



تأثیر استفاده از کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم و پارامترهای تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

جواد بیات کوهسار^۱ - عبدالمنصور طهماسبی^{۲*} - عباسعلی ناصریان^۲ - رضا ولی‌زاده^۲ - رشید صفری^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۹/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۹/۰۴

چکیده

به منظور بررسی اثر کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی، pH، غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای و غلظت اسیدهای چرب فرار سه سری آزمایش در شرایط آزمایشگاهی طراحی شد. سوبه‌های خالص باکتریایی شامل پروپیونی باکتریوم فریدرینریچی و انتروکوکوس فیسیوم از مرکز پژوهش‌های علمی صنعتی ایران خریداری شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار مکمل شده با پروپیونی باکتریوم فریدرینریچی، (۳) تیمار مکمل شده با انتروکوکوس فیسیوم و (۴) تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی باکتریوم فریدرینریچی و انتروکوکوس فیسیوم بودند. مایع شکمبه از سه گوسفند دارای فیستوله شکمبه‌ای به‌دست آمد. در همه آزمایش‌ها از یک جیره پایه با نسبت کنسانتره به علوفه ۹۰:۱۰ استفاده شد. در آزمایش دوم مقدار یک میلی‌لیتر ساکارز ۱۰ درصد به محیط کشت تزریق و در آزمایش سوم pH محیط کشت در نقطه ۵/۵ تعدیل شد. نتایج نشان داد که تیمار شاهد در پایان مدت انکوباسیون پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشت ($P < 0.05$). غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در تمامی تیمارها در ساعت ۲ انکوباسیون پایین‌ترین مقدار بود و با پیشرفت زمان انکوباسیون افزایش یافت. بین تیمارها از نظر نسبت استات به پروپیونات اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تیمارهای مکمل شده با پروپیونی باکتریوم و مخلوط پروپیونی باکتریوم و انتروکوکوس پایین‌ترین نسبت را داشتند ($P < 0.05$). به طور کلی، افزودن کشت‌های زنده باکتریایی در جیره‌های غذایی می‌تواند تأثیر مثبت و معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و غلظت اسیدهای چرب فرار داشته باشد که این تغییرات با تثبیت pH شکمبه‌ای همراه بود که شرایط را برای فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه مساعدتر می‌کند.

واژه‌های کلیدی: اسیدهای چرب فرار، شرایط آزمایشگاهی، قابلیت هضم، کشت‌های زنده باکتریایی، نیتروژن آمونیاکی

مقدمه

راندمان خوراک و افزایش وزن روزانه در گاوهای گوشتی استفاده شده‌اند (۱۲). شواهدی دال بر اثرات سودمند کشت‌های زنده باکتریایی بر شکمبه، به‌ویژه کمک به جلوگیری از اسیدوز شکمبه‌ای وجود دارد. سم‌زدایی ۳- هیدروکسی-۴- پیریدون یکی از مهمترین موارد موفق از دستکاری تخمیر شکمبه‌ای با باکتری‌ها است (۹). کشت‌های زنده میکروبی در مقایسه با یونوفرها که معمولاً برای باکتری‌های هدفشان کشنده هستند، معمولاً رشد باکتری‌های شکمبه‌ای را تحریک می‌کنند. پژوهش‌های زیادی در ارتباط با کشت‌های مخمر و قارچ در بهبود تخمیر میکروبی و بازدهی در شکمبه (۱۰، ۱۱، ۱۳، ۱۶، ۳۳ و ۳۷) و اسیدوز لاکتیکی (۴) انجام شده است. با این حال، اخیراً توجه محققین به استفاده از ارگانیسم‌های باکتریایی با هدف بهبود تخمیر میکروبی در شکمبه و عملکرد حیوان معطوف شده است. کرهیل و همکاران (۱۲) گزارش کردند که تغذیه کشت زنده باکتریایی دارای پروپیونی باکتریا و لاکتوباسیل سبب افزایش کلی ۲/۵ تا ۵ درصدی در میانگین افزایش روزانه و تقریباً ۲ درصد بهبود در بازدهی خوراک در گاوهای پروری شده است.

با توجه به نگرانی روزافزون در استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و دیگر محرک‌های رشد در صنعت خوراک دام و تأکید بر کاهش یا عدم استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها جهت درمان بیماری‌ها (۱۰)، توجه به اثرات کشت‌های زنده میکروبی به‌عنوان پروبیوتیک بر سلامتی و عملکرد حیوان اهمیت یافته است. پروبیوتیک‌ها، مکمل‌های زنده میکروبی خوراکی هستند که به طور سودمندانه‌ای تعادل میکروبی روده را بهبود می‌دهند (۳). برای نشخوارکنندگان، کشت‌های زنده میکروبی به‌عنوان جایگزینی بالقوه برای کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در گوساله‌های نوزاد و تحت استرس، افزایش تولید شیر در گاوهای شیری و بهبود

۱- استادیار گروه علوم دامی، دانشگاه گنبد کاووس

۲- استاد گروه علوم دامی، دانشگاه فردوسی مشهد

۳- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
* نویسنده مسئول: (Email: a.tahmasbi@protonmail.ch)

DOI: 10.22067/ijasr.v10i3.41229

تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و تولید کشت‌های باکتریایی

در این آزمایش، سویه‌های باکتریایی شامل: پروپیونی‌باکتریوم فریدرینریچی (*Propionibacteria feriderinrichi*) (PTCC ۱۶۷۴) و انتروکوکوس فیسیوم (*Enterococcus faecium*) (PTCC ۱۲۳۸) در داخل ویال‌های شیشه‌ای به صورت پودر خشک شده انجمادی از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شدند. فعال‌سازی اولیه باکتری‌ها مطابق دستورالعمل انجام و استریل گردید. انتروکوکوس فیسیوم در محیط کشت Brain Heart Infusion (BHI) و پروپیونی‌باکتریوم فریدرینریچی در محیط کشت Sodium Lactate Broth (SLB) محیط کشت‌ها در داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت شرایط غیرهوازی، تا زمان رشد و ظهور کلونی، قرار داده شدند. پس از فعال‌سازی و اطمینان از رشد سویه‌های باکتریایی، مقدار یک میلی‌لیتر از این سویه‌های باکتریایی به لوله‌های آزمایشی حاوی ۹ میلی‌لیتر از محیط کشت مربوط به هر سویه که قبلاً استریل شده بود منتقل و داخل انکوباتور قرار داده شد. شمارش باکتری‌ها با استفاده از روش PCA (Plate Count Agar)، انجام شد. هر بار که اقدام به تهیه کشت تازه می‌شد، یک لوله تازه به‌عنوان کشت مرجع تهیه و نگهداری می‌شد. جهت به‌دست آوردن جمعیت باکتریایی مورد نظر (۱۰^۸ واحد تشکیل کلونی) برای استفاده در آزمایش، ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش، اقدام به تهیه کشت تازه شد. لوله‌های آزمایشی حاوی باکتری‌ها سانتریفیوژ شد و توده باکتریایی جمع شده در ته لوله با افزودن یک میلی‌لیتر از مایع بالایی سانتریفیوژ شده جهت تزریق به داخل ویال‌ها برداشته شد.

تخمیر در شرایط *in vitro* با استفاده از روش *Batch culture*

مایع شکمبه از سه راس گوسفند دارای فیستولای شکمبه‌ای (۴۵ ± ۲/۵ کیلوگرم)، سه ساعت بعد از تغذیه صبح جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه مایع شکمبه با استفاده از پارچه تنزیب چهار لایه صاف و برای حفظ شرایط بی‌هوازی گاز CO₂ تزریق شد. محلول بافر مطابق روش گوئرینگ و ون‌سوست (۸) تهیه و با شیرابه شکمبه با نسبت ۱:۱ مخلوط و pH آن در نقطه ۶/۸ تعدیل شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) تیمار شاهد، (۲) تیمار مکمل شده با پروپیونی‌باکتر فریدرینریچی، (۳) تیمار مکمل شده با انتروکوکوس فیسیوم و (۴) تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی‌باکتر فریدرینریچی و انتروکوکوس فیسیوم بود. سه سری آزمایش با استفاده

تحقیقات اخیر نشان داده است که کشت‌های زنده باکتریایی مانند باکتری‌های تولیدکننده و مصرف‌کننده اسیدلاکتیک و باکتری‌های سلولولیتیک برای تغییر کارکرد شکمبه، درمان ناهنجاری‌های شکمبه‌ای و بهبود عملکرد حیوان و موارد ایمنی غذایی کارآمد می‌باشند (۱۷ و ۱۹). مکمل‌سازی ترکیبی از گونه‌های باکتریایی پروپیونی‌باکتریوم و لاکتوباسیلوس ممکن است راهکار عملی برای افزایش بازدهی انرژی در تغذیه حیوانات تغذیه شده با کنسانتره بالا باشد. باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک (لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس) ممکن است به جلوگیری از اسیدوز شکمبه‌ای در گاوهای شیری کمک کنند (۶ و ۲۳)؛ چون به طور بالقوه حضور این باکتری‌ها باعث می‌شود که میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای با حضور اسید لاکتیک در شکمبه سازگار شوند (۳۷). نوکک و همکاران (۲۳) گزارش کردند گاوهای شیری دریافت‌کننده انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با جیره کنترل، کاهش روزانه pH شکمبه و pH شکمبه‌ای زیر ۵/۵ کمتری داشتند.

پروپیونی‌باکتری ساکنان طبیعی شکمبه بوده که حدود ۱/۴ درصد از میکروفلور طبیعی شکمبه را تشکیل داده و اسید استیک و پروپیونیک تولید می‌کنند (۲۴). توانایی در کاهش تولید متان از طریق جایگزینی استات با پروپیونات، جلوگیری از انباشتگی لاکتات (۱۳) و (۲۲) به همراه توانایی پروپیونی‌باکتری در رشد در محیط دارای اسید لاکتیک باعث کاهش اتلاف انرژی به شکل متان و بهبود بازدهی استفاده از انرژی در شکمبه و در نهایت تولید حیوان می‌شود. اسید پروپیونیک مهمترین پیش‌ساز ساخت گلوکز بوده و از این رو، تأثیر اساسی بر آزادسازی هورمونی و توزیع بافتی مواد مغذی دارد (۲۰). زمانی که نسبت اسید استیک بالا باشد، اسید پروپیونیک برای ساخت گلوکز ناکافی بوده و اسیدهای آمینه گلوکوژنیک مورد استفاده قرار می‌گیرند. استفاده از اسیدهای آمینه گلوکوژنیک برای ساخت گلوکز از استفاده‌شان برای ساخت پروتئین خواهد کاست و هزینه نگهداری پروتئین قابل متابولیسم و خروجی آمونیاک را افزایش می‌دهد (۲۲). در نتیجه، مصرف مواد مغذی به تأخیر افتاده و به‌دنبال آن تقاضای مواد مغذی در طی اوایل شیردهی، به‌ویژه در گاوهای شیری، افزایش می‌یابد. از این رو، تأمین شکمبه‌ای اسید پروپیونیک ممکن است ناکافی باشد (۲۶). تغذیه مستقیم کشت‌های زنده باکتریایی مصرف‌کننده اسید لاکتیک ممکن است از کاهش pH شکمبه از طریق کاهش تولید اسید لاکتیک جلوگیری کند (۲۳). مطالعات اندکی در خصوص تأثیر کشت‌های زنده میکروبی (تولیدکننده و مصرف‌کننده اسید لاکتیک) بر فرآیندهای تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی انجام شده است. لذا هدف از انجام این مطالعه، ارزیابی تأثیر کشت‌های زنده باکتریایی پروپیونی‌باکتریوم فریدرینریچی (مصرف‌کننده اسید لاکتیک) و انتروکوکوس فیسیوم (تولیدکننده اسید لاکتیک) بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و مولفه‌های

از این تیمارها انجام شد که از جیره بر پایه کنسانتره (جدول ۱) با نسبت کنسانتره به علوفه (یونجه) ۹۰:۱۰ استفاده شد. با این تفاوت که در آزمایش دوم مقدار یک میلی‌لیتر ساکارز ۱۰ درصد به محیط

کشت تزریق شد و در آزمایش سوم pH محیط کشت (مخلوط بافر و مایع شکمبه) در نقطه ۵/۵ تعدیل گردید.

جدول ۱- ترکیب کنسانتره مورد استفاده در آزمایش (بر اساس درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredient composition (% DM basis) of the experimental concentrate

اقلام خوراکی Ingredients	درصد (%)
دانه ذرت Corn grain	30
دانه جو Barley grain	34
کنجاله سویا Soybean meal	8
دانه کتان Cottonseed	12
تفاله چغندر Sugar beet pulp	5
سوس گندم Wheat bran	10
کلسیم کربنات CaCO ₃	0.3
نمک Salt	0.2
مواد معدنی و مکمل ویتامینی Mineral and Vitamin Supplement ¹	0.5
ترکیبات شیمیایی Chemical composition	
پروتئین خام Crude protein	15.5
الیاف نامحلول در شوینده خنثی NDF	28.9
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی ADF	20.7
چربی خام EE	1.79
کربوهیدرات‌های غیر الیافی NFC	34
انرژی قابل متابولیسم (مگا کالری بر کیلوگرم ماده خشک) Metabolizable energy (Mcal/kg DM)	2.8
Premix contained (DM basis): 71g NaHCO ₂ kg ⁻¹ , 19g Mg kg ⁻¹ , 3g FeSO ₄ kg ⁻¹ , 0.2g MnO kg ⁻¹ , 0.3g ZnSO ₄ kg ⁻¹ , 0.3 g CuSO ₄ , 196 g CaSO ₄ , Vitamin A, 1000000 IU kg ⁻¹ , Vitamin D, 1000000 IU kg ⁻¹ , Vitamin E, 1000000 IU kg ⁻¹ , 0.4 g kg ⁻¹ antioxidant (B.H.T).	

۳۸/۶ درجه سلسیوس جهت انکوباسیون برای زمان‌های ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت قرار داده شدند.

نمونه‌گیری و آنالیز آماری

بعد از گذشت هر یک از زمان‌های مورد نظر، چهار ویال‌ها از هر

۵۰ میلی‌لیتر از مخلوط مایع شکمبه و بافر در حضور دی‌اکسیدکربن داخل ویال‌های شیشه‌ای که حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم ماده خشک جیره بودند، ریخته شد (چهار تکرار برای هر تیمار برای هر زمان). همزمان کشت‌های زنده باکتریایی آماده شده در شروع آزمایش به داخل ویال‌ها تزریق شدند. سر ویال‌ها به کمک درپوش پلاستیکی و پوشش آلومینیومی به طور کامل بسته و در حمام آب گرم با دمای

نتایج و بحث

تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در شرایط آزمایشگاهی

تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک و قابلیت هضم ماده آلی برای هر سه سری آزمایش در جدول‌های ۲ و ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در شرایط آزمایشگاهی با پیشرفت زمان انکوباسیون در تمام تیمارها روند افزایشی داشت. در آزمایش اول با استفاده از جیره پایه قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در ساعت ۲ انکوباسیون در تیمار حاوی پروپیونی باکتریوم بالاترین و تیمار حاوی انتروکوکوس پایین‌ترین مقدار بود ($P < 0.05$). در پایان مدت انکوباسیون (ساعت ۲۴ انکوباسیون)، تیمار شاهد در مقایسه با سایر تیمارها به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشت ($P < 0.05$). با این حال در ساعت ۲۴ انکوباسیون، بین تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی اختلاف معنی‌داری از نظر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی وجود نداشت. در آزمایش دوم که با استفاده از جیره پایه و تزریق ساکارز انجام شد، در ساعت ۲ انکوباسیون تیمار مکمل شده با انتروکوکوس به‌طور معنی‌داری پایین‌ترین مقدار قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشت ($P < 0.05$). در ساعت ۲۴ انکوباسیون تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی در مقایسه با تیمار شاهد به‌طور معنی‌داری قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی بالاتری داشتند ($P < 0.05$).

در آزمایش سوم، با تنظیم pH در نقطه ۵/۵ روند افزایشی در قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی مانند آزمایش‌های قبلی در کلیه تیمارها مشاهده شد. به طوری که در زمان ۴ ساعت پس از شروع انکوباسیون تیمارهای حاوی افزودنی‌های باکتریایی از قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی پایین‌تری برخوردار بودند که به تدریج این افت در قابلیت هضم با پیشرفت انکوباسیون جبران شد و در ساعت‌های ۱۲ و ۲۴ انکوباسیون تیمارهای حاوی افزودنی انتروکوکوس فسیوم (تیمارهای سوم و چهارم) بالاترین مقدار قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشتند. به‌طور کلی، روند تغییرات در قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در هر سه آزمایش مشابه بود و در پایان مدت انکوباسیون تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشت ($P < 0.05$). با اینکه تیمار مکمل شده با انتروکوکوس فسیوم در هر سه سری آزمایش در ساعت ۲ انکوباسیون پایین‌ترین قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی را داشت ($P < 0.05$)، اما در پایان مدت انکوباسیون بالاترین قابلیت هضم را داشت. تزریق ساکارز باعث شد که مقادیر عددی قابلیت هضم در ساعت‌های اولیه انکوباسیون در مقایسه با آزمایش اول و سوم بالاتر باشد که احتمالاً به خاطر قابلیت

تیمار از بن‌ماری خارج و جهت غیر فعال شدن فعالیت میکروبی در آب سرد قرار داده شدند و بلافاصله pH آن توسط pH متر دیجیتال (مدل ۶۹۱ Metrohm) اندازه‌گیری شد. در مرحله بعد محتویات داخل ویال‌ها توسط پارچه توری ظریف صاف و برای اندازه‌گیری نیتروژن آمونیاکی، ۱۰ میلی‌لیتر از آن گرفته شده و معادل هم حجم آن اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به آن افزوده و در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای اندازه‌گیری‌های اسیدهای چرب فرار در ساعت ۲۴، مقدار ۸ میلی‌لیتر از مایع صاف شده با ۲ میلی‌لیتر از اسید متافسفریک (۲۵ درصد) مخلوط و تا زمان اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از صاف نمودن محتویات کشت در زمان‌های ذکر شده، نمونه‌های حاصل به مدت ۴۸ ساعت در آون ۶۰ درجه سلسیوس خشک شده و درصد قابلیت هضم ماده خشک آن‌ها محاسبه شد. برای محاسبه قابلیت هضم ماده آلی، ماده خشک حاصل در کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و خاکستر و قابلیت هضم ماده آلی محاسبه شد. غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه با استفاده از دستگاه کجلدال (شرکت Tecator، سوئد) انجام شد. برای تعیین غلظت اسیدهای چرب فرار ابتدا نمونه‌ها پس از خروج از فریزر داخل یخچال گذاشته شد تا به تدریج یخ‌گشایی انجام شود. سپس نمونه‌ها در شرایط دمای آزمایشگاه گذاشته شد تا به دمای محیط برسند. درصد اسیدهای چرب فرار نمونه‌ها با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (مدل YongLIN 6100, UK) با دتکتور FID و ستون $0.2 \mu\text{m} \times 25 \text{mm}$ قطر $6.0 \text{m} \times$ (طول) تعیین گردید. هلیوم به‌عنوان گاز حامل استفاده شد و در دمای اولیه و پایانی به‌ترتیب روی ۵۵ و ۱۹۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. دمای دتکتور و اینجکتور نیز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. کرتونیک اسید (۱:۷ حجمی) به‌عنوان استاندارد داخلی به تمامی نمونه‌ها تزریق شد.

داده‌های مربوط به غلظت اسیدهای چرب فرار در قالب طرح کاملاً تصادفی و داده‌هایی که به صورت تکرار در زمان جمع‌آوری شدند (قابلیت هضم ماده خشک، قابلیت هضم ماده آلی، pH شکمبه‌ای و غلظت نیتروژن آمونیاکی) مطابق با طرح تکرار در زمان از رویه MIXED نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) آنالیز شد. مدل آماری طرح به شکل زیر بود:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + P_j + TP_{ij} + e_{ijk}$$

در این مدل: μ = اثر میانگین، T_i = اثر تیمار، P_j = اثر زمان، TP_{ij} = اثر متقابل زمان با تیمار و e_{ijk} = خطای آزمایشی بود. برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد خطا استفاده شد.

فراهم می‌کند. افزایش در قابلیت هضم ماده خشک در زمان ۲۴ انکوباسیون در تیمارهای سوم و چهارم که حاوی باکتری *انتروکوکوس فیسومیوم* هستند را می‌توان به سازگاری میکروفلورای شکمبه به تولید لاکتات درون شکمبه در اثر حضور چنین باکتری‌هایی نسبت داد (۲۵).

دسترسی میکروارگانیسم‌ها به منبع انرژی سهل‌التخمیر بوده که باعث افزایش فعالیت آنها شده است. بهبود در قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی در تیمار مکمل شده با پروپیونی باکتریوم را می‌توان به تأثیر این باکتری بر جلوگیری از کاهش pH در محیط شکمبه نسبت داد که از این طریق هضم ماده خشک را در حالت بهینه نگه داشته و با جلوگیری از کاهش pH زمینه را برای فعالیت بهینه میکروارگانیسم‌ها

جدول ۲- تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک در زمان‌های مختلف انکوباسیون جیره خوراکی در شرایط آزمایشگاهی (درصد)

Table 2- The effect of adding live bacterial culture on DM digestibility at different times of incubation in *in vitro* (%)

زمان‌های انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)	تیمارها Treatments ¹				SEM
	CON	P	E	P+E	
آزمایش ۱ (جیره شاهد) Experiment 1 (control diet)					
2	29.4 ^b	33.3 ^a	25.4 ^b	26.6 ^b	1.162
4	33.4	34.6	34.2	32.2	1.162
6	44.6 ^b	43.4 ^b	49.0 ^a	45.2 ^b	1.162
12	58.3	59.2	58.8	59.5	1.162
24	66.3 ^b	69.4 ^a	69.0 ^a	69.2 ^a	1.162
آزمایش ۲ (جیره پایه + ۱۰ درصد ساکارز) Experiment 2 (basal diet + 10% Saccharose)					
2	36.4 ^a	35.2 ^a	31.0 ^b	^a 34.6	1.145
4	38.2	37.1	37.8	40.4	1.145
6	40.6	40.8	40.0	41.6	1.145
12	63.2 ^a	62.9 ^a	58.9 ^b	57.6 ^b	1.145
24	65.0 ^b	68.8 ^a	69.8 ^a	69.8 ^a	1.145
آزمایش ۳ (جیره پایه، pH=۵/۵) Experiment 3 (basal diet, pH= 5.5)					
2	29.2 ^a	29.0 ^a	26.8 ^b	31.0 ^a	1.84
4	36.8 ^a	33.8 ^{ab}	35.4 ^{ab}	32.6 ^b	1.84
6	41.2 ^b	47.2 ^a	45.4 ^{ab}	42.4 ^b	1.84
12	50.7 ^b	56.7 ^a	49.6 ^b	54.1 ^{ab}	1.84
24	60.2 ^b	62.1 ^{ab}	^a 65.5	64.0 ^a	1.84

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

¹ CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii* + *Enterococcus Faecium*.

گزارش کردند گاوهای شیری دریافت‌کننده *انتروکوکوس* و *لاکتوباسیلوس* در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با جیره شاهد، کاهش در pH شکمبه روزانه و pH شکمبه‌ای زیر ۵/۵ کمتری داشتند.

تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر پارامترهای تخمیری شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی

تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر pH محیط در جیره بر پایه مواد خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ در سه سری آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است.

نوک و همکاران (۲۳) گزارش کردند که حضور باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک باعث حفظ سطحی از اسید لاکتیک در محیط شکمبه و در نتیجه تحریک رشد باکتری‌های مصرف‌کننده اسید لاکتیک و کاهش کل اسید لاکتیک قابل دسترس به همراه کاهش اسیدیته کل شکمبه‌ای می‌شود. این نتایج با نتایج آزمایش سوم که با تعدیل pH شکمبه‌ای در نقطه ۵/۵ همراه بود، تأیید می‌گردد. به طوری که عملکرد تیمارهای حاوی مکمل *انتروکوکوس فیسومیوم* بهتر از سایر تیمارها بوده که این فعالیت بهینه هضمی را می‌توان به تأثیر این باکتری بر سازگاری میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای به pH پایین نسبت داد (۳۷). نوک و همکاران (۲۳)

جدول ۳- تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده آلی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی (درصد)

Table 3- The effect of adding live bacterial culture on OM digestibility at different times of incubation in *in vitro* (%)

زمان‌های انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)	تیمارها Treatments ¹				SEM
	CON	P	E	P+E	
آزمایش ۱ (جیره شاهد) Experiment 1 (control diet)					
2	29.45 ^{ab}	33.26 ^a	26.31 ^b	26.94 ^b	1.58
4	33.96	35.57	35.78	33.47	1.58
6	45.03 ^b	45.26 ^b	49.89 ^a	46.73 ^b	1.58
12	59.15	59.68	57.68	60.52	1.58
24	67.15 ^b	69.94 ^a	70.42 ^a	69.00 ^a	1.58
آزمایش ۲ (جیره پایه + ۱۰ درصد ساکارز) Experiment 2 (basal diet + 10% Saccharose)					
2	36.84 ^a	35.57 ^a	30.53 ^b	34.31 ^a	1.2
4	39.57	40.42	39.78	41.26	1.2
6	41.73	41.41	40.0	40.42	1.2
12	60.78 ^b	64.18 ^a	59.89 ^b	58.84 ^b	1.2
24	65.05 ^b	69.89 ^a	70.73 ^a	70.73 ^a	1.2
آزمایش ۳ (جیره پایه، pH=۵.۵) Experiment 3 (basal diet, pH= 5.5)					
2	28.84	28.42	27.15	30.31	1.96
4	35.57	34.10	34.94	32.42	1.96
6	40.84 ^c	46.73 ^a	45.26 ^{bc}	42.73 ^c	1.96
12	51.10	51.63	51.10	53.94	1.96
24	59.94 ^b	60.26 ^{ab}	63.52 ^a	63.10 ^a	1.96

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

¹ CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii* + *Enterococcus faecium*.

پیش‌گرفت و تیمار شاهد با شیب تندتری کاهش نشان داد. در تمام ساعات‌های انکوباسیون، تیمار شاهد دارای اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵).

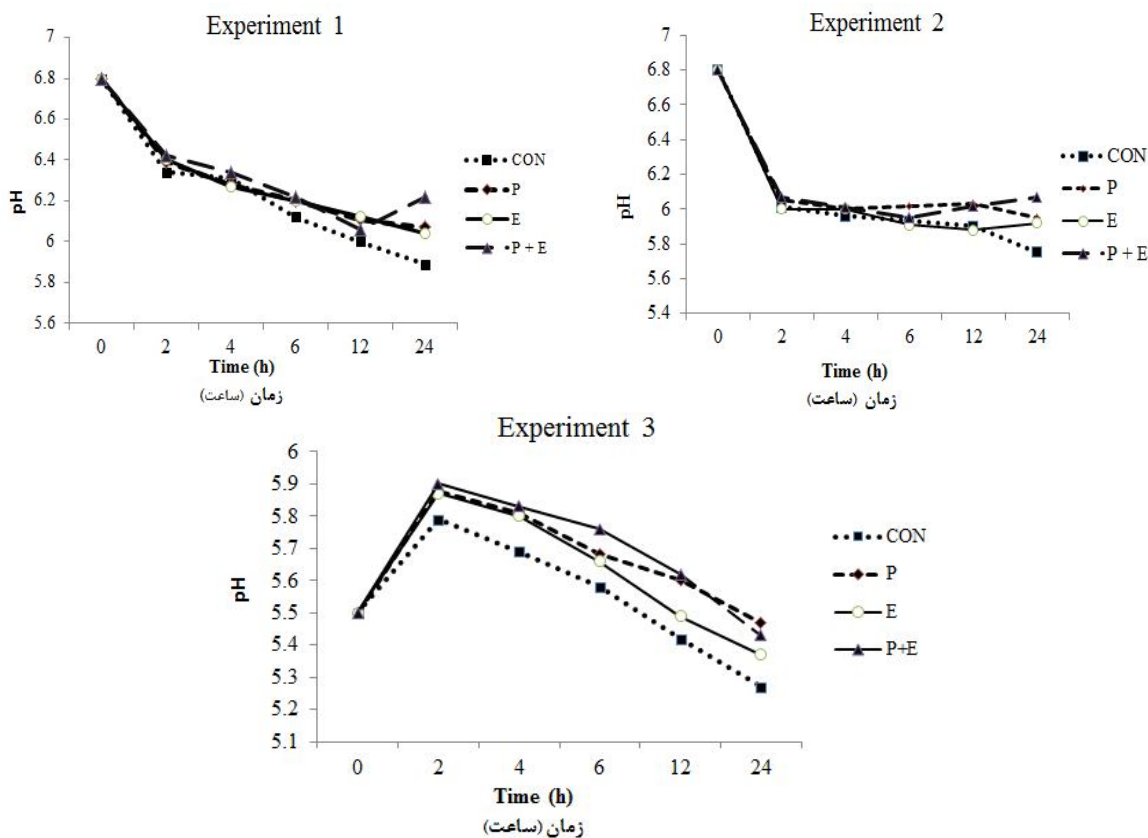
نتایج حاصل از تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۴ نشان داده شده است. این نتایج مربوط به دو آزمایش اول و دوم است و نتایج مربوط به آزمایش سوم نشان داده نشده است. در هر دو آزمایش اول و دوم تمامی تیمارها در ساعت ۲ انکوباسیون پایین‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی را دارا بودند که با پیشرفت زمان انکوباسیون این مقادیر افزایش یافت. در هر دو آزمایش، تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای مکمل شده با کشت‌های زنده باکتریایی پایین‌ترین غلظت نیتروژن آمونیاکی را دارا بود که همسو با نتایج قربانی و همکاران (۶) بود. با توجه به نتایج حاصل از تجزیه‌پذیری ماده خشک و آلی احتمالاً مقادیر پایین نیتروژن آمونیاکی در تیمار شاهد نسبت به تیمارهای حاوی کشت‌های زنده باکتریایی به دلیل تجزیه کمتر بخش پروتئینی خوراک در مدت زمان انکوباسیون بوده است (۱۸). این در حالی است که pH شکمبه در این شرایط روند کاهشی داشت. در شرایط

در آزمایش اول که از جیره پایه استفاده شد با شروع انکوباسیون تغییرات در pH برای همه تیمارها روند کاهشی (به جز در ساعت ۱۲ انکوباسیون که تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی باکتری و انتروکوکوس که روند افزایش نشان داد) داشت. در زمان ۲۴ انکوباسیون، بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت به طوری که تیمار شاهد دارای پایین‌ترین مقدار و تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی باکتریوم و انتروکوکوس بالاترین مقدار pH را داشتند (P<۰/۰۵). در آزمایش دوم، pH مایع شکمبه‌ای در ساعت ۲ پس از انکوباسیون روند کاهشی شدیدتری در مقایسه با آزمایش اول نشان داد و پس از آن تغییرات pH از یک روند ملایم‌تری برخوردار بود. در ساعت ۲۴ انکوباسیون بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تیمار شاهد و تیمار مکمل شده با پروپیونی باکتریوم فریدرینریچی و انتروکوکوس به ترتیب پایین‌ترین و بالاترین مقادیر pH را نشان دادند (P<۰/۰۵). در آزمایش سوم، با شروع آزمایش تا زمان ۲ انکوباسیون pH محیط روند افزایشی نشان داد و تیمار شاهد نسبت به تیمارهای مکمل شده با افزودنی‌های باکتریایی روند کندتری نشان داد. بعد از ساعت ۲ انکوباسیون تغییرات pH برای همه تیمارها روند کاهشی در

که شمار باکتری‌های آمیلولیتیک و لاکتوباسیل‌ها بالاتر است. از این رو، در چنین شرایطی آمونیاک کمتری برای سنتز پروتئین میکروبی استفاده می‌شود و باعث انباشته شدن آن در محیط خواهد شد. قربانی و همکاران (۶) با به کار بردن سویه پروپیونی باکتریوم P15 افزایش غلظت نیتروژن آمونیاکی شکمبه‌ای را به همراه افزایش تعداد پروتوزوا گزارش کردند. پروتوزواها، برخلاف باکتری‌های شکمبه‌ای نمی‌توانند نیتروژن آمونیاکی را به‌عنوان یک منبع نیتروژنی برای سنتز پروتئین مصرف کنند؛ در عوض، آنها نیازمند اسیدهای آمینه هستند. پروتوزواهای شکمبه‌ای به‌طور غیر مشخصی پروتئین‌های جیره‌ای، باکتریایی و اندوژنوس را تجزیه می‌کنند، بنابراین سطوح نیتروژن آمونیاکی را افزایش داده، در نتیجه پروتوزوا زدایی به طور ثابتی با کاهش سطوح نیتروژن آمونیاکی همراه می‌باشد.

شکمبه‌ای، سطوح آمونیاک به دلیل اینکه انواع مختلفی از گونه‌های باکتریایی شکمبه از آن به‌عنوان بلوک ساختمانی برای اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری در طی سنتز پروتئین میکروبی استفاده می‌کنند، مهم است (۳).

میکروارگانیزم‌های مختلف موجود در شکمبه، منابع مختلفی از نیتروژن را ترجیح می‌دهند. برای مثال، باکتری‌های سلولولیتیک از آمونیاک به‌عنوان منبع اصلی نیتروژن و باکتری‌های آمیلولیتیک از اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک استفاده می‌کنند (۲۷). تقریباً ۶۶ درصد از پروتئین میکروبی از اسیدهای آمینه و پپتیدها و باقیمانده از آمونیاک (۲۷) به‌دست می‌آید. افزودن منابع کربوهیدراتی سهل‌التخمیر باعث تکثیر باکتری‌های آمیلولیتیک یا تولیدکننده لاکتات می‌شود (۱۶ و ۲۹). از طرفی گود و همکاران (۷) نیز با دو سطح مختلف جیره با استفاده از حیوانات عادت داده شده به جیره بر پایه غلات نشان دادند



شکل ۱- تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر pH محیط کشت

Figure 1- The effect of adding bacterial live culture on pH

¹ CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii* + *Enterococcus faecium*

جدول ۴- تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت نیتروژن آمونیاکی (میلی گرم در دسی‌لیتر) در زمان‌های مختلف انکوباسیون در شرایط آزمایشگاهی

Table 4- The effect of adding live bacterial culture on N-NH₃ (mg/dL) at different times of incubation in *in vitro*

زمان‌های انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)	تیمارها Treatments ¹				SEM
	CON	P	E	P+E	
آزمایش ۱ (جیره شاهد)					
Experiment 1 (control diet)					
2	21.99	23.24	23.31	23.45	1.20
4	24.09 ^b	26.11 ^{ab}	23.67 ^b	26.29 ^a	1.20
6	24.46 ^b	29.77 ^a	31.46 ^a	31.68 ^a	1.20
12	26.47 ^b	31.58 ^a	32.17 ^a	31.12 ^a	1.20
24	29.56 ^b	33.06 ^a	30.65 ^b	30.87 ^b	1.20
آزمایش ۲ (جیره پایه + ۱۰ درصد ساکارز)					
Experiment 2 (basal diet +10% Saccharose)					
2	23.07 ^b	25.86 ^b	23.93 ^b	27.47 ^a	2.53
4	29.05	27.66	30.40	26.64	2.53
6	30.90	32.54	31.56	32.82	2.53
12	34.93 ^{ab}	36.56 ^a	36.10 ^a	37.55 ^a	2.53
24	33.97 ^{ab}	30.70 ^b	35.54 ^a	38.86 ^a	2.53

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

¹ CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii* + *Enterococcus faecium*.

بود، به طوری که تیمار مکمل شده با پروپیونی‌باکتریا و انتروکوکوس و تیمار شاهد به ترتیب دارای بالاترین و پایین‌ترین مقدار بودند. افزودن کشت‌های باکتریایی تأثیر معنی‌داری بر نسبت استات به پروپیونات داشت و تیمار شاهد در مقایسه با تیمارهای مکمل شده دارای بالاترین نسبت بود (P<0.05). در آزمایش سوم در مقایسه با دو آزمایش دیگر کاهش در غلظت استات کاملاً مشهود بود و تیمار شاهد پایین‌ترین مقدار و تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی‌باکتر و انتروکوکوس بالاترین مقدار را داشتند. غلظت پروپیونات به طور معنی‌داری در تیمار شاهد پایین‌ترین و در تیمار مکمل شده با مخلوط پروپیونی‌باکتریا و انتروکوکوس بالاترین مقدار بود (P<0.05). موافق با نتایج این مطالعه، آکای و دادو (۱) و کانگ و هسیون (۱۳) با استفاده از باکتری پروپیونی‌باکتریوم و مگاسفرا/السدنی افزایش قابل ملاحظه‌ای را در غلظت کل اسیدهای چرب فرار، استات و پروپیونات و روند رو به افزایشی در غلظت بوتیرات گزارش کردند. در مقابل، اولیز (۲) با به‌کارگیری غلظت‌های مختلفی از پروپیونی‌باکتر/اسیدوپروپیونیک DH42 در شرایط آزمایشگاهی، هیچ تأثیری در غلظت‌های استات، پروپیونات، بوتیرات، والرات و ایزوالرات مشاهده نکردند و تنها اثر اندکی را بر غلظت اسید لاکتیک و اسیدهای چرب فرار در زمان صفر گزارش کردند.

کاهش غلظت‌های آمونیاک شکمبه‌ای به تواتر در حیواناتی که در آنها پروتوزواها حذف شده بود، مشاهده شده است که نشان می‌دهد که پروتوزواها می‌توانند متابولیسم نیتروژن شکمبه‌ای را به مقدار زیادی تحت تأثیر قرار دهند (۱۴). بنابراین احتمالاً پایین بودن غلظت نیتروژن آمونیاکی در تیمار شاهد را می‌توان به پایین بودن pH محیط و کاهش جمعیت پروتوزواها در مقایسه با تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی نیز نسبت داد. تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی در جدول ۵ نشان داده شده است. افزودن کشت‌های باکتریایی تأثیر معنی‌داری بر غلظت اسیدهای چرب فرار در همه آزمایش‌ها داشت (P<0.05). در آزمایش اول تیمار مکمل شده با انتروکوکوس از نظر غلظت استات، پروپیونات و بوتیرات کمترین مقدار و بالاترین نسبت استات به پروپیونات را داشت. بین تیمارها از نظر نسبت استات به پروپیونات اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تیمارهای مکمل شده با پروپیونی‌باکتر و مخلوط پروپیونی‌باکتر و انتروکوکوس پایین‌ترین نسبت را داشتند (P<0.05). در آزمایش دوم، تیمار مکمل شده با انتروکوکوس در مقایسه با سایر تیمارها به طور معنی‌داری دارای پایین‌ترین غلظت استات بود (P<0.05). غلظت پروپیونات در بین تیمارها دارای اختلاف معنی‌داری

جدول ۵- تأثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت اسیدهای چرب فرار شکمبه‌ای (میلی‌مول) در شرایط آزمایشگاهی

Table 5- The effect of adding live bacterial culture on ruminal volatile fatty acids (Mm) at different times of incubation in *in vitro*

زمان‌های انکوباسیون (ساعت) Incubation time (h)	تیمارها Treatments ¹				SEM
	CON	P	E	P + E	
آزمایش ۱ (جیره شاهد) Experiment 1 (control diet)					
استات Acetate	69.84 ^b	68.73 ^c	66.62 ^d	72.43 ^a	0.33
پروپیونات Propionate	25.61 ^c	30.34 ^b	20.04 ^d	31.91 ^a	0.32
بوتیرات Butyrate	9.82 ^b	10.62 ^b	6.41 ^c	11.44 ^a	0.32
ایزو والرات Iso valerate	2.57 ^c	3.71 ^b	2.44 ^c	4.40 ^a	0.32
والرات Valerate	2.43 ^c	3.69 ^b	2.32 ^c	4.18 ^a	0.31
استات: پروپیونات Acetate: Propionate	2.72 ^b	2.27 ^c	3.32 ^a	2.27 ^c	0.02
آزمایش ۲ (جیره پایه + ۱۰٪ ساکاروز) Experiment 2 (basal diet + 10% Saccharose)					
استات Acetate	68.01 ^a	68.03 ^a	65.24 ^c	67.48 ^b	0.35
پروپیونات Propionate	33.23 ^c	34.80 ^b	35.2 ^b	37.49 ^a	0.36
بوتیرات Butyrate	13.21 ^c	17.00 ^a	14.84 ^b	16.93 ^a	0.31
ایزو والرات Iso valerate	2.08 ^d	4.08 ^b	3.48 ^c	5.16 ^a	0.31
والرات Valerate	5.38 ^d	8.94 ^b	8.04 ^c	9.03 ^a	0.31
استات: پروپیونات Acetate: Propionate	2.04 ^a	1.95 ^b	1.85 ^c	1.80 ^c	0.20
آزمایش ۳ (جیره پایه، pH= ۵/۵) Experiment 3 (basal diet, pH= 5.5)					
استات Acetate	43.42 ^d	47.4 ^b	44.11 ^c	57.21 ^a	0.30
پروپیونات Propionate	13.95 ^c	18.84 ^b	18.34 ^b	21.21 ^a	0.31
بوتیرات Butyrate	6.74 ^d	7.83 ^c	8.72 ^b	9.11 ^a	0.30
ایزو والرات Iso valerate	1.30 ^c	2.44 ^b	3.30 ^a	3.20 ^a	0.31
والرات Valerate	1.84 ^c	2.76 ^b	3.87 ^a	3.54 ^a	0.29
استات: پروپیونات Acetate: Propionate	3.11 ^a	2.51 ^c	2.41 ^d	2.69 ^b	0.02

میانگین‌های هر ردیف با حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05).

Means within same row with different superscripts differ (P<0.05).

¹ CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 1×10^8 cfu *Propionibacteria feriderinrichii* + *Enterococcus faecium*.

معنی‌داری یافت. گرچه مشخص نیست که آیا تولید اسید پروپیونیک باعث کاهش در تولید متان می‌شود یا بالعکس (۳۸) اما مسلم است که کاهش نسبت استات به پروپیونات توأم با کاهش در تولید متان می‌باشد (۳۲). زمانی که نسبت استات به پروپیونات برابر یک باشد یک مول متان از سه مول گلوکز و زمانی که این نسبت سه باشد، سه مول متان از ۵ مول گلوکز تولید می‌شود. با کاهش نسبت استات به پروپیونات و به دنبال آن کاهش در تولید متان، ابقاء انرژی به‌وسیله گاوها افزایش می‌یابد (۳۴).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به نتایج احتمالاً که افزودن کشت‌های زنده باکتریایی در جیره‌های غذایی می‌تواند تأثیر مثبت و معنی‌داری بر قابلیت هضم ماده خشک و ماده آلی و در نتیجه تولید اسیدهای چرب فرار، که یکی از اهداف اصلی در آزمایشات تغذیه‌ای است، داشته باشد که این تغییرات با تعدیل pH شکمبه‌ای همراه خواهد بود که شرایط را برای فعالیت میکروارگانیسم‌های شکمبه مساعدتر می‌کند. می‌توان انتظار داشت بهبود تجزیه‌پذیری ماده خشک و ماده آلی، افزایش در مصرف خوراک توسط دام و افزایش تولید پروتئین میکروبی و اسیدهای چرب فرار را در پی داشته باشد که نتیجه نهایی آن بهبود در تولید شیر و عملکرد دام باشد که برای تأیید این امر نیاز به آزمایشات تغذیه‌ای بر روی دام زنده است.

قربانی و همکاران (۶) با تغذیه یک جیره بر پایه کنسانتره مکمل شده با پروپیونی باکتریوم P15 به تنهایی یا با/انتروکوکوس فسیوم EF212 به گاوها، تأثیری بر غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه، پروپیونات و نسبت استات به پروپیونات گزارش نکردند. غلظت استات در تیمارهای مکمل شده با مخلوط پروپیونی-باکتریوم P15 و انتروکوکوس فسیوم EF212 بیشتر از تیمارهای کنترل و تیمار مکمل شده با پروپیونی باکتریوم بود. غلظت بوتیرات در تیمار مکمل شده با پروپیونی باکتریوم بیشتر از دو تیمار دیگر بود. یانگ و همکاران (۳۷) نیز با بررسی تأثیر پروپیونی-باکتریوم P15 را در شرایط آزمایشگاهی سیستم کشت مداوم، هیچ اختلاف معنی‌داری بین تیمارها از نظر غلظت استات، پروپیونات، بوتیرات، کل غلظت اسیدهای چرب فرار و نسبت استات به پروپیونات گزارش نکردند. در این مطالعه، غلظت اسیدهای چرب شاخه‌دار والرات و ایزووالرات در تیمارهای دارای افزودنی باکتریایی به طور معنی‌داری بالاتر از تیمار شاهد بود. افزایش در غلظت اسیدهای چرب شاخه‌دار به دلیل کاتابولیسم اسیدهای آمینه توسط میکروارگانیسم‌ها می‌باشد (۱۳). اسیدهای چرب شاخه‌دار جهت حمایت از رشد بسیاری از باکتری‌های شکمبه ضروری هستند (۳۶) و عمدتاً توسط باکتری‌های غیر سلولولیتیک تولید می‌شوند. این امر می‌تواند توضیح‌دهنده نوع جمعیت باکتریایی موجود در طی تخمیر در شرایط آزمایشگاهی باشد. به طور کلی، با افزودن کشت‌های زنده باکتریایی غلظت پروپیونات و نسبت استات به پروپیونات در هر سه آزمایش (به جز تیمار مکمل شده با انتروکوکوس فسیوم در آزمایش اول) به ترتیب افزایش و کاهش

منابع

1. Akay, V., and R. G. Dado. 2001. Effects of *propionibacterium* strain P5 on *in-vitro* volatile fatty acids production and digestibility of fiber and starch. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 25: 635-642.
2. Aviles, I. 1999. The use of DH42, a *Propionibacterium* for the prevention of lactic acidosis in cattle. M.S. Diss., Michigan State Univ., East Lansing.
3. Bach, A., S. Calsamiglia, and M. D. Stern. 2004. Nitrogen metabolism in the rumen. Journal of Dairy Science, 88 (E Suppl.):E9-E21.
4. Chesson, A., and J. Wallace. 1996. Biotechnology in animal feeds and animal feeding. Part 3: Microbial feed additives for ruminants. Feed Compounder, 16: 14-17.
5. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology, 66: 365-78.
6. Ghorbani, G. R., D. P. Morgavi, K. A. Beauchemin, and J. A. Z. Leedle. 2002. Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables and the microbial populations of feedlot cattle. Journal of Animal Science, 80:1977-1986.
7. Goad, D. W., C. L. Goad, and T. G. Nagaraja. 1998. Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced sub-acute acidosis in steers. Journal of Animal Science, 76:234-241.
8. Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents, procedures, and some applications). Agric. Handbook 379. ARS, USDA, Washington, DC.
9. Jones, R. J., and R. G. Megaritty. 1986. Successful transfer of DHP-degrading bacteria from Hawaiian goats to Australian ruminants to overcome the toxicity of Leucaena. Australian Veterinary Journal, 63:259-262.
10. Jouany, J. P. 1994. Methods of manipulating the microbial Metabolism in the rumen. Annales De Zootechnie, 43: 49-62.

11. Kmet, V., H. J. Flint, and R. J. Wallace. 1993. Probiotics and manipulation of rumen development and function. *Archives of Animal Nutrition*, 44:1-10.
12. Krehbiel, C. R., S. R. Rust, G. Zhang, and S. E. Gilliland. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *Journal of Animal Science*, 81: E120-E132.
13. Kung, Jr. L., and A. O. Hession. 1995. Preventing *in vitro* lactate accumulation in ruminal fermentation by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science*, 73:250-256.
14. Leng, R. A., and J. V. Nolan. 1984. Nitrogen metabolism in the rumen. *Journal of Dairy Science*, 67:1072-1089.
15. Mackie, R. I., and F. M. C. Gilchrist. 1979. Changes in lactate-producing and lactate-utilizing bacteria in relation to pH in the rumen of sheep during stepwise adaptation to a high-concentrate diet. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:422-430.
16. Martin, S. A., and D. J. Nisbet. 1991. Symposium: Direct fed microbials and rumen fermentation. *Journal of Dairy Science*, 75:1736-1744.
17. Mayne, C. S. 1990. An evaluation of an inoculant of *Lactobacillus plantarum* as an additive for grass silage for dairy cattle. *Animal Production*, 39: 65-76.
18. McAllister, T. A., and K. J. Cheng. 1996. Microbial strategies in the ruminal digestion of cereal grains. *Animal Feed Science and Technology*, 62: 29-36.
19. McAllister, T. A., Selinger, L. B., McMahon, L. R., Bae, H. D., Lysyke, T. J., Oosting, S. J., Chang, K. J. 1995. Intake, digestibility, and aerobic stability of barley silage inoculated with mixtures of *Lactobacillus plantarum* and *Enterococcus faecium*. *Canadian Journal of Animal Science*, 75: 425-432.
20. Nagaraja, T. G., C. J. Newbold, C. J. Van Nevel, and D. I. D. Emeyer, 1997. Manipulation of ruminal fermentation. Pages 523-632 in the rumen microbial ecosystem. P. N. Hobson and C. S. Stewart, ed. Blackie Acad. and Prof., London.
21. Newbold, C. J. 1995. Microbial feed additives for ruminants. In: R.J. Wallace and A. Chesson (Ed.) *Biotechnology in Animal Feeds and Animal Feeding*. Pp 259- 278.
22. Nisbet, D. J., and S. A. Martin. 1994. Factors affecting L-lactate utilization by *Selenomonas ruminantium*. *Journal of Animal Science*, 72: 1355-1361.
23. Nocek, J. E., W. P. Kautz, J. A. Z. Leedle, and J. G. Allman. 2002. Ruminal supplementation of direct-fed microbials on diurnal pH variation and *in situ* digestion in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 85:429-433.
24. Oshio, S., I. Tahata, and H. Minato. 1987. Effect of diets differing in ratios of roughage to concentrate on microflora in the rumen heifers. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 33: 99-111.
25. Oude Elferink, S. J. W. H., J. Krooneman, C. Gottschal, J. S. F. Spoelstra, F. Faber, and F. Driehuis. 2001. Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2 propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1): 125-132.
26. Overton, T. R., J. K. Drackley, C. J. Ottemann Abbamonte, A. D. Beaulieu, L. S. Emmert, and J. H. Clark. 1999. Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants. *Journal of Animal Science*, 77:1940-1951.
27. Russel, J. B., J. D. O Connor, D. G. Fox, P. J. Van Soest and C. J. Sniffer. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets. I. Ruminal fermentation. *Journal of Animal Science*, 70: 3551-3561.
28. Russell, J. B. 1998. The importance of pH in the regulation of ruminal acetate to propionate ratio and methane production *in vitro*. *Journal of Dairy Science*, 81: 3222-3230.
29. Slyter, L. L. 1976. Influence of acidosis on Rumen Function. *Journal of Animal Science*, 43:910-929.
30. Swinney-Floyd, D., B. A. Gardner, F. N. Owens, T. Rehberger, and T. Parrott. 1999. Effect of inoculation with either strain P-63 alone or in combination with *Lactobacillus acidophilus* LA53545 on performance of feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 77(Suppl. 1):77.
31. Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74:3583-3597.
32. Van Soest, P. J. 1994. *Nutritional ecology of the ruminant*, 2nd ed. Cornell university press, Ithaca, NY.
33. Williams, P. E. V., and C. J. Newbold. 1990. Rumen probiotics: The effects of nove microorganisms on rumen fermentation and ruminant productivity. In: Haresing W. and Cole D. J. A. (Ed) *Recent advances in animal nutrition*. pp 211-227. Buttersworth, London.
34. Wolin, M. J. 1988. A theoretical rumen fermentation balance. *Journal of Dairy Science*, 43:1452-1459.
35. Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, D. D. Vedres, G. R. Ghorbani, D. Colombatto, and D. P. Morgavi. 2004. Effects of direct-fed microbial supplementation on ruminal acidosis, digestibility, and bacterial protein synthesis in continuous culture. *Animal Feed Science and Technology*, 114: 179-193.
36. Yokoyama, M. T., and K. A. Johnsos. 1988. Microbiology of the Rumen and Intestine. In: D. C. Church (Ed). *The Ruminant Animal: Digestive Physiology and Nutrition*. Pp 125-143. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
37. Yoon, I. K., and M. D. Stern. 1995. Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review. *Asian-Australas. Journal of Animal Science*, 8:533-555.



Effect of Live Bacterial Cultures on *In Vitro* Digestibility and Ruminant Fermentation Parameters

J. Bayatkouhsar¹- A. M. Tahmasbi^{2*}- A. A. Naserian²- R. Valizadeh²- R. Safari³

Received: 22-11-2014

Accepted: 25-11-2015

Introduction: Rumen microbial manipulation has been of interest to ruminant nutritionists in order to achieve improvement in the profitability and health of lactating cows. Concerns regarding the use of antibiotics and other growth stimulants in animal feed industry have caused attention to find other alternative agents to replace antibiotics. For these reasons, in ruminant, microbial cultures have been used to replace antibiotics to enhance milk production in dairy cattle and improve feed efficiency and daily gain in beef cattle. Rumen bacteria, that have ability to ferment carbohydrate, are primarily responsible for causing lactic acidosis in ruminant. *Propionibacteria* are natural inhabitants of the rumen that comprise 1.4 % of the ruminal microflora and produce propionic and acetic acid in the rumen. Therefore, *propionibacteria* have been used as a direct-fed microbial to prevent the risk of acidosis in feedlot cattle. Last studies have reported that combinations of *propionic bacteria* and *lactobacilli* resulted in increased average daily gain and improved feed efficiency in feedlot cattle. The purpose of this study were preparation of live bacterial culture in laboratory and investigate the effect of adding live bacterial culture on digestibility and ruminal fermentation parameters on *in vitro* condition.

Materials and Methods: Three *in vitro* experiments designed in order to determine the effects of bacteria strains supplementation on dry matter and organic matter digestibility, pH, VFA and ammonia nitrogen concentration. Bacterial pure strains were *Propioni bacterium freudenreichii* and *Enterococcus faecium*. Stock cultures of freeze-dried strains were individually inoculated into 5 mL Brain Heart infusion (BHI) and sodium lactate broth (SLB) respectively and incubated at 37 °C for 24 h under anaerobic conditions. By pour plating serial 10 fold dilutions (in sterile ringer's solution) on demand, Rogosa, sharp agar and SLB agar plates were incubated anaerobically at 37 °C for 48h. 10⁸ cfu /ml of culture were produced after 24 and 36 h of culturing. Rumen fluid was collected 3 h after morning feeding from three ruminally fistulated sheep with mean body weight of 45±2.5 kg. Buffer was prepared as proposed by Goering and Van Soest (1970). In an anaerobic condition, 50 ml of buffered rumen fluid (ratio of buffer to rumen fluid was 1:1), was dispensed into a 100 ml serum bottle containing 0.5 g DM of the experimental diet (four replicate) for each experimental incubation time (2, 4, 6, 12 and 24 h). The experimental treatments were: CON) control (basal diet without any additive), P) basal diet inoculated with 10⁸ cfu *Propionibacteria feriderinrichii*, E) basal diet inoculated with 10⁸ cfu *Enterococcus faecium* and P+E) basal diet inoculated with 10⁸ cfu *Propionibacteria fredrinrichii* + *Enterococcus faecium*. Rumen fluid was collected before morning feeding from three ruminally fistulated sheep. In all experiments a diet based on concentrate were used with the ratio 90: 10 of concentrate to forage. In the second experiment 1 mL sucrose (10% w/w) injected to the diet and in third experiment pH adjusted to 5.5 at the beginning of experiment. After 2, 4, 6, 12 and 24 h of the incubation, the bottles were respectively transferred to an ice bath to stop fermentation and then opened to measure medium pH using a pH meter (Methrom pH meter, Model 691). Then, each bottle content was filtered (42 µm pore size) and a 5 ml sample of each filtrate bottle was taken and acidified with 5 ml of 0.2 N HCl and frozen at -20°C. for analyzing VFA by gas chromatography, 4 mL of each filtrate bottle were stabilized with 4 mL meta-phosphoric acid Liquid effluent was collected in flasks containing a solution of H₂SO₄ to maintain pH values below 2, and samples were taken for volatile fatty acids The filtrated residual was oven dried (60 °C for 48 h) and used to calculate *in vitro* dry matter and organic matter disappearances.

Results and Discussion: DM and OM digestibility for all treatments increased during incubation. Control treatment had lowest DM digestibility. Changes in OM digestibility was in same manner with DM digestibility in all treatments and control had lowest OM digestibility significantly. In comparison with initial pH, treatments

1- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Gonbad Kavous University, Gonbad, Iran

2- Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3- Department of Animal Science, Ahar Faculty of Agriculture and Natural Sciences, Tabriz University, Iran

(*- Corresponding Email: a.tahmasbi@protonmail.ch)

control, *Propionibacterium fredrinrichii*, *enterococcus faecium* and mixed of *Propionibacterium fredrinrichii* + *Enterococcus faecium* had decreased 0.91, 0.73, 0.76 and 0.58 unit, respectively. $\text{NH}_3\text{-N}$ concentration after 2h after incubation was low in all treatments and increased during incubation, but for control it was low in compare with other treatments during incubation. Adding bacterial culture had significantly effect on VFA concentration. There was significantly difference among treatments on acetate: propionate ratio and treatments 2 and 4 had lowest ratio.

Conclusion: Generally, DM and OM digestibility and VFA concentration can be affected positively and significantly by live bacterial cultures additives. These changes would be associated with the stabilization of rumen pH and provide favorable conditions for microorganisms' activity in the rumen.

Keywords: Digestibility, *In Vitro* Condition, Live Bacterial Cultures, Ruminal N-NH_3 , Volatile Fatty Acids