JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره دوم، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۳: ۷۱-۶۵

جداسازی و شناسایی باکتری‌های مصرف‌کننده اسیدلاکتیک در شکمبه گاو و اثر آنها در کنترل اسیدوز در شرایط آزمایشگاهی

رضا صدیقی وثاق[۱] و داریوش علیپور[۲،*]

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲- دانشیار تغذیه نشخوارکنندگان، گروه علوم دامی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: ۳ آبان ۱۳۹۴ *تاریخ پذیرش ۱۲ خرداد ۱۳۹۵*

چکیده

هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتریهای مصرف کننده اسیدلاکتیک و بررسی پتانسیل آنها در کنترل اسیدوز شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود. مایع شکمبه از سه رأس گاو هلشتاین جمع آوری گردید و جداسازی باکتری با استفاده از محیط کشت اختصاصی صورت گرفت. خصوصیات جدایه ها بر اساس شکل و رنگ آمیزی گرم، تولید ایندول، فعالیت کاتالازی و تخمیر برخی قندها بررسی شد. شناسایی جدایه ها با استفاده از توالی یابی نوکلئوتیدی انجام گرفت. نتایج توالی یابی نشان داد که جدایه‌ها بیشترین خویشاوندی را با مگاسفرا السدنی DSM20460 داشتند. در مرحله بعد اثر جدایه ها بر کاهش اسیدلاکتیک و کنترل pH در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. مقدار یک گرم خوراک سریع التخمیر و ۱۰ میلی لیتر مایع شکمبه درون ویال های شیشه‌ای قرار داده شد و از هر جدایه دو دوز ۰/۵ و ۱ میلی لیتر به هرکدام تلقیح شد. ویال ها به مدت ۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. تولید گاز، pH و اسیدلاکتیک هر نمونه اندازه گیری شد. استفاده از باکتری، غلظت اسیدلاکتیک را کاهش و تولید گاز و pH را افزایش داد ($p<۰/۰۰۰۱$). نتایج نشان داد باکتریهای مصرف کننده اسیدلاکتیک، پتانسیل کنترل اسیدوز شکمبه‌ای را دارند.

کلمات کلیدی: *باکتری‌های مصرف کننده اسیدلاکتیک، مگاسفرا السدنی، pH، اسید لاکتیک*

* نویسنده مسئول: داریوش علیپور

آدرس: گروه علوم دامی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. تلفن

پست الکترونیک: alipourd@basu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

جمعیت میکروبی در شکمبه دام‌های نشخوارکننده، به طور معمول برای هضم علوفه مناسب است و تغذیه این دام‌ها با مقدار زیادی مواد کنسانتره‌ای، تخمیر سریع میکروبی در شکمبه را در پی داشته و باعث کاهش pH می‌شود (۳،۸ و ۱۳). اسیدوز توسط کاهش pH مشخص می‌شود که ناشی از تجمع اسیدهای آلی و تغییر تعادل میکروارگانیسم‌های شکمبه است (۷). بیشتر بودن نرخ تولید اسیدهای چرب فرار توسط میکروب‌ها نسبت به نرخ جذب آنها از طریق اپیتلیوم شکمبه، منجر به تجمع این ترکیبات در شکمبه و کاهش pH می گردد. کاهش pH تغییری را در الگوی تخمیر جمعیت میکروبی شکمبه از اسیدهای چرب فرار (VFA) به سمت اسید لاکتیک ایجاد می کند که به طور قابل توجهی قویتر از VFA است (۱۶) و سبب کاهش بیشتر pH می‌شود. لاکتات تشکیل شده در شکمبه ممکن است به سه روش حذف شود: عبور به بخش‌های پایین‌تر شکمبه- جذب مستقیم از شکمبه- تخمیر میکروبی (۳). باکتری‌های مصرف کننده لاکتات، اسید لاکتیک را متابولیزه کرده و بنابراین تجمع این محصول نهایی تخمیر را در شکمبه کنترل می‌نمایند، به ویژه وقتی جیره دام‌ها حاوی مقادیر بالای دانه است، این فرایند اهمیت بیشتری پیدا می کند (۱۱). از باکتری‌های مصرف کننده لاکتات می‌توان *مگاسفرا السدنی* و *سلونوموناس رومینانتیوم* را نام برد. به هرحال، تکثیر این باکتری‌ها در pH پایین که ناشی از تجمع اسید لاکتیک است، مهار می‌شود (۱). در چنین شرایطی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند سبب تقویت جمعیت این باکتری‌ها و تکثیر سریع‌تر آن‌ها شود (۱). *م. السدنی* یکی از مهمترین باکتری‌ها برای این منظور می‌باشد. حدوداً ۶۵ تا بیش از ۹۵ درصد اسیدلاکتیک داخل شکمبه توسط *م. السدنی* مورد استفاده قرار می گیرد (۱۷، ۱۵ و ۱۸) و بنابراین به منظور استفاده جهت کنترل وقوع اسیدوز شکمبه‌ای حائز اهمیت است. مطالعات درون تنی و آزمایشگاهی، نقش اساسیم. السدنی در مهار تجمع اسید لاکتیک در طول انتقال به جیره متراکم را نشان داده است (۸). کانگ و هسین (۸) گزارش کردند که استفاده از م. السدنی در شرایط آزمایشگاهی غلظت لاکتات را کاهش داد و pH را افزایش داد. بنابراین، این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مصرف کننده لاکتات از شکمبه گاوهای شیری و بررسی پتانسیل آنها در کنترل اسیدوز در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی

محتوبات شکمبه از سه رأس گاو نر جمع آوری گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه، ۵ گرم از محتوبات با ۴۵ میلی لیتر از محلول رقیق ساز بی هوازی (ADS) مخلوط و با استفاده از چهار لایه پارچه صافی متقال صاف شد. پس از صاف شدن، یک میلی‌لیتر از آن به ویال‌های حاوی ۹ میلی‌لیتر ADS منتقل و به این ترتیب تا رقت 10^{-9} رقیق شد. از رقت‌های 10^{-6}، 10^{-7}، 10^{-8} و 10^{-9} مقدار ۰/۲ میلی لیتر به لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های مصرف کننده لاکتات (۱۱) و آگار ذوب شده اضافه و روی یخ غلتانده شدند تا آگار منجمد شود. سپس لوله‌های کشت داده شده تا زمان رشد کردن کلنی در دمای ۳۹ درجه سانتی گراد مورد انکوباسیون قرار گرفتند. کلنی‌های منفرد به لوله‌های هانگیت حاوی محیط کشت مایع (بدون آگار) منتقل شدند. کشت متناوب در محیط کشت مایع و جامد تا زمان بدست آمدن جدایه‌های خالص ادامه یافت. خالص بودن جدایه‌ها، با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت و پس از اطمینان از خالص بودن، جدایه ها به محیط حاوی گلیسرول منتقل شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. شناسایی باکتری با روش توالی‌یابی نوکلئوتید و توسط مرکز ذخایر ژنتیک ایران انجام شد.

آزمایش‌های بیوشیمیایی

آزمون تولید ایندول با استفاده از معرف کواکس انجام شد (۱۰). فعالیت کاتالازی با افزودن آب اکسیژنه به محیط کشت حاوی باکتری تعیین شد (۱۲). تخمیر سوبسترای کربن (قندهای ساده)؛ تخمیر برخی از قندهای ساده در محیط کشت فنول قرمز بررسی شد. میزان ۵ گرم در لیتر از هر قند به محیط کشت فنول قرمز افزوده شد و پس از اتوکلاو، محیط کشت حاوی باکتری به آن تلقیح شد. تغییر رنگ قرمز به زرد بیانگر تخمیر قند مربوطه بود (۵).

بررسی پتانسیل مهار اسیدوز؛ پتانسیل جدایه‌ها در جلوگیری از کاهش pH و مهار اسیدوز، در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ایجاد شرایط اسیدوز لاکتیکی، از جیره‌ای شامل ۹۰ درصد گلوکز و ۱۰ درصدکاه جو استفاده شد. مایع شکمبه از طریق فیستولا از سه رأس قوچ مهربان جمع آوری گردید و پس صاف کردن با چهارلایه پارچه متقال، تحت گاز CO_2 قرار داده شد. مقدار یک گرم خوراک و ۱۰ میلی لیتر مایع شکمبه درون ویال‌های شیشه‌ای قرار داده شد و از هر جدایه دو دوز ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر به هرکدام تلقیح شد. یک تیمار آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین نیز در نظر گرفته شد. ویال‌ها به مدت ۶ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند. تولید گاز و pH هر نمونه اندازه گیری شد. غلظت اسیدلاکتیک نمونه‌ها با استفاده از رنگ سنجی و طبق روش فیگن‌اسچو و ماریس (۴) مورد اندازه گیری قرار گرفت.

بررسی آماری

داده‌های ثبت شده در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شدند. نتایج بدست آمده با برنامه آماری SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. برای مقایسه میانگن تیمارها از آزمون دانکن در سطح ۵٪ خطا استفاده شد.

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتپی و بیوشیمیایی جدایه ها

ویژگیها	جدایه			
	R1	R2	R3	R4
واکنش گرم	منفی	منفی	منفی	منفی
مورفولوژی	کوکسی	کوکسی	کوکسی	کوکسی
آزمون تولید ایندول	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
آزمون کاتالاز	منفی	منفی	منفی	منفی
تخمیر قندهای ساده				
گلوکز	مثبت	مثبت	مثبت	مثبت
سوکروز	کم	مثبت	مثبت	مثبت
لاکتوز	کم	کم	کم	کم
زایلوز	مثبت	مثبت	کم	کم
مالتوز	مثبت	مثبت	مثبت	کم
نزدیک‌ترین خویشاوند	*Megasphaera elsdenii* DSM 20460	*Megasphaera elsdenii* DSM 20460	*Megasphaera elsdenii* DSM 20460	*Megasphaera elsdenii* DSM 20460

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲-اثر تیمارهای آزماشی بر pH، تولید گاز و غلظت اسید لاکتیک

فاکتور	تیمار									
	R1[1]		R2		R3		R4		[2]VIR	شاهد	SEM
	۰/۵	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۱	۰/۵	۱			
pH	۴/۵۶^{cde}	۴/۶۳^{bc}	۴/۵۵^{de}	۴/۵۹^{cd}	۴/۵۷^{cde}	۴/۶۸^{b}	۴/۵۴^{de}	۴/۵۹^{cd}	۵/۰۱^{a}	۴/۵۳^{de}	۰/۰۲
تولید گاز	۱۴/۶۷^{bc}	۱۹/۰۱^{a}	۱۳/۷۲^{bc}	۱۸/۱۷^{a}	۱۵/۰۱^{b}	۱۹/۶۷^{a}	۱۴/۳۴^{bc}	۱۷/۷۴^{a}	۱۰/۴۹^{d}	۱۲/۷۱^{c}	۰/۶۷
اسید لاکتیک (میلی مول)	۶/۸۷^{cd}	۵/۵۴^{d}	۷/۳۹^{c}	۵/۹۱^{cd}	۷/۱^{cd}	۳/۲۹^{e}	۷/۴۵^{c}	۵/۹۱^{cd}	۹/۰۳^{b}	۱۷/۷۷^{a}	۰/۴۹

۱- از هر جدایه دو دوز (نیم و یک میلی لیتر) استفاده شد؛ ۲- آنتی بیوتیک ویرجنیامایسن

- اعداد با حروف متفاوت در یک سطر، اختلاف معنی دار دارند (p<۰/۰۰۰۱).

نتایج و بحث

ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌های بدست آمده در جدول ۱ ارائه شده است. هر چهار جدایه R1، R2، R3 و R4 بیش از ۹۹ درصد به باکتری *مگاسفرا السدنی* DSM20460 مشابهت داشتند.

تمام جدایه‌ها کروی و از لحاظ واکنشِ گرم، منفی بودند. نتایج آزمون تولید اینول نیز برای هر چهار جدایه مثبت بود. تولید ایندول نشان دهنده قابلیت باکتری برای تجزیه اسیدآمینه تریپتوفان به ایندول و مشتقات آن است (۱۲). متابولیت‌های حاصل از ایندول و اسکاتول می‌تواند سبب ایجاد طعم خاصی درمحصولات لبنی و گوشت دام‌ها شوند که ممکن است مورد پسند بعضی از مصرف کنندگان قرار نگیرد (۲). لذا باکتری‌های تولید کننده ایندول از اهمیت خاصی برخوردارند. میزان تخمیر قندهای سوکروز، زایلوز و مالتوز بین جدایه ها متغیر بود، اما تمام جدایه ها گلوکز را کامل و لاکتوز را به میزان کمی تخمیر نمودند.

نتایج حاصل از تست مهار اسیدوز در جدول ۲ ارائه شده است. از لحاظ pH، تیمار ویرجینیامایسین بالاترین مقدار و تیمار شاهد کمترین مقدار را نشان داد (p<۰/۰۰۰۱). pH تیمارهای حاوی یک میلی لیتر از جدایه‌های R1 و R3 به طور معنی داری از تیمار شاهد بالاتر بود. کمترین تولید گاز مربوط به تیمار ویرجینیامایسین بود و سطح یک میلی لیتر تمام جدایه‌ها تولید گاز را نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند (p>۰/۰۰۰۱)، بیشترین مقدار اسید لاکتیک را تیمار شاهد نشان داد و تمام جدایه ها نسبت به تیمار شاهد و ویرجینیامایسین اسید لاکتیک کمتری داشتند (p>۰/۰۰۰۱). کمترین میزان اسیدلاکتیک نیز در سطح یک میلی لیتر جدایه R3 مشاهده شد.

کانگ و هسین (۸) اثر باکتری *مگاسفرا السدنی* بر کاهش اسید لاکتیک را در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند و کاهش قابل توجهی را در مقایسه با تیمار شاهد مشاهده نمودند. مایسنر و همکاران (۱۴) گزارش کردند که استفاده از *مگاسفرا السدنی* 41125 *NCIMB* در شرایط آزمایشگاهی تولید گاز را افزایش و لاکتات را کاهش داد. لانگ و همکاران (۹) شرایط اسیدوز لاکتیکی را با استفاده از خوراک‌های سریع التخمیر ایجاد کرده و اثر باکتری *مگاسفرا السدنی H6F32* را بر غلظت اسیدلاکتیک و pH شکمبه مطالعه نمودند. نتایج نشان داد که استفاده از باکتری تجمع اسید لاکتیک را کاهش و pH را افزایش داد. هنینگ و همکاران (۶) اثر نه جدایه از باکتری *مگاسفرا السدنی* را بر کنترل اسیدوز شکمبه‌ای مطالعه نمودند و گزارش کردند که تمام

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه‌ها pH را نسبت به تیمار شاهد افزایش و اسید لاکتیک را کاهش دادند، اگرچه مقدار pH و اسیدلاکتیک بین جدایه‌های مختلف، متفاوت بود.

اگرچه ویرجینیامایسین pH را در سطح بالاتری نگه داشته است اما باید در نظر داشت که در مقابل تولید گاز و به عبارتی تخمیر و هضم را کاهش داده است. کاهش اسید لاکتیک در تیمار ویرجینیامایسین نیز ممکن است به دلیل همین کاهش در تخمیر باشد. تلقیح باکتری در عین حالی که از تجمع اسید لاکتیک ممانعت کرده است، تولید گاز را افزایش داده باشد.

نتیجه گیری

جدایه های بدست آمده در این آزمایش با احتمال بیش از ۹۹ درصد مشابه *مگاسفرا السدنی* DSM20460 بودند. استفاده از باکتری با افزایش تولید گاز همراه بود که می‌توان گفت سبب بهبود تخمیر شده است و از طرفی بالاتر بودن pH و کاهش غلظت اسید لاکتیک در تیمارهای حاوی باکتری نسبت به شاهد نشان می‌دهد که جدایه‌های بدست آمده، پتانسیل کنترل اسیدوز رادارا می‌باشند.

منابع

1. Aikman, P.C., Henning, P.H., Humphries, D.J., Horn, C.H. (2011). Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *Journal of Dairy Science* **94**: 2840-9.
2. Atwood, G., Li, D., Pacheco, D., Tavendale, M. (2006). Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1261-71.
3. Counotte, G.H.M., Prins, R.A., Janssen, R.H.A.M., Debie, M.J.A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-'3C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 649-55.
4. Figenschou, D.L., Maris, J.P. (1991). Spectrophotometric method for the determination of microquantities of lactic acid in biological material. *Journal of Analytical Biochemistry* **195**: 308-312
5. Harley, J.P., Prescott, L.M. (2002). L*aboratory exercises in microbiology*. 5rdedition.
6. Henning, P.H., Horn, C.H., Steyn, D.G., Meissner, H.H., Hagg, F.M., (2010). The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology* **157**: 13-9.
7. Krause, K. M., Oetzel, G.R. (2006). Understanding and preventing sub acuteruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* **126**: 215-36.
8. Kung, L., Hession, A.O. (1995). Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science* **73**: 250-6.
9. Long, M., Feng, W.J., Li, P., Zhang, Y., He, R.X., Yu, L.H., He, J.B., Jing, W.Y., Li, Y.M., Wang, Z., Liu, G.W. (2014). Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. *Research in Veterinary Science* **96**: 28-9.
10. MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp: 363-7.
11. Mackie, R.I., Heath, S. (1979). Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 416-21.
12. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. 12th edition. Pearson Education International, New York 4-25.
13. McDaniel, M.R., Higgins, J.J., Heidenreich, J.M., Shelor, M.K., Parsons, G.L., Henning, P.H., Drouillard J.S. (2009). Effects of *Megasphaera elsdenii* on ruminal pH, ruminal concentrations of organic acids, and bacterial genomes following a grain challenge. *Beef Cattle Research* 62-69.

Archive of SID

www.SID.ir

14. Meissner, H.H., Henning, P.H., Leeuw, K.J., Hagg, F.M., Horn, C.H.A., Kettunen Apajalahti, J.H.A. (2014). Efficacy and mode of action of selected non-ionophore antibiotics and direct-fed microbials in relation to *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 during in vitro fermentation of an acidosis-causing substrate. *LivestockScience* **162**: 115-25.
15. Meissner, H.H., Henning, P.H., Horn, C.H., Leeuw, K.J., Hagg, F.M.,Fouché G.. (2010). Ruminal acidosis: A review with detailed reference to the controlling agent *Megasphaera elsdenii*NCIMB 41125. *South African Journal of Animal Science* **40**: 79-100.
16. Owens, F.N., Secrist, D.S., Hill, W. J., Gill, D.R. (1998). Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* **76**: 275-286.
17. Piknova, M., Filova, M., Javorsky, P., Pristas, P. (2004). Different restriction and modification phenotypes in ruminal lactate-utilizing bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **236**: 91-5.
18. Thieszen, J., Van Bibber, C.L., Axman, J.E., Drouillard, J.S. (2015). Lactipro (*Megasphaera elsdenii*) increases ruminal pH and alters volatile fatty acids and lactate during transition to an 80% concentrate diet. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports* **1**: 1-5.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 2, 2016

Isolation and Identification of Lactic Acid Utilizing Bacteria from Cow Rumen and Their Effect on the Control of Acidosis in Vitro

Sedighi Vesagh, R.[1], Alipour, D.[2*]

1. Ph.D. student of Animal Nutrition, Department of Animal Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received Date: 25 October 2015 *Accepted Date: 1 June 2016*

Abstract

The aim of this study was the isolation and identification of lactic acid utilizing bacteria and evaluation of their potential to control ruminal acidosis in vitro. Rumen fluid was collected from three Holstein cow and Isolation was performed using aspecific medium. Characterization of isolates was evaluated based on the shape and gram staining, indole production, catalase activity and fermentation of some sugars. Identification of isolates was done using the nucleotide sequencing. The results of sequencing showed that the isolates had the most similarity with Megasphaera elsdenii DSM20460. In the next step, effect of isolates on reduction of lactic acid and control of pH was examined. One gram of easily fermentable feed and 10 ml rumen fluid added to glass vials and inoculated with two doses of each isolate (5.0 and 1 ml) then, incubated for 6h. Gas production, pH and lactic acid for each sample were measured. Use of bacteria decreased lactic acid concentration and increased gas production and pH ($p<0.0001$). The results showed lactic acid utilizing bacteria has potential to control of rumianal acidosis.

Keyword: *Lactic acid utilizing bacteria; Megasphaera elsdenii; pH; Lactic acid*

**Corresponding author: Alipour, D.*
Address: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran. Tel:
Email: alipourd@basu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir