشان‌دهنده ثبات هوازی بالاتر است. به‌طور کلی، باکتری‌های تلقیحی باعث بهبود پایداری هوازی سیلاژهای ذرت شدند، که با استیک‌اسید بالاتر از میزان سیلاژ شاهد نشان داده شد (جدول ۳). بهترین نتیجه در هنگام قرار گرفتن در معرض هوا در سیلاژ تلقیح شده با سویه‌ی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد. این نتیجه ممکن است توسط بالاتر بودن غلظت اسیداستیک، پروپیونیک‌اسید و ۱،۲-پروپان‌دی‌ال ایجاد شود. در این سیلاژ، حضور مخمرها کمتر مشاهده شد، لذا با سرعت کمتری گرم شد و پایدارتر بود (جدول ۳). اثر اسیداستیک بر کنترل مخمرها برای افزایش پایداری هوازی سیلاژ توسط محققین توصیه شده‌است. به‌گفته این محققان، افزایش غلظت اسیداستیک در سیلو باعث مهار رشد مخمر و قارچ‌ها شده و ثبات هوازی را بهبود می‌بخشد (۱۳، ١٤، ۱۵ و ۲۰).

شکل ۱-تغییرات در دما طی قرارگرفتن سیلاژ در معرض هوا؛ سیلوی شاهد و سیلوهای تلقیح شده با باکتری‌های اسیدلاتیک

Figure 1. Variation in temperature during aerobic exposure of silages; control and inoculated silage with strains of lactic acid bacteria.

در این مطالعه، علاوه بر داده‌های دمای سیلاژ، حداکثر دما و زمان مورد نیاز برای دستیابی به‌این دما محاسبه شد (جدول٤). تفاوت معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) بین تیمارها برای این دو متغیر مشاهده شد. بالاترین دمای حداکثر در سیلاژ شاهد مشاهده شد و دمای حداکثر در سایر سیلاژها پایین‌تر و تقریباً مشابه یکدیگر بود (جدول ٤). سیلاژهای تیمارشده زمان بیشتری برای دستیابی به حداکثر دما لازم داشتند (به‌طور متوسط ۹۱ ساعت)، در حالی‌که در سیلاژ شاهد ۳٦ ساعت زمان برای رسیدن به حداکثر دما طول کشید (شکل ۱). پس از بازکردن سیلوها، طی قرار گرفتن در معرض هوا، سیلاژ شاهد پس از ٦٦ ساعت شروع به گرم شدن کرد؛ بعد از ۷۲ ساعت پایداری هوازی آن از بین رفت و بیش از دو درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای محیط افزایش دما داشت و بعد از ۱۰۸ ساعت دمای آن به حداکثر دما (۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد) رسید. در سیلاژ محتوی باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که بالاترین پایداری هوازی را نشان داد پس از ۱۹٦ ساعت دمای سیلاژ بیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط شد و پس از ۲٦۵ ساعت به حداکثر دما (هفت درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط) رسید. در داده‌های پایداری هوازی، وقتی دمای سیلاژها دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط را نشان دادند، اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۰۰۱) مشاهده شد (شکل ۱، جدول ۳).

جدول٤- دینامیک دمایی سیلوهای ذرت تلقیح شده با و بدون سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک هنگام قرار گرفتن در معرض هوا

Table 4. Dynamics of temperature during aerobic exposure of maize silages without inoculants and inoculated with strains of lactic acid bacteria (LAB)

پایداری هوازی (ساعت) Aerobic stability (h)	زمان (ساعت) Time to reach maximum temperature (h)	حداکثر دما (°C) Maximum temperature (°C)	تیمارها (سیلوهای آزمایشی) Treatments
72[d]	108[e]	38.5[a]	شاهد (کنترل) Control
156[b]	241[b]	31[d]	*لاکتوباسیلوس سالیواریوس* (LS) *Lactobacillus salivarius*
120[c]	223[d]	33[b]	*پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی*(PA) *Pedicoccus acidilatici*
196[a]	265[a]	30[e]	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (LF) *Lactobacillus fermentum*
120[c]	232[c]	32[c]	*انتروکوکوس فاسیوم* (EF) *Enterococcus faecium*
0.0001	0.0001	0.0001	P-Value سطح معنی‌داری
0.15	0.29	0.16	SEM اشتباه‌معیارمیانگین

[a,b,c,d,e] میانگین‌ها در هر ردیف با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$).

[a,b,c,d,e]The means within the same row with different letter have significant difference ($P< 0.05$)

نتیجه‌گیری کلی

روش پیش انتخاب بر اساس تولید متابولیت‌ها در انتخاب سویه‌های جدید تلقیحی و همبستگی بالا با سیلوهای آزمایشگاهی، کارآمد بود. استفاده از مواد تلقیحی باکتریایی باعث بهبود مشخصات میکروبیولوژیکی و کاهش تولید اتانول در سیلاژهای ذرت شد. باکتری‌های هترولاکتیک کارآمدتر از باکتری‌های هموالاکتیک بودند، اما، سویه‌های مختلف از گونه‌های مشابه باکتری‌ها در طی فرآیند تخمیر متفاوت عمل‌کردند، این مطلب نشان می‌دهد که استفاده از مواد تلقیحی باکتری برای سیلاژها باید با توجه به سویه‌های باکتری، گیاه علوفه‌ای که از آن برای سیلوشدن استفاده می‌شود و شرایط سیلوکردن ارزیابی شود. سویه‌های ۷ و ١٦، که به‌ترتیب، به‌عنوان *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* شناخته شدند، منابع امیدوارکننده‌ای برای استفاده به‌عنوان ماده تلقیحی در سیلاژ ذرت در نظر گرفته شدند. زیرا آن‌ها سیلاژهایی با ویژگی‌های تخمیری بهتر و پس از مواجهه با هوا، سبب بهبود پایداری هوازی شدند. به‌طور خلاصه می‌توان بیان کرد که، در میان تیمارها، سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* دارای غلظت استات بالاتر، اما غلظت لاکتات و تعداد مخمر کمتر نسبت به سایر سیلاژها بود. همچنین، تلقیح سیلاژ با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (سویه‌ی ١٦) منجر به سیلاژی با جمعیت باکتری‌های اسیدلاکتیک بیشتر و بهبود پایداری هوازی پس از در معرض قرار گرفتن هوا شد. سیلاژهای تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و به‌دنبال آن *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* حاوی کمترین تعداد مخمر در طول تخمیر بودند. بین سیلاژها، سیلاژ تلقیح شده با لاکتوباسیلوس فرمنتوم، پایداری هوازی بالاتری را نشان داد. با این حال، برای ارزیابی کارایی این سویه‌ها در سیلوهای مقیاس بزرگ، مطالعات بیشتری لازم است.

منابع

1. Addah, W., Baah, J., Groenewegen, P., Okine, E.K. and McAllister, T.A. 2011. Comparison of the fermentation characteristics, aerobic stability and nutritive value of barley and corn silages ensiled with or without a mixed bacterial inoculant. Canadian Journal of Animal Science. 91:133–146.
2. AOAC. 1990. Official methods of analysis, 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, USA.VA. Pp:69-90.
3. Assis, F.G. do val de, Avila, C.L. da silva, Pinto, J.C. and Schwan, R.F. 2014. New inoculants on maize silage fermentation. Revista Brasileira de Zootecnia. 43(8):395-403.
4. Avila, C.L.S., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P. and Schwan, R.F. 2009. Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. Grass Forage Science. 64:384–394.
5. Avila, C.L. da silva., Valeriano, A.R., Pinto, J.C., Figueiredo, H.C.P., Rezende, AV.D. and Schwan, R.F. 2010. Chemical and microbiological characteristics of sugar cane silages treated with microbial inoculants. Revista Brasileira de Zootecnia. 39:25–32.
6. Avila, C.L.S., Carvalho, B.F., Pinto, J.C., Duarte, W.F. and Schwan, R.F. 2014. The use of lactobacillus species as starter cultures for enhancing the quality of sugar cane silage. Journal of Dairy Science. 97:940–951.
7. Chen, L., Yuan, X. Jun, Li, J. feng, Wang, S. Ran, Dong, Z. and Shao, T. 2017. Effect of lactic acid bacteria and propionic acid on conservation characteristics, aerobic stability and in vitro gas production kinetics and digestibility of whole-crop corn based total mixed ration silage. Journal of Integrative Agriculture. 15(7):1592–1600.
8. da Silva, T.C., da Silva, L.D., Santos, E.M. and Oliveira, J.S. 2017. Importance of the fermentation to produce high-quality silage. In: Jozala AF (Ed), Fermentation process. Croatia**.** Pp:1-22.
9. Filya, I. 2004. Nutritive value and aerobic stability of whole crop maize silage harvested at four stages of maturity. Animal Feed Science and Technology. 116:141–150.
10. Kung, L. and Shaver, R. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage. 3:1–5.
11. Kung, L., Shaver, R.D., Grant, R. J. and Schmidt, R.J. 2018. Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. Journal of Dairy Science. 101:4020–4033.
12. Lee, S.S., Lee, H.J., Paradhipta, D.H.V., Joo, Y.H., Kim, S.B. and Kim, D.H.. 2019. Temperature and microbial changes of corn silage during aerobic exposure. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 32:988–995.
13. Nkosi, B.D., Meeske, R., Palic, D., Langa, T., Leeuw, K.J. and Groenewald, I.B. 2009. Effects of ensiling whole crop maize with bacterial inoculants on the fermentation, aerobic stability, and growth performance of lambs. Animal Feed Science and Technology. 154:193–203.
14. Nkosi, B.D., Meeske, R., Langa, T. and Thomas, R.S. 2011. Effects of bacterial silage inoculants on whole-crop maize silage fermentation and silage digestibility in rams. South African Journal of Animal Science. 41:350–359.
15. Nkosi, B.D., Vadlani, P.V., Brijwani, K., Nanjunda, A. and Meeske, R. 2012. Effects of bacterial inoculants and an enzyme on the fermentation quality and aerobic stability of ensiled whole-crop sweet sorghum. South African Journal of Animal Science. 42:232–240.
16. Nkosi, B.D., Meeske, R., Muya, M.C., Langa, T., Thomas, R.S. and Malebana, I.M.M. 2019. Microbial additives affect silage quality and ruminal dry matter degradability of avocado (*Persia Americana*) pulp silage. South African Journal of Animal Science. 49:997–1007.
17. Oude Elferink, S.J.W.H., Krooneman, J., Jan, C., Spoelstra, S.F., Faber, F. and Elferink, S.O. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1,2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. Applied and Enviromental Microbiology. 67:125–132.
18. Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Elferink, S.J.W.H.O. and Spoelstra, S.F. 2003.

Microbiology of ensiling. In: Buxton DR, Muck RE and Harrison JH (Eds.), Silage Science and Technology, Vol 42, the American Society of Agronomy, Inc., USA. Pp:31-93.
19. Pang, H., Zhang, M., Qin, G., Tan, Z., Li, Z. and Wang, Y. 2011. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. Journal of Animal Science. 82:642–653.
20. Ranjit, N.K. and Kung, L. 2000. The effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a chemical preservative on the fermentation and aerobic stability of corn silage. Journal of Dairy Science. 83:526–535.
21. Saarisalo, E., Skyttä, E., Haikara, A., Jalava, T. and Jaakkola, S. 2007. Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. Journal of Applied Microbiology. 102:327–336.
22. Santos, A.O., Ávila, C.L.S. and Schwan, R.F. 2013. Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. Journal of Dairy Science. 96:7777–7789.
23. Santos, A.O., Ávila, C.L.S., Pinto, J.C., Carvalho, B.F., Dias, D.R. and Schwan, R.F. 2016. Fermentative profile and bacterial diversity of corn silages inoculated with new tropical lactic acid bacteria. Journal of Applied Microbiology. 120:266–279.
24. Silva, L.D., Pereira, O.G., Silva, T.C., Leandro, E.S., Paula, R.A. and Santos, S. A. 2018. Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. Grass Forage Science. 73:660–670.
25. Tabacco, E., Righi, F., Quarantelli, A. and Borreani, G. 2011. Dry matter and nutritional losses during aerobic deterioration of corn and sorghum silages as influenced by different lactic acid bacteria inocula. Journal of Dairy Science. 94:1409–1419.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 9(2), 2021
http://ejrr.gau.ac.ir

Screening and selection of lactic acid bacteria suitable for enhancing the quality of maize silage

N. Aghamohamadi[1], *F. Hozhabri[2] and D. Alipour[3]
[1]Ph.D. Student, [2]Associate Prof., Dept., of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran, [3]Associate Prof., Dept. of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
Received: 11/11/2020; Accepted: 12/29/2020

Abstract

Background and objectives: The effects of lactic acid bacteria as a microbial additive on the fermentation properties of silage are mainly due to the production of beneficial metabolites that can inhibit the growth of pathogenic and destructive microorganisms. Therefore, the ability of a strain to use numerous substrates in forage plants and produced different metabolites can be useful in competition with other microorganisms. This ability can be used as a principle for selecting inoculants. Nevertheless, research has shown that published articles on inoculant selection to limit the growth of these destructive and pathogenic microorganisms are still scarce. Some researchers have reported the effects of microbial inoculants on silage fermentation. However, despite numerous articles on the effects of inoculants on silage fermentation, there are few descriptions for the systematic selection of strains. The aim of this study was to isolate, identify, and select strains of lactic acid bacteria with the ability to improve fermentation properties and prevent the growth of pathogenic and destructive microorganisms and evaluate the effect of inoculation of these strains on the nutritional value and aerobic stability of maize silages.

Materials and methods: This study was performed to select the lactic acid bacterial (LAB) strains isolated from different sources and evaluate their effect on the quality of maize silage. Lactic acid bacteria strains were inoculated to evaluate metabolite production and pH reduction in the aqueous extract obtained from maize forage. One hundred and twenty-one strains were isolated from various sources in the laboratory. All isolated strains were gram-positive, catalase-negative, and mainly lactic acid-producing, which were considered lactic acid bacteria. 16S ribosomal DNA sequence analysis of 22 representative strains was used to confirm the presence of dominant groups. The sequences of different isolates of lactic acid bacteria had a high degree of similarity to the GeneBank type strains, which showed between 99 and 100% similarity. Four strains of lactic acid bacteria that showed the best results were evaluated in experimental silos. This experiment was performed in a completely randomized design with five treatments (four strains of lactic acid bacteria and one control without inoculum) and nine replications. Inoculants were used in 10^6 colony forming units/g of fresh forage to chopped maize forage, which was then ensiled for 105 days. After opening the silos, silages were sampled for analysis of chemical compositions and fermentation products.

Results: Inoculation of lactic acid bacterial strains affected the chemical composition, fermentation properties, and microbial population. Inoculation of lactic acid bacterial strains significantly affected the chemical composition and concentration of lactic and acetic acids, ethanol, and 1,2-propanediol of silage. Among all treatments, silages inoculated with *Lactobacillus fermentum* had higher acetate concentration ($P<0.0001$), but lactate concentration ($P<0.008$) and yeast counts ($P<0.0001$) were lower than other silages. Also, inoculation of

*Corresponding author; hozhabri@razi.ac.ir

silage with *L. fermentum* (strain 16) resulted in silage with a higher lactic acid bacterial population and improved aerobic stability after air exposure (P<0.0001). Silages inoculated with *L. fermentum* and fallowed by *Lactobacillus salivarius* contained the lowest number of yeasts (P<0.0001) and filamentous fungi during fermentation. Between silages, silage inoculated with *L. fermentum* showed higher aerobic stability (P<0.0001).

Conclusion: The pre-selection method based on the production of metabolites was efficient in selecting new inoculation strains along with good correlation with experiments in laboratory silos. Inoculation of lactic acid bacterial strains in maize silage resulted in differences in nutritional value or population of pathogenic and destructive microorganisms. Strains 16 and 7, identified as *L. fermentum* and *L. salivarius*, were considered promising sources for use as inoculants in maize silages because they provide silages with better fermentation properties and improve aerobic stability after exposure to air.

***Keywords*:** Acetic acid, Aerobic stability, Gram positive, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus salivarius*, Propanediol