Iranian Journal of Animal Science Research
Homepage: http://ijasr.um.ac.ir

Research Paper
Vol. 14, No. 3, Fall 2022, p. 359-377

Aerobic Stability of Corn Silages Inoculated with Novel isolate of Lactic acid bacteria Separated from Various Sources

Nahid Aghamohamadi[1], Fardin Hozhabri[2*], Dariush Alipour[3]

Received: 05-01-2021
Revised: 01-11-2021
Accepted: 21-11-2021
Available Online: 13-11-2022

How to cite this article:
Aghamohamadi, N., Hozhabri, F., & Alipour, D. (2022) Aerobic Stability of Corn Silages Inoculated with Novel isolate of Lactic acid bacteria separated from Various Sources. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 14(3), 359-377.
DOI: 10.22067/ijasr.2021.68168.1003

Introduction: Corn silage is a major source of forage for ruminants, which provides a higher energy level compared to other forages. But it is susceptible to aerobic deterioration, because yeasts utilize the lactic acid, produced by lactic acid bacteria, as a source of energy. Thus, silages become a favor environment for the growth of mold and bacteria. The susceptibility of a silage to the aerobic deterioration is an important factor since it is directly related to its quality and nutritive value. When silage is exposed to air, increase of temperature and pH may occur, resulting in soluble carbohydrates loss and fermentation of the products of microbial metabolism, reducing its quality. Aerobic stability is an important feature in the evaluation of corn silage quality. Researchers reports that the use of lactic acid bacteria can improve fermentation and aerobic stability of silage. This study aimed to investigate the changes in the chemical compositions and concentration of fermentation end products that occur in corn silages with or without microbial inoculants during aerobic exposure and to select bacterial strains that can improve the aerobic stability after silo opening.

Materials and Methods: This study was conducted to select lactic acid bacteria (LAB) strains isolated from corn silage, the intestinal contents of broilers, laying hens, Turkey, Ostrich and assess their effects on the quality and aerobic stability of maize silage. The LAB strains were inoculated into aqueous extract obtained from maize to evaluate their production of metabolites, pH reduction and antimicrobial activity. One hundred and twenty-one strains were isolated from various sources in the Laboratory, which all isolates were considered to be LAB as determined by Gram-stain appearance, catalase test and lactic acid productivity. Analysis of the 16S rDNA sequence of representative strains was used to confirm the presence of the predominant groups. The sequences from the various LAB isolates showed high degrees of similarity to those of the GenBank type strains between 99% and 100%. Five LAB strains that showed the best results were assessed in experimental silos. All treatments were ensiled in laboratory-scale silos for 105 days, and then subjected to an aerobic stability test for 8 days. Silage samples were collected at 0, 4 and 8 days after aerobic exposure to determinate the changes in the chemical compositions, products of fermentation, and to evaluate the silages microbial changes to determine the aerobic deterioration. Data in the experimental design, after opening the silos, were analyzed in a completely randomized design with nine replicates by GLM procedure of SAS software. In aerobic conditions, the data were analyzed as repeated measures in time. The data were analyzed in a completely randomized design by GLM procedure of SAS software. Variance analysis and multiple comparisons of data were performed using the GLM procedure of and the means were separated by Tukey's test.

Results and Discussion: The results indicated that after 105 days of conservation, all silages had good fermentation characteristics with low pH (<3.80) and ethanol concentration and high lactic acid contents (P<0.01). A linear decrease in pH values and water-soluble carbohydrates contents were observed. Addition of lactic acid bacteria, increased acetic acid, but decreased ethanol contents of inoculated silages compared to the

1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.
2- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Science and Agricultural Engineering, Razi University, Kermanshah, Iran.
3- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
*Corresponding Author Email: hozhabri@razi.ac.ir

control (P<0.01). Across treatments, there were significant differences in the yeast populations (P<0.01). The population of yeasts which was initially high in the fresh forage (5.57 log cfu g^{-1} forage) before ensiling and a drastic reduction in the numbers of yeasts was observed in all silages throughout the experiment. The addition *Lactobacillus Fermentum* resulted in a higher concentration of acetic acid and reduced populations of yeasts in silage compared to the other silage treatments, and a lower ethanol concentration in the silage (P<0.01). The strains tested were able to modify the fermentative and chemical parameters and the populations of yeasts of silage after aerobic exposure. Aerobic stability of corn silages was associated with high acetic acid and reduction the populations of yeasts. all Lactobacillus strains promoted an increase in aerobic stability of silage. Addition of lactic acid bacteria, further improved silage aerobic stability with more acetic acid production and reduction the populations of yeasts (P<0.01). After 8 days of aerobic exposure, inoculated silage with *Lactobacillus Fermentum* remained stable, but the control silage deteriorated as indicated by a reduction in lactic acid and an increase in pH, and numbers of yeast (P<0.01). These results proved the advantage of microbial inoculation. The best Lactobacillus strains is *Lactobacillus Fermentum* because it provides more stable pH, production higher acetic acid, higher reduction of yeasts and filamentous fungi in maize silage, thereby decreasing the aerobic deterioration by these microorganisms.

Conclusion: The results showed that application of inoculants is recommended because it promoted higher production of acetic acid, reducing the populations of yeast and filamentous fungi, a more stable pH and, therefore, improving the aerobic stability of silages. The best inoculation is *Lactobacillus Fermentum* because it provides higher reduction of yeast and filamentous fungi in maize silage, thereby decreasing the aerobic deterioration by these microorganisms. The *Lactobacillus Fermentum* strain show the best results in relation to silage aerobic stability.

Keywords: Aerobic deterioration, Fermentation products, Aerobic stability, Filamentous fungi, Yeasts

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
Homepage: https://ijasr.um.ac.ir/

مقاله پژوهشی

پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با جدایه‌های جدید باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف

ناهید آقامحمدی[1]، فردین هژبری[2*]، داریوش علیپور[3]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۶
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۸/۱۰
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰

آقامحمدی، ن.، هژبری، ف.، و علیپور، د. (۱۴۰۱) . پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با جدایه‌های جدید باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف. *پژوهش‌های علوم دامی ایران*، ۱۴(۳)، ۳۷۷-۳۵۹.

چکیده

پایداری هوازی از ویژگی‌های مهم در ارزیابی کیفیت سیلاژ ذرت است. هدف از مطالعه حاضر، انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک جدا شده از منابع مختلف با قابلیت بهبود ویژگی‌های تخمیری و ارزیابی اثر تلقیح این جدایه‌ها بر پایداری هوازی سیلاژ ذرت و جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ طی قرار گرفتن در معرض هوا بود. جدایه‌های باکتری اسیدلاکتیک جدا شده از منابع مختلف، برای ارزیابی تولید متابولیت‌ها، کاهش pH و فعالیت ضدمیکروبی در عصاره آبی به‌دست آمده از علوفه ذرت تلقیح شدند. ۱۲۱ جدایه از منابع مختلف در آزمایشگاه جدا شد، تجزیه و تحلیل توالی 16S ریبوزومی DNA، جدایه‌های نماینده برای تأیید حضور گروه‌های غالب استفاده شد. توالی جدایه‌های مختلف باکتری‌های لاکتیک اسید، درجه شباهت بالایی به جدایه‌های نوع بانک ژن با شباهت ۹۹ و ۱۰۰ درصد نشان دادند. پنج جدایه باکتری‌های اسیدلاکتیک که بهترین نتایج را نشان دادند، به علوفه ذرت تلقیح و ۱۰۵ روز در سیلوهای آزمایشی سیلو شدند، سپس، طی هشت روز تحت آزمایش پایداری هوازی قرار گرفتند. نمونه‌های سیلاژ در صفر، چهار و هشت روز پس از قرار گرفتن در معرض هوا برای تعیین تغییرات در ترکیبات شیمیایی، فرآورده‌های تخمیر و ارزیابی تغییرات میکروبی برای تعیین فساد هوازی جمع‌آوری شدند. نتایج نشان داد، که همه سیلاژها دارای تخمیر خوب با مقدار pH پایین (کمتر از ۳/۸۰) و غلظت کم اتانول هستند. پایداری هوازی سیلاژ ذرت با بالا بودن اسید استیک و کاهش جمعیت مخمرها همراه بود. تمام جدایه‌ها باعث افزایش پایداری هوازی سیلاژ ذرت شدند. این نتایج مزیت تلقیح میکروبی را اثبات کرد. بهترین جدایه‌ی آزمایشی، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بود، زیرا باعث pH پایدارتر و تولید بیشتر اسید استیک، کاهش بالاتری از جمعیت مخمرها در سیلاژ ذرت تلقیح شده با این جدایه‌ی باکتری شد و بدین ترتیب فساد هوازی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پایداری هوازی، فساد هوازی، قارچ‌های رشته‌ای، محصولات تخمیر، مخمرها.

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۲- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران.
۳- دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(*- نویسنده مسئول: (Email: hozhabri@razi.ac.ir

DOI: 10.22067/ijasr.2021.68168.1003

مقدمه

سیلوکردن یک روش ذخیره‌سازی مرسوم و بهترین روش برای نگهداری محصولات علوفه‌ای است (Fabiszewska *et al*., 2019). در سیلاژ، کمبود اکسیژن و تجمع اسید لاکتیک، منجر به pH پایین شده، متابولیسم میکروبی را مهار کرده و مواد مغذی را حفظ می‌کند (Santos *et al*., 2013). با این حال، حساسیت سیلاژ به فساد هوازی عامل مهمی است، زیرا ارتباط مستقیمی با کیفیت و ارزش غذایی آن دارد (Avila *et al*., 2012).

سیلاژ ذرت منبع اصلی علوفه برای نشخوارکنندگان است که سطح انرژی بالاتری را در مقایسه با سایر علوفه‌ها فراهم می‌کند (Lee *et al*., 2019). سیلاژ ذرت، به‌خصوص در هوای گرم، به فساد هوازی حساس است، زیرا مخمرها از اسید لاکتیک تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک[1] به‌عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (Basso *et al*., 2012). از طرفی، غلظت بالای کربوهیدرات‌های محلول در آب علوفه ذرت، باعث رشد بیش از حد قارچ‌های سمی در مقایسه با سایر علوفه‌ها می‌شود (Lee *et al*., 2019). بنابراین، سیلاژ به محیط مناسبی برای رشد کپک‌ها و باکتری‌ها تبدیل می‌شوند، در نتیجه سیلاژی با کیفیت پایین تولید می‌کنند (Basso *et al*., 2012). پایداری هوازی، عامل مهمی برای اطمینان از کیفیت سیلاژ ذرت و تأمین یک ماده مغذی خوب با مقدار کمی اسپورهای کپک قارچی و ترکیبات سمی است. پس از باز کردن سیلو، مخمرها و کپک‌های قارچی که پایداری هوازی را کاهش می‌دهند با تجزیه مواد مغذی و اسیدهای آلی سیلاژ رشد می‌کنند. پایداری هوازی پایین باعث کاهش استفاده و ارزش غذایی سیلاژ ذرت می‌شود (Lee *et al*., 2019). بنابراین، بهبود پایداری هوازی سیلاژ می‌تواند سود قابل توجهی برای تولیدکنندگان داشته باشد (Lee *et al*., 2019; Ranjit and Kung, 2000)

از روش‌های زیادی برای بهبود پایداری هوازی سیلاژ استفاده شده است. محققین گزارش کرده‌اند، که استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیک می‌تواند تخمیر و پایداری هوازی سیلاژ را افزایش دهد (Ranjit and Kung, 2000; Lee *et al*., 2019). بنابراین، استفاده از افزودنی‌های میکروبی حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک، که علاوه‌بر تولید اسید لاکتیک قادر به تولید اسیدهای استیک یا پروپیونیک هستند، در مهار رشد و فعالیت قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها مؤثرتر هستند و ممکن است ثبات هوازی سیلاژ را افزایش دهند (Avila *et al*., 2012). اطلاعات مربوط به رشد میکروبی مانند باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمرها و کپک‌ها در هنگام مواجهه هوازی سیلاژ محدود است. در حقیقت، این اطلاعات می‌تواند سهم این میکروب‌ها را در تخمین ماندگاری سیلاژ پس از باز شدن سیلو تسهیل کند. بنابراین، این مطالعه به‌منظور برآورد پایداری هوازی سیلاژ ذرت تلقیح شده با باکتری‌های اسید لاکتیک انجام شد و همچنین تغییرات در ترکیب شیمیایی و میکروبی در هنگام مواجهه هوازی بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

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

۱) کشت و جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

کشت و جداسازی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک از منابع مختلف (سیلاژ ذرت، محتویات روده مرغ‌های تخم‌گذار، گوشتی، بوقلمون و شترمرغ) به روش‌های زیر انجام شد:

کشت و جداسازی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک طبق روش ارائه شده توسط آویلا و همکاران (Avila *et* Avila *et al*., 2009; *al*., 2014) انجام شد. باکتری‌های مولد اسید لاکتیک به‌روش انکوباسیون بی‌هوازی با استفاده از محیط کشت آگار ام آر اس[2] حاوی سیستئین هیدروکلراید (۰/۱ درصد) و سیکلوهگزامید (۰/۴ درصد) کشت شدند. کلنی باکتری‌های رشدیافته روی پتری‌دیش‌های دارای حداقل ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ واحد تشکیل‌دهنده کلنی[3] شمارش شدند، و از پتری‌های حاوی کلنی‌های منفرد و با کیفیت خوب، به‌طور تصادفی یک کلنی انتخاب، علامت‌گذاری و برای شناسایی جداسازی شدند، و مجدداً درون محیط کشت مایع ام آر اس[4]، در شرایط تاریک و بی‌هوازی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت در یک جار بی‌هوازی انکوبه شدند. جدایه‌های انتخاب و جدا شده، مجدداً برای خالص‌سازی بیشتر توسط آگار ام آر اس، روی پتری‌های محتوی محیط کشت جامد، کشت شدند. این کار برای خالص‌سازی بیشتر چندین بار تکرارشد. سپس، جدایه‌های خالص‌شده، انتخاب و یک کلنی به لوله‌های هانگیت محتوی پنج میلی‌لیتر محیط کشت مایع ام آر اس منتقل و به‌مدت ۲۴ ساعت در آون ۳۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از آن، جدایه‌های خالص شده و رشد یافته درون محیط کشت مایع با محلول گلیسرول ۲۰ درصد (v/v) حفظ و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد برای بررسی‌های بعدی ذخیره شدند.

مطابق با روش‌های ذکرشده برای کشت باکتری‌ها، جدایه‌ی

1- Lactic Acid Bacteria (LAB)

2-- De Man Rogosa Sharpe Agar (MRS Agar)
3- Colony forming units (CFU)
4- De Man Rogosa Sharpe Broth (MRS Broth)

باکتری‌ها با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و تست‌های آزمایشگاهی (Avila *et al.*, 2009; Pang *et al.*, 2011; Avila *et al.*, 2014)، به‌عنوان باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک فرضی، از منابع مختلف ذکر شده، جدا شدند. سپس، برای بررسی رشد، کاهش در مقدار pH و تولید متابولیت‌ها، جدایه باکتری‌های جداشده (جدایه‌های باکتری) در عصاره آبی تهیه شده از گیاه ذرت علوفه‌ای تلقیح شدند و توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ، ارزیابی شد (Saarisalo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013). پس از کشت مجدد هر جدایه‌ی باکتری، رشد از طریق اندازه‌گیری کدورت با دستگاه اسپکتروفتومتر[1] در طول موج ۶۰۰ نانومتر ارزیابی شد. از pHمتر دیجیتال[2] برای اندازه‌گیری pH استفاده شد و از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[3] برای تجزیه و تحلیل تولید متابولیت‌های اسیدلاکتیک، اسیدهای استیک و پروپیونیک، همچنین الکل‌های اتانول و پروپان‌دی‌اُل استفاده شد (Santos *et al.*, 2013; Avila *et al.*, 2014). جدایه‌هایی از باکتری‌های اسید لاکتیک، که بهترین رشد و کارایی را در کاهش pH از خود نشان دادند، برای بررسی توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

آزمایش‌های مهار، با استفاده از روش انتشار آگار مطابق روش توصیف شده توسط سانتوس و همکاران (Santos *et al.*, 2013)، انجام شد. ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده، در مرکز محیط کشت، مجدداً کشت و فعال شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند، به‌استثنای جدایه‌ی *کلوستریدیدم‌پرفرینجنس* که تحت شرایط بی‌هوازی در یک جار بی‌هوازی به‌مدت هفت روز انکوبه شد. گونه‌های مخمر و قارچ‌ها به‌ترتیب در محیط عصاره مخمر–پپتون–گلوکز[4]، محیط سیب‌زمینی–دکستروز–آگار[5] و همچنین، جدایه باکتری‌های اسید لاکتیک انتخاب شده در محیط کشت ام آر اس به‌مدت ۲۴ ساعت با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد مجدداً کشت و انکوبه شدند. پس از آن، سوسپانسیون استانداردی از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده تحت آزمایش آماده شد، و با استاندارد شماره ۰/۵ مقیاس مک‌فارلند (تقریباً $۱/۵\times۱۰^{۸}$ کلنی به‌ازای هر میلی‌لیتر) مقایسه شد، در حالی‌که، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک به‌وسیله مقایسه با استاندارد شماره ۱ مقیاس مک‌فارلند (تقریباً ۳×۱۰^{۸} کلنی به‌ازای هر میلی‌لیتر) استاندارد شد (Santos *et al.*, 2013).

پیش انتخاب جدایه‌های باکتریایی براساس ارزیابی رشد، کاهش در مقدار pH و تولید متابولیت‌ها، همچنین، توانایی آن‌ها در جلوگیری از رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده سیلاژ انجام شد (Saarisalo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013). از آن جا که، اسید لاکتیک در درجه اول مسئول کاهش مقادیر pH در سیلاژ است، بهترین جدایه‌های تولیدکننده اسید لاکتیک که نقش مؤثری در کاهش pH و همچنین سرعت رشد بالایی داشتند، و از طرفی، در آزمایش مهار ریزجانداران نامطلوب، مؤثر بودند، انتخاب و برای مطالعات مولکولی مورد بررسی قرار گرفتند. در مرحله بعد، با استفاده از روش‌های مولکولی، مراحل استخراج DNA باکتری‌ها و تکثیر DNA استخراج شده، توسط روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز[6] انجام شد. جدایه‌های باکتری (جدایه‌های باکتری) جداسازی و انتخاب شده، برای ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی با تعیین‌توالی DNA شناسایی شدند. استخراج DNA باکتری‌های جداشده و خالص‌سازی آن‌ها و همچنین، تکثیر DNA استخراج شده، طبق روش‌های توصیف شده توسط سانتوس و همکاران (Santos *et al.*, 2013) و سیلوا و همکاران (Silva *et al.*, 2018) انجام شد. DNA باکتری‌ها با استفاده از کیت تجاری[7] استخراج شد. غلظت DNAهای استخراج شده با استفاده از طیف‌سنجی نانودراپ[8] مورد بررسی قرار گرفت و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز و تکثیر DNA از دستگاه ترموسایکلر شرکت اپندروف (اپندورف، هامبورگ، آلمان) استفاده شد. منطقه کدکننده توالی ژن 16SrDNA توسط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در یک سیکلر حرارتی PCR تکثیر شد. از آغازگرهای عمومی برای شناسایی جدایه‌ی باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک استفاده شد. آغازگرهای مورد استفاده، آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی RNA بودند. محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز مستقیماً با کیت PCR با استفاده از آغازگرهای عمومی پروکاریوتیک 16S ریبوزومی DNA، P027F (50-GAGTTTGATCCTGGCTCA-30) و 1492R (50-ACCTTGTTACGACTT-30) تعیین شد (Silva *et al.*, 2018). محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز به‌دست آمده برای تصفیه و تعیین‌توالی به شرکت ماکروژن[9] ارسال و توسط این شرکت تعیین‌توالی شدند. توالی نوکلئوتید هر جدایه توسط نرم‌افزار بیواديت[10] ویرایش ۷/۲ مشاهده و بخش مورد نظر آن انتخاب شد. سپس، توالی انتخاب شده به‌وسیله ابزار بلاست[11] وارد و با توالی‌های موجود در

1- VARIAN, Cary100 UV-Vis spectrophotometer, Australia
2- JENWAY, 350 pH meter manual, UK.
3- High-Performance Liquid Chromatography (HPLC, Shimadzu model LC-10Ai)
4- Yeast Extract Peptone Glucose (YEPG) Medium
5- Potato Dextrose Agar (PDA)
6- Polymerase Chain Reaction (PCR)
7- Wizard_ Genomic DNA Purification kit, Promega, Madison, WI, USA
8- Thermo Scientific 2000, Waltham, MA, USA
9- Macrogen (Seoul, South Korea)
10- BioEdite
11- Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

پایگاه داده‌های بانک ژن، موجود در وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی[1] مقایسه شدند. پس از تجزیه توالی‌ها توسط بلاست، ریزجانداران ثبت شده‌ای که بیشترین قرابت ژنتیکی را با جدایه‌های خالص شده آزمایش داشتند، شناسایی شدند. سپس، توالی‌ها با روش اتصالات مجاور توسط نرم‌افزار مگا[2] ویرایش شش بررسی شد.

۲) تلقیح جدایه‌های انتخاب شده به علوفه ذرت برای تهیه سیلاژ در سیلوهای آزمایشگاهی

در این مرحله با توجه به نتایج تعیین توالی جدایه‌های توالی‌یابی شده و نتایج حاصل از آزمایش‌های قبل از قبیل؛ نرخ رشد سریع‌تر در طی تخمیر، کاهش مؤثر pH و تولید غلظت‌های مناسب متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی، پنج جدایه که بهترین نتایج را نشان دادند برای تلقیح به ذرت علوفه‌ای برای سیلوکردن انتخاب شدند. برای این آزمایش شش تیمار در نظر گرفته شد: شاهد (سیلاژ کنترل بدون هیچ افزودنی میکروبی)، و پنج تیمار محتوی باکتری‌های جداسازی شده و انتخاب شده به‌صورت مجزا (*لاکتوباسیلوس پانیس، لاکتوباسیلوس سالیواریوس، پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و انتروکوکوس فاسیوم*). برای هر تیمار، نُه تکرار در نظر گرفته شد (شش تیمار و ۵۴ مینی‌سیلو). علوفه تازه ذرت با طول برش ۱/۵ سانتی‌متر خرد شده با جدایه 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. جدایه‌های باکتری تولیدکننده اسید لاکتیک مطابق با استانداردهای کدورت مقیاس مک‌فارلند آماده‌سازی شدند، و تلقیح با جمعیت 10^6 کلنی به‌ازای هر گرم علوفه تازه انجام شد. تلقیح باکتری‌ها براساس روش‌های پیشنهاد شده توسط آویلا و همکاران (Avila *et al*., 2014) و سانتوس و همکاران (Santos *et al*., 2013) انجام شد. شاهد (کنترل) بدون هیچ‌گونه تلقیح باکتریایی، فقط آب مقطر به علوفه اضافه و ذخیره شد. در همه تیمارها باکتری‌های تلقیح شده با غلظت FM 10^6 cfu/g ×۱ برای اطمینان از تسلط بر تخمیر استفاده شد. مقدار ذرت خردشده برای هر تیمار 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 علوفه‌ی سیلو شده مشخص شود. پس از هواگیری و فشرده‌سازی کامل، سیلوها در دمای اتاق (به‌طور متوسط ۲۳ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شده و از نور خورشید و باران محافظت شدند. پس از ۱۰۵ روز سیلوکردن، هر سیلاژ ابتدا توزین و سپس باز شدند (Santos *et al*., 2013).

۳) اندازه‌گیری پایداری هوازی سیلاژها

جهت ارزیابی پایداری هوازی هر سیلاژ طبق روش آویلا و همکاران (Avila *et al*., 2014) و کاروالهو و همکاران (Carvalho *et al*., 2014) 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. ظروف سیلاژ با دو لایه پارچه پنبه‌ای پوشانده شد تا از خشک‌شدن، آلودگی گرد و غبار جلوگیری کند. برای ارزیابی پایداری هوازی آن‌ها یک دماسنج به‌مدت هشت روز درون توده سیلاژ، در عمق ۱۰ سانتی‌متر قرار داده شد. دماسنجی که برای اندازه‌گیری دما هر دو ساعت برنامه‌ریزی شده بود، در مرکز هر سطل قرار گرفت. دمای هر سیلاژ هر ۱۲۰ دقیقه ثبت شد. دمای محیط با استفاده از دماسنج واقع در نزدیکی سطل‌ها اندازه‌گیری شد. پایداری هوازی به‌عنوان مجموع ساعاتی که دمای سیلاژ قبل از افزایش بیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط ثابت ماند، تعریف شده است.

نمونه‌برداری‌ها از علوفه تازه قبل از سیلوکردن و همچنین از علوفه سیلوشده پس از ۱۰۵ روز تخمیر در سیلو، پس از باز شدن مینی‌سیلوها، روزهای صفر (روز باز شدن سیلوها)، چهار و هشت، پس از قرار گرفتن در معرض هوا برای تجزیه و تحلیل شیمیایی، محصولات نهایی تخمیر و میکروبی، انجام شد. یک بخش از نمونه‌ها، وزن و به‌مدت ۷۲ ساعت در آون دارای فن در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد خشک شد. بخش دیگری از نمونه‌ها، در نایلون‌های برچسب‌دار برای تجزیه‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. بخش سوم نمونه‌ها، برای تهیه عصاره آبی به‌منظور تعیین مقدار pH، ارزیابی جمعیت میکروبی و محصولات نهایی تخمیر استفاده شد. برای اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ از روش‌های استاندارد استفاده شد (AOAC, 1990).

یک نمونه ۲۵ گرمی از علوفه تازه قبل سیلوکردن و همچنین، از هر سیلاژ بعد بازکردن مینی‌سیلوها، طی روزهای قرار گرفتن در معرض هوا، جمع‌آوری و با ۲۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل محتوی پپتون ۰/۱ درصد مخلوط شد و در یک مخلوط‌کن به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۲۰ دور در دقیقه همگن شد، سپس از طریق کاغذ فیلتر واتمن

1- NCBI: (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)
2- MEGA

شماره چهار صاف شد (Santos *et al.*, 2016). از عصاره آبی تهیه شده برای تعیین pH، کربوهیدرات‌های محلول در آب و محصولات تخمیری استفاده شد. pH هر نمونه با دستگاه pHمتر مشخص شد. کربوهیدرات‌های محلول در آب با استفاده از روش اسید سولفوریک- آنترون طبق روش دریاز (Deraize, 1961) تعیین شد. بخشی از عصاره‌های آبی (دو میلی‌لیتر) با ۱۰ میکرولیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد (حجمی/حجمی) اسیدی شدند و قبل از تجزیه و تحلیل برای اندازه‌گیری محصولات نهایی تخمیر منجمد شدند (Santos *et al.*, 2013). عصاره‌های آبی اسیدی شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای تعیین غلظت اسیدهای لاکتیک، استیک و اتانول مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. تجزیه و تحلیل میکروبی در ذرت علوفه‌ای تازه قبل از سیلوکردن و در سیلاژ در زمان باز شدن مینی‌سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا انجام شد. از عصاره آبی تهیه شده در چندین رقت تهیه شده (10^{-1} تا 10^{-8}) برای تعیین جمعیت باکتری‌های لاکتیک‌اسید، مخمرها و قارچ‌ها استفاده شد. برای بررسی و شمارش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در علوفه تازه و هر سیلاژ پتری‌های محتوی محیط کشت آگار ام آر اس طبق روش آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2014) در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. جمعیت مخمرهای موجود در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ در محیط عصاره مخمر- پپتون- آگار طبق روش آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2009) و جمعیت قارچ‌های رشته‌ای موجود در علوفه تازه و نمونه‌های سیلاژ در محیط سیب زمینی-دکستروز- آگار حاوی ۱/۵ درصد محلول اسید تارتاریک (۱۰ درصد وزنی/ حجمی) جهت اسیدی شدن طبق روش سیلوا و همکاران (Silva *et al.*, 2018) انجام شد. پتری‌دیش‌های محتوی محیط‌های کشت مخمرها و قارچ‌ها به‌مدت سه تا پنج روز به‌صورت هوازی در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. کلنی‌های قابل مشاهده در محیط آگار در رقت‌های مناسب (حداقل ۳۰ تا حداکثر ۳۰۰ واحد تشکیل-دهنده کلنی) شمارش شده و تعداد واحدهای تشکیل‌دهنده کلنی در هر گرم سیلاژ بیان شد و به‌صورت لگاریتم کلنی شمارش شده در هر گرم علوفه تازه یا سیلاژ[1] نشان داده شدند.

این پژوهش در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با شش تیمار و نه تکرار انجام شد. پس از باز شدن سیلوها داده‌ها بر پایهی طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. معادله ۱ مدل آماری طرح را نشان می‌دهد:

معادله (۱) $$Yij = \mu + Ti + eij$$

که در این مدل، Yij: مقدار هر مشاهده، μ: میانگین صفت مورد مطالعه، Ti: اثر تیمار و eij: اثر خطای آزمایشی بود.

در شرایط هوازی پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا، داده‌ها به‌عنوان اندازه‌گیری‌های تکرار شونده در زمان، بر پایه طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شدند. معادله ۲ مدل آماری طرح را نشان می‌دهد:

معادله (۲) $$Y_{ijk} = \mu + A_i + Ea_{i.k} + B_j + AB_{ij} + Eb_{ijk}$$

در این مدل، Y_{ij}: مشاهده مربوط به تیمار i و زمان اندازه‌گیری j در تکرار k؛ μ: میانگین کلی مشاهدات، A_i: اثر تیمار i؛ $Ea_{i.k}$: اثر اشتباه اصلی؛ B_j: اثر زمان اندازه‌گیری j؛ AB_{ij}: برهم‌کنش تیمار i و زمان اندازه‌گیری j و Eb_{ijk}: اشتباه فرعی هستند. تجزیه اطلاعات با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ویرایش ۹/۴ (SAS, 2013)، با رویه GLM و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی و سطح معنی-داری ۰/۰۵ و ۰/۰۰۱ انجام شد. تمام شمارش‌های میکروبی بر پایه لگاریتمی ($\log_{10}$ cfu) تبدیل شد.

نتایج و بحث

انتخاب و شناسایی جدایه‌های باکتری لاکتیک‌اسید

از تعداد ۱۲۱ جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک، ۱۰۰ جدایه نتایج قابل قبولی نشان دادند و رشد آن‌ها (اندازه‌گیری در واحد جذب) و کاهش مقادیر pH در عصاره ذرت به‌ترتیب از ۰/۹۵ تا ۲/۴۵ و از ۱/۰۵ تا ۲/۸۹ متفاوت بود. باکتری‌های 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. در میان ۱۰۰ جدایه باقی‌مانده، جدایه‌هایی که نتایج بهتری نشان دادند، به‌ترتیب تولید اسیدهای لاکتیک و استیک را از ۰/۸۸ تا ۷/۹۶ و از ۰/۸۵ تا ۵/۷۵ گرم در لیتر نشان دادند. تمام جدایه‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک مقادیر کمی اسید پروپیونیک تولید کردند که از ۰/۰۵ تا ۰/۱۸ گرم در لیتر متغیر بود. با این حال، جدایه ۱۶ (*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*) به‌دلیل تولید بیشتر این اسید (۰/۲۵ گرم در لیتر) و اسید استیک (۶/۵۱ گرم در لیتر) برجسته شد. همه جدایه‌ها تولید اتانول کم (از ۰/۰۲ تا ۰/۰۸ گرم در لیتر) داشتند، به‌استثنای پنج جدایه که تولید اتانول تقریباً ۰/۵۱ گرم در لیتر را نشان داد.

از مجموع کل جدایه‌هایی که بهترین رشد را نشان دادند و مؤثر در کاهش pH بودند، تعداد ۳۵ جدایه اثر مهاری بر رشد ریزجانداران بیماری‌زا و فاسدکننده داشتند و منجر به تشکیل یک هاله مهاری با اندازه‌های بین ۱۰ تا ۲۰ میلی‌متر شدند. دیگر جدایه‌ها هاله مهاری تشکیل ندادند یا بسیار کوچک بود. جدایه‌هایی که فعالیت ضدمیکروبی بهتری علیه مخمرها و قارچ‌ها نشان دادند، برای فرآیند سیلوکردن انتخاب شدند، زیرا رشد خوبی در عصاره آبی ذرت داشتند، همچنین تولید متابولیت بیشتر (اسیدهای چرب فرار و اسیدلاکتیک) و غلظت اتانول کمتری داشتند.

1- Log cfu/g FM

در این مطالعه، علاوه‌بر بررسی سرعت رشد و کاهش pH محیط، ارزیابی متابولیت‌های تشکیل‌شده و فعالیت ضدمیکروبی به‌عنوان عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌ها برای فرایند سیلوکردن استفاده شدند. بنابراین، انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک برای تلقیح به علوفه ذرت در فرآیند سیلوکردن عمدتاً بر اساس میزان رشد و تولید متابولیت‌ها برای بهبود تخمیر و فعالیت ضدمیکروبی برای افزایش پایداری هوازی بود. غلظت متابولیت‌های تولید شده توسط جدایه باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک در محیط کشت ذرت بسیار متغیر بود. اختلافات موجود در تولید متابولیت‌ها بین جدایه‌های باکتری به‌دلیل متابولیسم باکتری‌ها بود. جدایه‌هایی که تولید بالایی از اسید لاکتیک را نشان دادند، به‌عنوان باکتری‌های با تخمیر ناهمگن اختیاری شناخته شدند، در حالی که جدایه‌هایی که اسیدهای استیک تولید می‌کردند، باکتری‌های با تخمیر ناهمگن اجباری در نظر گرفته شدند (Santos *et al.*, 2013). برای بیشتر جدایه‌های آزمایشی مشاهده ارتباط بین رشد، از طریق قرائت جذب، و کاهش pH محیط امکان‌پذیر بود. همبستگی بین این دو فاکتور با تولید اسیدها توسط باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک توضیح داده می‌شود (Santos *et al.*, 2013). فعالیت ضدمیکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک در درجه اول مربوط به تولید اسیدهای آلی است. اثرات ضدمیکروبی می‌تواند به کاهش pH در محیط کشت، کاهش pH داخل سلولی به‌دلیل عبور اسیدها از غشای سلولی، تغییر در نفوذپذیری سلول از طریق تداخل پروتئین‌های غشایی مربوط به انتقال فعال مواد مغذی یا سمیت سلول به‌دلیل تجمع ترکیبات قلیایی در داخل سلول مربوط باشد (Santos *et al.*, 2013). همچنین، فعالیت ضدمیکروبی می‌تواند مربوط به تولید باکتریوسین‌ها باشد (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2018). گرچه در مطالعه سانتوس و همکاران (Santos *et al.*, 2013)، ارزیابی فعالیت ضدمیکروبی به‌عنوان عامل کلیدی در انتخاب جدایه‌ها برای فرآیند سیلوکردن کارآمد نبود و انتخاب جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک برای سیلاژ ذرت را بر اساس دو فاکتور سرعت رشد جدایه‌ها از طریق قرائت جذب، و کاهش pH در محیط کشت انجام دادند. بنابراین، اثرات تلقیح میکروبی بر تخمیر سیلاژ عمدتاً به‌دلیل توانایی تسلط سریع بر تخمیر و تولید متابولیت‌ها، علاوه‌بر تغییرات در pH است (Santos *et al.*, 2013). علاوه‌براین، سازگاری بین علوفه و باکتری‌های اسید لاکتیک انتخاب شده، یک فاکتور تعیین‌کننده برای دستیابی به‌هدف کاربرد افزودنی میکروبی است. بنابراین، می‌توان از این ویژگی‌ها به‌عنوان معیار انتخاب مواد تلقیحی جدید استفاده کرد (Saarisalo *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2013; Avila *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). در انتخاب جدایه‌های تلقیحی، در نظر گرفتن بقای جدایه انتخاب شده تا پایان تخمیر بسیار مهم است، که همچنین، می‌تواند باعث بهبود پایداری هوازی سیلاژ شود (Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016).

در این مطالعه، جدایه‌های انتخاب شده، غلظت‌های بالایی از اسیدهای استیک و پروپیونیک تولید کردند. طبق نظر محققین، اسیدهای پروپیونیک و استیک یک اثر هم‌افزایی نشان می‌دهند، که قادرند رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای را کاهش داده و ثبات هوازی سیلاژ را افزایش دهند (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). بر مبنای گزارش محققین، اسیدهای با بالاترین pK در مهار و یا کاهش رشد و فعالیت ریزجانداران نامطلوب مؤثرتر هستند. وقتی pH سیلاژ زیر ۴/۷۳ باشد، اسیدهای استیک و پروپیونیک، در pH کمتر از pKa (۴/۷۳)، در درجه اول خود را به شکل تفکیک نشده نگه می‌دارند، در این فرم، غشاهای مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای به این اسیدها نفوذپذیر می‌شوند. به‌طور خلاصه می‌توان بیان کرد که به‌دلیل خصوصیت چربی‌دوستی اسیدهای استیک و پروپیونیک است که دریافت اسید از طریق غشا ریزجانداران (غشای نفوذپذیر به اسیدها) به‌روش انتقال غیرفعال صورت می‌گیرد. در داخل سلول، که pH برابر ۷/۰ (بالاتر از pKa اسید) است، اسید تجزیه شده، که آزادکننده پروتون‌هاست. آزادسازی یون‌های H^+، که از بین بردن آن‌ها به‌معنی انرژی صرف شده توسط ریزجانداران است، یک فرآیند انتقال فعال می‌باشد که باعث کاهش pH داخل سلولی می‌شود و در نتیجه، سرعت رشد را کاهش داده و امکان مرگ سلول فراهم می‌شود (Santos *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). نتایج حاصل از آزمایش حاضر این گفته‌ها را تأیید می‌کند و جدایه‌هایی که غلظت‌های بالایی از اسیدهای استیک و پروپیونیک را تولید کردند، فعالیت ضدمیکروبی بهتری را نشان دادند.

بر اساس نتایج به‌دست آمده طی آزمایش‌های مختلف در ارزیابی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک در این پژوهش، جدایه‌هایی که نتایج بهتری از نظر تولید متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی نشان دادند، جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند (نتایج ارائه نشده است). مطابق با نتایج تعیین‌توالی منطقه 16S rRNA، و همچنین، نتایج حاصل از آزمایش‌های مربوط به اندازه‌گیری فراسنجه‌های رشد، کاهش pH، تولید متابولیت‌ها و فعالیت ضدمیکروبی میان جدایه‌های توالی‌یابی شده، پنج جدایه به‌منظور ارزیابی در سیلوهای آزمایشگاهی انتخاب شدند. شباهت توالی 16S rRNA در مقایسه با کد دسترسی موجود در بانک ژن برای این جدایه‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج تعیین توالی منطقه 16S rRNA، جدایه‌های انتخاب شده نشان داد که همه آن‌ها حداقل ۹۹ درصد شباهت را با توالی ریزجانداران موجود در بانک ژن نشان دادند. اگر شباهت ژنتیکی بین میکروارگانیسم مورد نظر و میکروارگانیسم بانک ژن، ۹۹ درصد باشد می‌توان با اطمینان گفت که همان باکتری یا همان گونه است (Pang *et al.*, 2011).

جدول ۱- جدایه‌ها، منبع جداسازی و تشخیص مولکولی جدایه‌های باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده از منابع مختلف

Table1- Isolates, source isolation, and molecular identification lactic acid bacteria strains isolated from various

جدایه‌ها Isolate	منبع جداسازی Isolation Source	هم ترازی در BLAST BLAST alignment	کد در NCBI NCBI[1]accession No.	درصد شباهت Similarity (%)
جدایه ۲ Strain 2	سیلاژ ذرت Corn Silage	*لاکتوباسیلوس پانیس* *Lactobacillus Panis* (LP)	LC145560.1	99
جدایه ۷ Strain7	محتویات روده مرغ‌های گوشتی Intestinal contents of Broilers	*لاکتوباسیلوس سالیواریوس* *Lactobacillus salivarius (LS)*	LT852760.1	100
جدایه ۱۱ Strain 11	سیلاژ ذرت Corn Silage	*پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* *Pedicoccus acidilatici (PA)*	KY549392.1	99
جدایه ۱۶ Strain 16	محتویات روده مرغ‌های تخم گذار Intestinal contents of laying hens	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم* *Lactobacillus fermentum (LF)*	GQ231445.1	100
جدایه ۱۹ Strain 19	محتویات روده شترمرغ Intestinal contents of Ostrich	*انتروکوکوس فاسیوم* *Enterococcus faecium (EF)*	KY682304.1	100

[1] وب سایت مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی

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

خصوصیات علوفه ذرت قبل از سیلو شدن

ترکیبات شیمیایی و جمعیت میکروبی علوفه ذرت قبل از سیلوکردن در جدول ۲ نشان داده شده است. در این مطالعه، علوفه ذرت از ویژگی‌های مناسبی برای تولید سیلاژی باکیفیت بالا برخوردار بود. موفقیت در تولید سیلاژی با کیفیت بالا به دو عامل اصلی بستگی دارد؛ اولاً، ترکیب شیمیایی، که ظرفیت بافری و ضریب تخمیر علوفه را تعیین می‌کند و ثانیاً، ماهیت مواد سیلوشده، که جمعیت میکروبی را تعیین می‌کند (Jatkauskas *et al*., 2018). گزارش شده است که سیلاژهای کاملاً تخمیر شده می‌توانند از علوفه‌ای تولید شود که دارای خصوصیاتی مانند؛ مقدار ماده خشک کافی (۲۵۰–۴۰۰ g/kg FM)، غلظت بالای کربوهیدرات محلول در آب (۶۰–۱۲۰ g/kg DM)، ظرفیت بافری کم (۲۰۰–۲۵۰ mE/kg)، و باکتری‌های اسید لاکتیک کافی برای رقابت در برابر میکروب‌های مضر قبل از سیلوکردن باشد (Chen *et al*., 2017; Silva *et al*., 2017; Kung *et al*., 2018; Silva *et al*., 2018). در این مطالعه، محتوای ماده خشک علوفه ذرت تازه در لحظه سیلوکردن کافی بود (۳۵۰/۰۲ گرم بر کیلوگرم؛ جدول ۲) که در دامنه ۳۰۰ تا ۳۵۰ گرم برکیلوگرم ماده خشک پیشنهاد شده توسط آسیس و همکاران (Assis *et al*., 2014) و سیلوا و همکاران (Silva *et al*., 2017) قرار داشت، که علوفه ذرت برای فرایند سیلوکردن بالاترین ارزش غذایی را دارا است و ماده خشک آن مناسب و کافی است. همچنین، غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب ذرت خرد شده تازه ۹۷/۱۶ گرم بر کیلوگرم ماده خشک بود که برای فرآیند سیلوسازی در هنگام سیلوکردن کافی گزارش شده است (Silva *et al*., 2018).

تغییرات دمایی سیلاژ پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا

یکی از شاخص‌های نشان‌دهنده فاسد شدن سیلاژ افزایش درجه حرارت درون توده سیلاژ بالاتر از دمای محیط است. لذا برای ارزیابی فساد هوازی، بررسی تغییرات دمایی نمونه‌های سیلاژ طی روزهای قرار گرفتن در معرض هوا بررسی شد. نتایج حاصل در شکل ۱ و جدول ۳ نشان داده شده است. حداکثر دما[1]، زمان دستیابی به حداکثر دما [2]، و پایداری هوازی[3] تحت تأثیر تلقیح باکتری‌ها قرار گرفت. لذا کاهش حداکثر دما، افزایش زمان دستیابی به حداکثر دما و بهبود پایداری هوازی پس از ۱۰۵ روز تخمیر در سیلاژهای محتوی افزودنی باکتریایی مشاهده شد (شکل ۱، جدول ۳). در این مطالعه، سیلاژهای تلقیح شده نسبت به سیلاژ شاهد در طول ارزیابی اولیه افزایش دمای کندتری را و نرخ افزایش دمای پایین‌تری را نشان دادند بنابراین، پایداری هوازی بالاتری داشتند (جدول ۳). علاوه‌بر بررسی تغییرات دمایی و پایداری هوازی سیلاژها، حداکثر دما و زمان مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر دما محاسبه شد که تفاوت معنی‌داری بین سیلاژهای با و بدون افزودنی میکروبی برای این متغیرها مشاهده شد (شکل ۱). بالاترین دمای حداکثر در سیلاژ شاهد مشاهده شد (۳۸/۵۰ درجه سانتی‌گراد)، حداکثر دما در دیگر سیلاژهای ارزیابی شده کمتر (به‌طور متوسط ۳۲ درجه سانتی‌گراد) و تقریباً مشابه یکدیگر بود (شکل ۱).

1- Tmax: Maximum Temperature Reached (ºC)
2- TMT: Time spent to reach Maximum Temperature (hours)
3- AS: Aerobic Stability (AS)

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی و میکروبی ذرت قبل از سیلو شدن

Table 2- Chemical and microbialo composition of maize before ensiling

متغیرها **Variables**	میانگین Average
pH	5.20
ماده خشک (گرم بر کیلوگرم علوفه تازه) Dry matter (g/kg of fresh matter)	350.02
ظرفیت بافری (میلی اکی والان بر کیلوگرم ماده خشک) Baffering capacity [1] (mEq/kg of dry matter)	210.00
ضریب تخمیر Fermentation coefficient (FC) [2]	35.39
ترکیب شیمیایی (گرم بر کیلوگرم ماده خشک) Chemical composition (g/kg of dry matter)	
کربوهیدرات محلول در آب Water-soluble carbohydrates (WSC)	97.160
الیاف نامحلول در شوینده خنثی Neutral detergent fiber (NDF)	480.00
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی Acid detergent fiber	265.00
پروتئین خام Crude protein	80.04
جمعیت میکروبی (کلنی جمعیت میکروبی شمارش شده در علوفه بر پایه لگاریتم) Microbial population (log cfu/g of forage)	
باکتری‌های لاکتیک اسید Lactic acid bacteria (LAB)	5.73
مخمرها Yeasts	5.57
قارچها Molds	3.20

[1] بر اساس میلی‌اکی والان سود ۰/۲ نرمال مورد نیاز برای رساندن pH یک کیلو گرم ماده خشک علوفه از ۴ به ۶

[2] ضریب تخمیر= FC= DM%+8WSC/BC (Addah et al., 2011)

داده های شیمیایی بر حسب گرم در کیلوگرم ماده خشک می باشند و ترکیب اجزای میکروبی برحسب لگاریتم واحد تشکیل کلونی به ازای هر گرم علوفه تازه است.

[1] Expressed as mEq of 0.2 N NaOH required to raise pH of 1 kg (DM) of forage from 4 to 6.

[2] Co-efficient of fermentation:FC= DM%+8WSC/BC (Addah *et al*., 2011).

Chemical data are in g/kg dry matter (DM), and microbial composition is in log colony-forming units (cfu)/g of fresh forage.

در بررسی زمان رسیدن به حداکثر دما، سیلاژهای تیمار شده با باکتری‌ها زمان بیشتری برای دستیابی به حداکثر دما گذراندند. این سیلاژها به‌طور متوسط پس از ۹۱ ساعت به حداکثر دما رسیدند، در حالی‌که سیلاژ شاهد پس از ۳۶ ساعت به حداکثر دما رسید (شکل ۱). پس از بازکردن سیلوها، طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا، سیلاژ شاهد پس از گذشت تقریباً ۶۶ ساعت شروع به گرم‌شدن 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 (۳۸/۵۰ درجه سانتی‌گراد) رسید که ۱۵/۵۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط بود (جدول ۳). در سیلاژ محتوی باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که بالاترین پایداری هوازی را نشان داد، افزایش دما بعد از تقریباً ۱۹۲ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا رخ داد، پس از ۱۹۶ ساعت دمای سیلاژ بیش از دو درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط شد و پس از ۲۶۵ ساعت به حداکثر دما (هفت درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای محیط) رسید (شکل ۱، جدول ۳). سیلاژ تلقیح شده با جدایه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، در کل دوره ارزیابی با سرعت کمتری گرم شد، دمای آن به دمای محیط نزدیکتر بود که نشان‌دهنده پایداری هوازی بالاتری است.

افزایش دمای علوفه سیلوشده و نگهداری آن با گذشت زمان از شاخص‌های اصلی فساد و تخریب هوازی است که منعکس‌کننده فعالیت مخمرها و رشد قارچهای رشته‌ای است (Santos *et al*., 2013; Santos *et al*., 2016). رشد و فعالیت مخمرها شرایطی را ایجاد می‌کند که باعث تحریک رشد قارچها می‌شود که ممکن است تأثیر مستقیمی بر افزایش دما در مطالعه حاضر داشته باشد. تغییرات درجه حرارت سیلاژ هنگام قرار گرفتن در معرض هوا عمدتاً به‌دلیل رشد قارچها به نظر می‌رسد (۱۸). در این پژوهش، حداکثر دمای

سیلاژهای ذرت رابطه منفی با پایداری هوازی سیلاژها داشت (جدول ۳) و سیلاژهای با پایداری هوازی کمتر، حداکثر دمای بالاتری داشتند که نشان‌دهنده کاهش فعالیت متابولیکی ریزجانداران تخریب‌کننده سیلاژ است (۲۵).

در این مطالعه، سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بهترین نتیجه را پس از قرار گرفتن در معرض هوا به نمایش گذاشت که نشان‌دهنده زوال کمتر توسط ریزجانداران است. با توجه به شکل ۱، سیلاژ تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مدت زمان بیشتری برای رسیدن به حداکثر دما نشان داد و از بقیه سیلاژها جدا شد. همچنین به‌دلیل پایین بودن دمای این سیلاژ نسبت به سایر سیلاژهای تلقیح شده برجسته شد. در این سیلاژ، ثبات هوازی بیشتر ممکن است به‌دلیل غلظت بیشتر اسید استیک مشاهده شده باشد (جدول ۵). اسید استیک رشد مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای را کاهش می‌دهد و به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در برابر میکروب‌های نامطلوب نقش دارد، در نتیجه ثبات هوازی بیشتری برای سیلاژ ایجاد می‌کند (Avila *et al.*, 2010; Nkosi *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019).

پایداری هوازی سیلاژ پس از باز شدن سیلوها و قرار گرفتن در معرض هوا

پایداری هوازی سیلاژ که به‌عنوان تغییرات در ترکیبات شیمیایی، میکروبی و خصوصیات تخمیری مورد مطالعه قرار گرفت، در جدول ۴ و ۵ ارائه شده است. دینامیک تعداد ریزجانداران زنده برای هر سیلاژ در هنگام قرار گرفتن در معرض هوا در جدول ۴ نشان داده شده است. اثر باکتری‌های تلقیحی، روزهای قرار گرفتن در معرض هوا و اثر متقابل آن‌ها بر جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک، مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای مشهود بود ($P<0/01$). برای جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک، تعداد مخمرها و قارچ‌ها، پس از باز شدن سیلوها، بین باکتری‌های تلقیحی و زمان ارزیابی در سیلاژ اثر مشترک معنی‌داری وجود داشت که نشان می‌دهد باکتری‌های مورد استفاده در لحظه سیلوکردن بر جمعیت این ریزجانداران در مرحله هوازی تأثیر می‌گذارند. در روز باز شدن سیلوها، پس از ۱۰۵ روز تخمیر (زمان صفر)، جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک برای هر سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها در مقایسه با سیلاژ شاهد بیشتر بود ($P<0/01$؛ جدول ۴). این اثر احتمالاً می‌تواند به این دلیل باشد که در شرایط اسیدی قابلیت زیست برخی باکتری‌های اسید لاکتیک ممکن است کاهش یابد و فقط باکتری‌های اسید لاکتیک تخصصی همانند باکتری‌های اسیدلاکتیک تخمیرکننده ناهمگن می‌توانند فعال بمانند (Assis *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). همچنین، افزایش جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک نشان می‌دهد که این ریزجانداران در مقایسه با مخمرها و قارچ‌ها بر روند تخمیر تسلط دارند، که یک ویژگی مثبت محسوب می شود (Assis *et al.*, 2014).

جدول ۳- دینامیک دمایی سیلاژهای ذرت علوفه‌ای با و بدون افزودنی میکروبی طی هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا

Table 3- Dynamics of temperature during aerobic exposure of corn silages without inoculants and inoculated with strains of lactic acid bacteria (LAB)

تیمارهای آزمایشی Experimental Treaments[1]	فراسنجه[2]		
	نرخ افزایش دما Rate (ºC/h)	فساد هوازی AD (ºC)	پایداری هوازی AS (h)
Control	0.144 [a]	15.50 [a]	72.00 [e]
LP	0.063 [b]	11.00 [b]	117.00 [d]
LS	0.033[e]	8.00 [e]	156.00 [b]
PA	0.045[c]	10.00 [c]	120.00 [c]
LF	0.026 [f]	7.00 [f]	196.00 [a]
EF	0.039 [d]	9.00 [d]	120.00 [c]
SEM	0.001	0.156	0.152
P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001

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

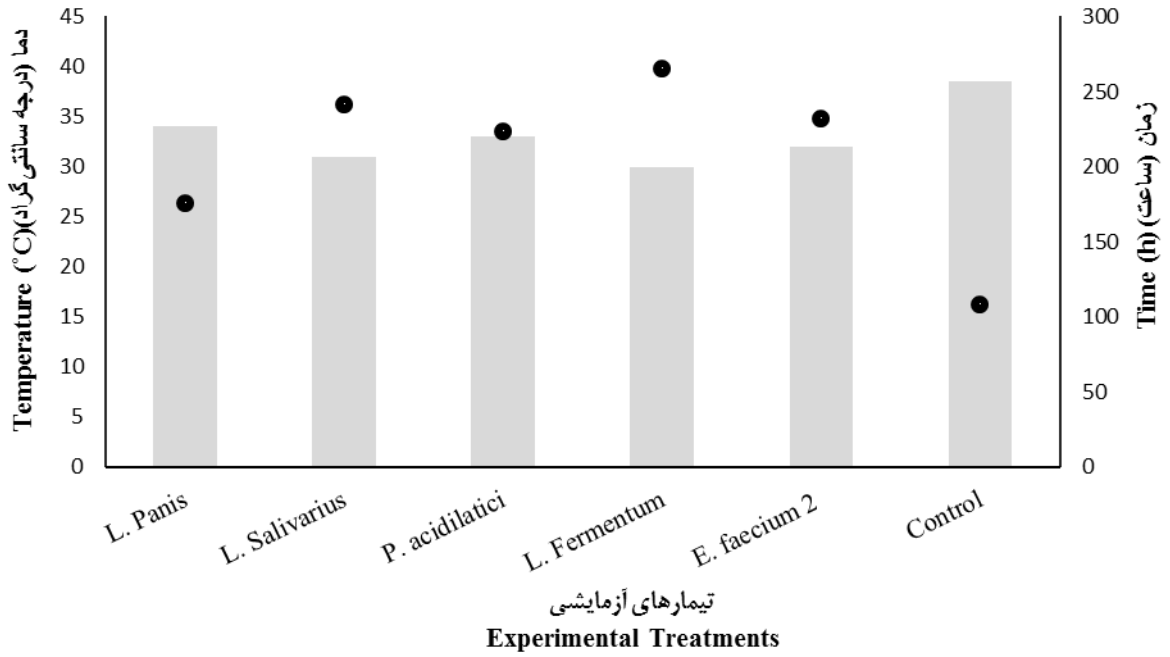
[۱] کنترل، بدون افزودنی؛ *لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسدیلاکتیسی؛ لاکتولاسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[۲] نرخ= نرخ افزایش دما (درجه سانتی‌گراد در ساعت)؛ زمان ۲ درجه سانتی‌گراد= زمان افزایش دما در ۲ درجه سانتی‌گراد به عنوان پایداری هوازی تعریف شد (AS)؛ AD= تخریب هوازی به عنوان مجموع افزایش دمای روزانه (درجه سانتی‌گراد) بالاتر از دمای مرجع در طول ۸ روز اول هوازی تعریف شد.

[a,b] The means within the same columns with different letter have significant difference ($P < 0.05$).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA*, *Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] Rate= temperature rise rate (ºC/hour); Time 2 ºC= time to raise the temperature in 2 ºC defined as Aerobic Stability (AS); AD= Aerobic deterioration was defined as the sum of the daily temperature increases (°C) above the reference temperature during the first 8 d of aerobiosis.



شکل ۱ – حداکثر دما (نمودار میله‌ای) و زمان مورد نیاز برای دستیابی به حداکثر دما (نقاط مشکی)

Figure 1- Maximum temperature achieved (bars) and the time required to achieve it (black spots) for different treatments after 8 d of aerobic exposure

بیشترین جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در سیلاژ با جدایه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد. این نتایج ممکن است به‌دلیل توانایی زنده ماندن این جدایه طی فرآیند تخمیر باشد و سریع‌تر از سایرین این باکتری تلقیحی تکثیر شده باشد (Santos *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2016). پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک در سیلاژ شاهد مشاهده شد. در روزهای صفر و چهار، هر سیلاژ محتوی باکتری‌های تلقیحی در مقایسه با سیلاژ شاهد تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتری را نشان دادند. طی قرار گرفتن در معرض هوا، باکتری‌های اسید لاکتیک هنوز هم می‌توانند چهار تا پنج روز رشد کنند، زیرا چندین جدایه به‌عنوان بی‌هوازی‌های مقاوم به هوا طبقه‌بندی می‌شوند، مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لئوکونستوک مزنتریودیس* و *استرپتوکوکوس لاکتیس*. همچنین وضعیت بی‌هوازی در ته ظرف سیلاژ هنوز باعث رشد باکتری‌های اسید لاکتیک می‌شود (Lee *et al.*, 2019). با این حال، پس از هشت روز قرارگرفتن در معرض هوا، افزایش این ریزجانداران در سیلاژ شاهد وجود داشت، همچنین سیلاژ با ماده تلقیحی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* کاهش باکتری‌های اسید لاکتیک بیشتری را نشان داد (جدول ۴).

مطالعات اندکی برای ارزیابی جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در طول قرار گرفتن در معرض هوا وجود دارد. از آن جا که برخی از ریزجانداران که به این گروه تعلق ندارند، ممکن است در محیط ام آر اس مورد استفاده برای شمارش تعداد باکتری‌های اسید لاکتیک رشد کنند، این تعداد می‌تواند بیش از حد تخمین زده شود (Avila *et al.*, 2010; Assis *et al.*, 2014). با این حال، آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2009) با استفاده از همان محیط، مشاهده کردند که ۷۲ جدایه جداشده در سیلاژ نیشکر همه از جنس لاکتوباسیلوس بودند. در مطالعه حاضر، پس از باز شدن سیلاژهای تلقیح شده، رشد باکتری‌های اسید لاکتیک، فعالیت مخمر و کپک‌ها را مهار کرد. در لحظه باز شدن سیلوها، تعداد مخمرها در تمامی سیلاژها زیر سطح حداقل تعیین شده برای تشخیص (10^2 cfu/g FM) بود. از آن جا که شرایط هوازی تکثیر سلول‌ها را افزایش می‌دهد، افزایش تعداد مخمرها در سیلاژها انتظار می‌رفت. با این حال، در سیلاژ شاهد جمعیت مخمرها طی چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت، امّا در بقیه سیلاژها جمعیت مخمرها همچنان پایین بود. در سیلاژهای تلقیح شده، این افزایش به‌دلیل محتوای بالاتر اسید استیک (جدول ۵) کندتر اتفاق افتاد (جدول ۴).

به‌خوبی مشخص شده است که مخمرها مسئول اصلی فساد هوازی سیلاژ هستند. فرضیه این است که سیلاژ دارای جمعیت مخمر

بیشتر از $5\ \log_{10}$cfu/g FM کیفیت میکروبی نامناسبی را در سیلاژ ایجاد کرده و بیشتر در معرض فساد هوازی هستند (Addah *et al.*, 2011; Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). علاوه‌براین، غلظت‌های بالای اسید لاکتیک و باقی‌مانده کربوهیدرات‌های محلول در آب در سیلاژی با کیفیت خوب، سوبستراهایی برای مخمرها، قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی هستند (Silva *et al.*, 2018)، به‌ویژه اگر مخمرها مصرف‌کنندگان لاکتات در مقایسه با مصرف‌کنندگان کربوهیدرات‌های محلول در آب باشند (Addah *et al.*, 2011). در پژوهش حاضر، طی قرار گرفتن نمونه‌های سیلاژ در معرض هوا، تعداد مخمرها در سیلاژ بدون باکتری تلقیحی (سیلاژ شاهد) به‌سرعت افزایش یافت و از مقدار مشخص $5\ \log_{10}$cfu/g FM فراتر رفت. در حالی که در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده، به‌خصوص در سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، افزایش تعداد مخمرها به‌کندی انجام شد. جمعیت ذکر شده فقط در صورتی معتبر است که حاوی مخمرهایی باشد که از لاکتات استفاده می‌کنند و جمعیت بالایی از مخمرها لزوماً فاسد شدن سیلاژ را نشان نمی‌دهد (Carvalho *et al.*, 2014). بین جمعیت مخمر در سیلاژ و از دست دادن ثبات هوازی همبستگی وجود دارد (Carvalho *et al.*, 2014; Basso *et al.*, 2012).

در مطالعه حاضر در زمان باز کردن سیلوها، هیچ گونه قارچی مشاهده نشد و جمعیت قارچ‌ها در هر سیلاژ زیر سطح حداقل تعیین شده برای تشخیص (۱۰۲ cfu/g FM) بوده و قابل شمارش نبودند. پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا جمعیت قارچ‌ها در سیلاژ شاهد افزایش یافت و به محدوده سطح قابل تشخیص cfu/g FM ۱۰۲ رسید. جمعیت قارچ‌ها در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها در طول چهار روز که در معرض هوا قرار داشت، همچنان زیر سطح حداقل قابل تشخیص بود و در طول هشت روز جمعیت آن‌ها در این سیلاژها در محدوده cfu/g FM ۱۰۲ قرار گرفت، به‌استثنای سیلاژ تلقیح‌شده با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که در طول هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا هیچ قارچی مشاهده نشد. امّا در سیلاژ شاهد تعداد قارچ‌ها در روز هشتم بیش از cfu/g FM ۱۰۲ بود. طبق گزارش آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2010) مهار رشد قارچ‌ها می‌تواند به‌دلیل غلظت کم اکسیژن، غلظت زیاد اسید لاکتیک و استیک یا باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در تمامی سیلاژها در زمان باز کردن سیلو رخ دهد. همچنین، طبق مشاهده لی و همکاران (Lee *et al.*, 2019) عدم وجود قارچ و محتوای ناچیز بوتیرات در تمام سیلاژها ممکن است به‌دلیل اسیدی بودن و pH پایین در سیلاژ باشد. در مطالعه چن و همکاران (Chen *et al.*, 2017) نیز مشابه این مطالعه جمعیت قارچ‌ها از حداقل سطح قابل تشخیص تعیین شده (<2 cfu/g FM) کمتر گزارش شده است. مهار باکتری‌های هوازی (از طریق pH پایین) و قارچ‌ها (از طریق از بین بردن اکسیژن) در فرآیند تخمیر سیلاژ از عوامل کلیدی می‌باشد که مسئول ایجاد سیلاژی با کیفیت بالا هستند و در صورت قرار گرفتن در معرض هوا پایدارتر است (Pang *et al.*, 2011).

شاخص pH فراسنجه خوبی برای تعیین میزان وخامت هوازی سیلاژ است؛ زیرا اسید لاکتیک توسط مخمرهای جذب‌کننده لاکتات طی مدت زمانی‌که سیلاژ در معرض نفوذ هوا قرار می‌گیرد، مصرف می‌شود و سیلاژ برای رشد سایر ریزجانداران نامطلوب مانند کپک‌ها، قارچ‌ها و باکتری‌های هوازی مطلوب می‌شود (Basso *et al.*, 2012; Kung *et al.*, 2018). pH تمامی سیلاژها پس از قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت، امّا این افزایش به‌طور متفاوتی بین تیمارها اتفاق افتاد ($P<0/01$؛ برای اثر مشترک معنی‌دار بین روز یا ساعت قرار گرفتن در معرض هوا و سیلاژ). پس از ۲۴ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ شاهد شروع به افزایش کرد، در حالی که کاهش جزئی pH برای سیلاژهای تلقیحی مشاهده شد (شکل ۲).

پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ شاهد بالاتر از pH سیلاژهای تلقیح‌شده با باکتری‌ها بود، البته در سیلاژ محتوی *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* طی چهار روز همچنان کاهش pH نسبت به روز صفر مشاهده شد. با این حال، تمام سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌ها در چهارمین روز قرار گرفتن در معرض هوا مقادیر pH پایینی نسبت به سیلاژ شاهد داشتند ($P<0/01$). سیلاژ تلقیح‌شده با باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در طول دوره هشت روز اندازه‌گیری پایداری هوازی، pH نسبتاً ثابت و کمی را حفظ کرد و افزایش کمی نشان داد. به‌عنوان مثال، برخی محققین گزارش دادند که پس از سه روز قرار گرفتن در معرض هوا، pH سیلاژ ذرت از ۳/۸ به ۵/۸ افزایش یافت (Ranjit and Kung, 2000)، در مطالعه ما، پس از ۹۶ ساعت قرار گرفتن در معرض هوا، pH تمام سیلاژهای تلقیح‌شده هنوز هم در حد مطلوب سیلاژ ذرت (۳/۷ – ۴/۲) (Kung and Shaver, 2001) قرار داشت. به عبارت دیگر، pH تقریباً پس از گذشت چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا افزایش یافت. مقدار pH در سیلاژ محتوی باکتری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* در روز هشتم کم بود؛ این مطلب با تعداد کمتر مخمر در این تیمار و غلظت بالاتر اسیداستیک می تواند ارتباط داشته باشد (جدول ۴ و ۵). افزایش pH پس از باز شدن سیلوها در تحقیقات قبلی نیز مشاهده شده است (Avial *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018). pH در سیلاژهای تلقیح‌شده با جدایه‌های باکتریایی طولانی‌تر از سیلاژ شاهد پایدار باقی ماند، به‌ویژه در سیلاژ با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که یک باکتری با تخمیر ناهمگن اجباری است. سیلاژ شاهد غلظت بالاتری از اسید لاکتیک و غلظت کمتری از اسید استیک را نشان داد که منجر به زوال سریع‌تر آن شد. در سیلاژ شاهد و دیگر سیلاژهای تلقیح شده با باکتری‌ها افزایش pH

همزمان با کاهش در غلظت اسید لاکتیک و استیک اسید اتفاق افتاد (جدول ۵) و می‌تواند به مصرف این اسیدهای تولید شده طی تخمیر مرتبط باشد (Carvalho *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2018).

تأثیر باکتری‌های تلقیحی بر خصوصیات تخمیری سیلاژ ذرت در هنگام قرار گرفتن در معرض هوا مشهود بود (P<۰/۰۱). روزهای قرار گرفتن در معرض هوا نیز تأثیر معنی‌داری بر پایداری هوازی داشت. اثر متقابل بین تیمار و روز قرار گرفتن در معرض هوا به‌طور معنی‌داری خصوصیات تخمیری سیلاژ را تحت تأثیر قرار داد (جدول ۵). یک اثر مشترک معنی‌دار (P<۰/۰۱) بین روز قرار گرفتن در معرض هوا و باکتری‌های تلقیحی بر غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب سیلاژها وجود داشت (جدول ۵).

جدول ٤- ترکیب میکروبی سیلاژهای ذرت تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده با باکتری اسید لاکتیک در زمان‌های متفاوت قرار گرفتن در معرض هوا (لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر)

Table 4- Microbial composition of corn silages without inoculants and inoculated with Lactic acid bacteria (LAB) at different times of aerobic exposure (log_{10}cfu/g FM)

متغیرها Variable	تیمارها Treaments[1]	روزهای هوازی Days of air exposure (d)			Mean	SEM[2]	Analysis of variance[3] (P-value)		
		0	4	8			T	D	T×D
باکتری‌های اسیدلاکتیک LAB	Control	8.00^{d}	7.51^{d}	9.13^{a}	8.22^{d}	0.007	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	8.80^{c}	8.90^{c}	8.97^{b}	8.89^{c}				
	LS	8.95^{b}	9.01^{b}	8.81^{c}	8.93^{b}				
	PA	8.83^{c}	8.88^{c}	8.94^{b}	8.88^{c}				
	LF	9.26^{a}	9.30^{a}	8.85^{c}	9.14^{a}				
	EF	8.84^{c}	8.90^{c}	8.86^{c}	8.87^{c}				
	SEM	0.017	0.008	0.013	0.007				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
مخمرها Yeast	Control	2.92^{a}	6.35^{a}	7.98^{a}	5.75^{a}	0.010	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	2.11^{b}	2.88^{c}	6.21^{c}	3.73^{c}				
	LS	1.57^{d}	1.98^{e}	5.93^{d}	3.16^{e}				
	PA	2.11^{b}	3.18^{b}	6.53^{b}	5.94^{b}				
	LF	1.48^{e}	1.65^{f}	5.00^{e}	2.71^{f}				
	EF	1.98^{c}	2.68^{d}	6.16^{c}	3.61^{d}				
	SEM	0.016	0.012	0.027	0.010				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
قارچها Fungi	Control	ND[4]	2.89 ^{a}	3.98^{a}	2.29^{a}	0.008	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	ND	ND ^{b}	2.56^{bc}	0.85^{bc}				
	LS	ND	ND ^{b}	2.48^{c}	0.83^{c}				
	PA	ND	ND ^{b}	2.58^{b}	0.86^{b}				
	LF	ND	ND ^{b}	0.00 ^{d}	0.00^{d}				
	EF	ND	ND ^{b}	2.51^{bc}	0.84^{bc}				
	SEM	0.000	0.012	0.021	0.008				
	P-value	…….	<0.0001	0.014	<0.0001				

^{a,b} میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است (P<0.05).

[۱] کنترل، بدون افزودنی؛ *لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسیدیلاکتیسی؛ لاکتولاسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[۲] SEM: اشتباه معیار میانگین

[۳] T، اثر تیمار؛ D، اثر روزهای در معرض هوا؛ T × D، برهم‌کنش تیمار و روزهای در معرض هوا.

[۴] شناسایی نشد، کمتر از ۲ لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر؛ غیر قابل شناسایی (در رقت $۱۰^{-۱}$).

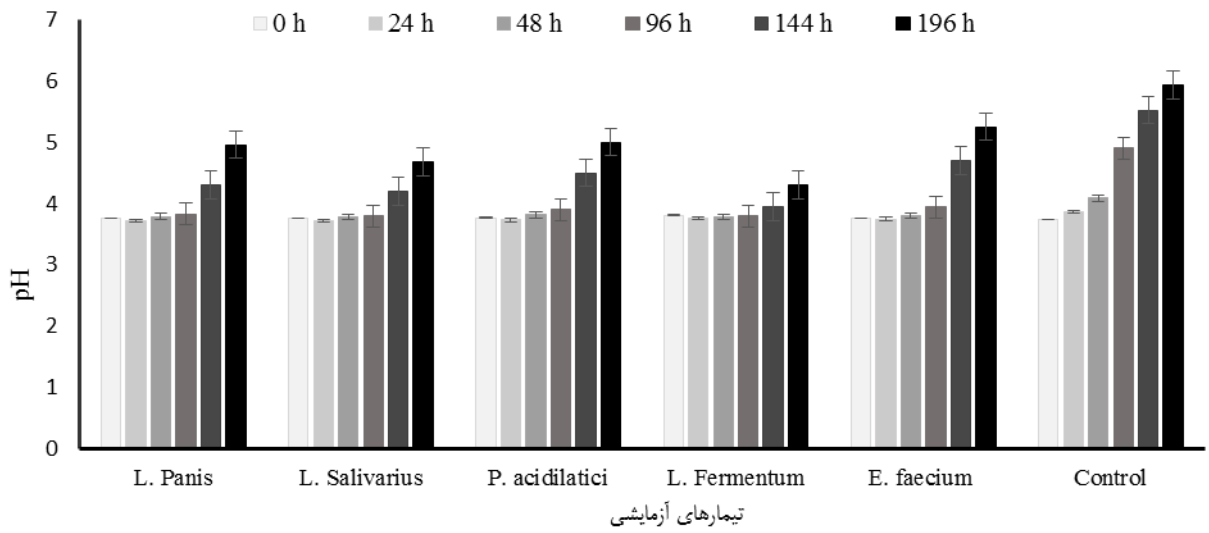
^{a,b} The means within the same columns with different letter have significant difference (P < 0.05).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA*, *Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] SEM, standard error of means

[3] T, effect of treatment; D, effect of aerobic exposure day; T × D, interaction between treatment and aerobic exposure day.

[4] Not detectable, < 2.00 log_{10}cfu/g FM； ND, non-detectable (dilution 10^{-1}).



شکل ۲- اثر تلقیح سیلاژهای ذرت بر تغییرات pH، طی ۸ روز قرارگرفتن در معرض هوا

Figure 2- Effect of inoculation of corn silages on changes in pH during 8 d of aerobic exposure

پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، غلظت کربوهیدرات‌های محلول در آب در نمونه‌های سیلاژ تلقیح شده با باکتری‌ها به‌طور جزئی کاهش یافت، امّا این کاهش در سیلاژ شاهد بیشتر بود. محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب در تمام سیلاژهای تلقیح‌شده به‌تدریج طی هشت روز قرار گرفتن در معرض هوا کاهش کمی نشان داد، امّا در سیلاژ شاهد این کاهش چشمگیر بود. با این حال، کاهش محتوای کربوهیدرات‌های محلول در آب کمتر از اسید لاکتیک در طول آزمون پایداری هوازی بود.

محتویات اسید لاکتیک در روز چهارم در سیلاژ شاهد به‌شدت کاهش یافت ($P<۰/۰۱$) و در پایان آزمون پایداری هوازی به کمترین مقدار بین سیلاژها رسید و به‌سرعت pH سیلاژ شاهد را افزایش داد. نتایج این پژوهش میزان سریع‌تر تخریب لاکتات را نسبت به باقی‌مانده کربوهیدرات محلول در آب در سیلاژ شاهد نشان می‌دهد، در این زمینه، ما تصور می‌کنیم که تعداد مخمر جذب‌کننده لاکتات از مخمر جذب‌کننده کربوهیدرات‌های محلول در آب بالاتر بود. مخمرهای جذب‌کننده لاکتات، اسید لاکتیک را مصرف می‌کنند و در نتیجه، با قرار گرفتن در معرض هوا باعث افزایش pH سیلاژ می‌شوند (Chen *et al.*, 2017).

غلظت لاکتات در سیلاژهای تلقیح شده طی چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا نسبتاً ثابت باقی ماند، امّا بعد از هشت روز برای تمامی سیلاژها به‌طور چشمگیری کاهش یافت، به‌استثنای سیلاژ تلقیح شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* که کاهش کمتری داشت. نتایج مطالعه حاضر، یافته‌های محققین دیگر را تأیید می‌کند که گزارش کردند که مقدار بالای اسید لاکتیک تولید شده با تولید ناکافی اسیدهای چرب فرار در طول دوره تخمیر سیلاژ باعث افزایش فعالیت مخمرهای جذب‌کننده لاکتات می‌شود و فرآیند فساد در سیلاژ را آغاز کرده، اسید لاکتیک را به دی‌اکسیدکربن و آب متابولیزه و باعث افزایش pH سیلاژ می‌شوند (Ranjit and Kung., 2000; Chen *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2018). همان‌طور که مشاهده شد، تعداد مخمرها در سیلاژ شاهد در ابتدای آزمون پایداری هوازی (روز صفر) نسبت به سیلاژهای تلقیح شده بالاتر بود و از ابتدای آزمون پایداری هوازی تا روز هشت، افزایش تعداد مخمرها در سیلاژ شاهد ادامه پیدا کرد و هم‌زمان با رشد مخمرها محتوای اسید لاکتیک کاهش یافت ($P<۰/۰۱$)، چرا که مخمرها قادر به استفاده از اسید لاکتیک به‌عنوان منبع کربن هستند (Carvalho *et al.*, 2014)، و این امر به‌سرعت pH سیلاژ را افزایش داد. با افزایش pH، ریزجانداران دیگری که در سیلاژ غیرفعال بودند، ظاهر می‌شوند، در نتیجه سیلاژ بیشتر فاسد می‌شود (Addah *et al.*, 2011; Avila *et al.*, 2012). در مورد سیلاژهای تلقیح شده، افزایش pH، ناشی از کاهش اسیدهای آلی، شرایط را برای تولید مخمرها فراهم می‌کند که کاهش اسید لاکتیک و افزایش pH، پس از چهار روز مشاهده شد و در روز هشت آزمون پایداری هوازی مقدار pH سیلاژها بالا بود.

جدول ۵- خصوصیات تخمیری سیلاژهای ذرت تلقیح‌نشده و تلقیح‌شده با باکتری اسیدلاکتیک در زمان‌های متفاوت قرار گرفتن در معرض هوا (گرم بر کیلوگرم ماده خشک)

Table 5- Fermentation characteristics of corn silages without inoculants and inoculated with Lactic acid bacteria strains at different times of aerobic exposure (g/kg of DM).

متغیرها Variable	تیمارها Treaments[1]	روزهای هوازی Days of air exposure (d)			Mean	SEM[2]	Analysis of variance[3] (P-value)		
		0	4	8			T	D	T×D
کربوهیدرات محلول‌درآب WSC	Control	10.00^{a}	6.50^{c}	2.64^{d}	6.38^{c}	0.112	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	7.24^{d}	7.07^{bc}	4.64^{bc}	6.32^{c}				
	LS	7.78^{c}	7.65^{b}	6.06^{a}	7.17^{b}				
	PA	7.27^{d}	6.70^{c}	4.30^{c}	6.09^{c}				
	LF	5.70^{e}	5.65^{d}	5.20 ^{b}	5.52^{d}				
	EF	9.36^{b}	9.05^{a}	5.12^{b}	7.84^{a}				
	SEM	0.069	0.143	0.157	0.112				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اسید لاکتیک Lactic acid	Control	75.62^{a}	40.27^{d}	15.29^{e}	43.73^{d}	0.398	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	75.03^{a}	73.13^{a}	19.56^{d}	55.91^{c}				
	LS	73.98 ^{ab}	72.85^{ab}	30.36^{b}	59.06^{b}				
	PA	74.90^{ab}	70.04^{c}	19.44^{d}	54.79^{c}				
	LF	71.70^{b}	70.80^{bc}	50.12^{a}	64.21^{a}				
	EF	73.13^{ab}	71.76^{abc}	22.20^{c}	55.70^{c}				
	SEM	0.786	0.520	0.085	0.398				
	P-value	0.010	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اسید استیک Acetic acid	Control	30.89^{e}	15.00^{d}	7.00^{d}	17.63^{e}	0.325	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	37.35^{cd}	38.56^{c}	11.51^{c}	29.14^{c}				
	LS	40.66^{b}	42.70^{b}	14.03^{b}	32.46^{b}				
	PA	37.39^{c}	38.05^{c}	10.49^{c}	28.64^{cd}				
	LF	50.06^{a}	52.50^{a}	25.01^{a}	42.52^{a}				
	EF	35.67^{d}	36.51^{c}	11.14^{c}	27.77^{d}				
	SEM	0.408	0.759	0.293	0.325				
	P-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001				
اتانول Ethanol	Control	15.02^{a}	10.37^{a}	1.66^{b}	9.02^{a}	0.160	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	LP	12.51^{b}	7.37^{b}	1.93^{ab}	7.27^{b}				
	LS	10.50^{c}	7.06^{b}	2.13^{ab}	6.57^{b}				
	PA	11.92^{bc}	7.56^{b}	1.95^{ab}	7.14^{b}				
	LF	10.70^{bc}	6.94^{b}	2.32^{a}	6.65^{b}				
	EF	10.32^{c}	8.06^{b}	1.69^{b}	6.69^{b}				
	SEM	0.393	0.327	0.118	0.160				
	P-value	<0.0001	<0.0001	0.014	<0.0001				

^{a,b} میانگین‌ها در هر ستون با حروف نامشابه، دارای تفاوت معنی‌دار است ($P<0.05$).

[۱] کنترل، بدون افزودنی؛ *لاکتوباسیلوس پانیس؛ لاکتوباسیلوس سالیواریس؛ پدیکوکوس اسدیلاکتیسی؛ لاکتولاسیلوس فرمونتوم؛ انتوکوکوس فاسیوم.*

[۲] SEM: اشتباه معیار میانگین

[۳] T، اثر تیمار؛ D، اثر روزهای در معرض هوا؛ T × D، برهم‌کنش تیمار و روزهای در معرض هوا.

[۴] شناسایی نشد، کمتر از ۲ لگاریتم کلنی شمارش‌شده به‌ازای گرم علوفه تر؛ غیر قابل شناسایی (در رقت $۱۰^{-۱}$).

^{a,b} The means within the same columns with different letter have significant difference ($P < 0.05$).

[1] Control, no additives; LP, *Lactobacillus Panis*; LS, *Lactobacillus salivarius*; *PA*, *Pedicoccus acidilatici*; LF, *Lactobacillus fermentum*; EF, *Enterococcus faecium.*

[2] SEM, standard error of means

[3] T, effect of treatment; D, effect of aerobic exposure day; T × D, interaction between treatment and aerobic exposure day.

[4] Not detectable, < 2.00 $\log_{10}$cfu/g FM; ND, non-detectable (dilution 10^{-1}).

برای غلظت‌های اسید استیک و اتانول اثر متقابل معنی‌داری بین مواد تلقیحی و زمان ارزیابی مشاهده شد (جدول ۵). بیشترین غلظت اسید استیک در زمان باز شدن سیلوها (روز صفر قرار گرفتن در معرض هوا)، در تیمار با جدایه *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد. در رابطه با اسید استیک، کاهش غلظت آن در روز چهارم ارزیابی پایداری هوازی در شاهد مشاهده شد (جدول ۵). با این حال، پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا، غلظت اسید استیک در تمام سیلاژهای محتوی باکترهای تلقیحی، به‌ویژه در سیلاژهای تلقیحی با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* افزایش یافت. طبق نظر رنجیت و کانگ (Ranjit and Kung., 2000) و باسو و همکاران (Basso *et al.*, 2012) تولید استات توسط باکتری‌های تخمیرکننده ناهمگن ممکن است در طول قرار گرفتن در معرض هوا ادامه یابد. این افزایش غلظت استات را نمی‌توان جزء اتلاف ماده خشک به حساب آورد. بنابراین، ممکن است از ادامه تولید استات توسط باکتری‌های با تخمیر ناهمگن در طول قرار گرفتن در معرض هوا بوده باشد (Ranjit and Kung., 2000).

پس از گذشت چهار روز غلظت استیک اسید تا روز هشتم قرار گرفتن در معرض هوا، در تمامی سیلاژها کاهش یافت، گرچه غلظت اسید استیک در سیلاژ تلقیح‌شده با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* کاهش کمتری نشان داد (جدول ۵). بر اساس گزارش‌های محققین، کاهش اسیدهای استیک، پروپیونیک و بوتیریک، و غلظت‌های اتانول ممکن است به‌دلیل فرار شدن آن‌ها طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا باشد (Carvalho *et al.*, 2014). طبق گزارش‌های آویلا و همکاران (Avila *et al.*, 2012) و کاروالهو و همکاران (Carvalho *et al.*, 2014) کاهش غلظت اسید استیک ممکن است به‌دلیل فرار شدن این اسید یا استفاده آن توسط باکتری‌های اسید استیک اتفاق افتاده باشد. پس از استفاده از اتانول، این باکتری‌ها می‌توانند اسید استیک را به‌طورکامل (به‌خوبی اسید لاکتیک) به دی‌اکسیدکربن و آب متابولیزه کرده و باعث افزایش شدید pH شوند. به‌طورکلی، مشاهده شد که محصولات متابولیسم میکروبی تولید شده طی تخمیر پس از قرار گرفتن در معرض هوا، در سیلاژ شاهد با سرعت بیشتری در مقایسه با سیلاژهای دیگر از بین رفتند. داده‌ها نشان می‌دهند که در سیلاژهای تلقیح شده، محتوای اسیدهای استیک و لاکتیک تا چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا بالاتر است (جدول ۵). اسید استیک بسیار ضدمیکروب است و نشان داده شده است که مخمرها را مهار می‌کند (Basso *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2018).

در حالت دوم، ممکن است اسید استیک عامل اصلی رشد کندتر مخمر در دوره پس از باز شدن سیلوها باشد (Avila *et al.*, 2012)؛ مخمرهایی که لاکتات را جذب می‌کنند در وهله اول مسئول فساد سیلاژ هنگام قرار گرفتن در معرض هوا هستند (Basso *et al.*, 2012). رابطه بین اسید استیک و پایداری هوازی توسط محققین گزارش شده است؛ به نحوی که افزایش غلظت اسید استیک باعث مهار فساد توسط ریزجانداران می‌شود، بنابراین پایداری هوازی را افزایش می‌دهد. به گفته این محققان، افزایش غلظت اسید استیک در سیلاژ ثبات هوازی را بهبود می‌بخشد. ثبات بهبود یافته به عملکرد اسید استیک روی مخمرها و قارچها نسبت داده شده است (Avila *et al.*, 2010; Nkosi *et al.*, 2011; Basso *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2013; Carvalho *et al.*, 2014). همچنین استات به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروبی در برابر میکروب‌های نامطلوب نقش دارد (Lee *et al.*, 2019). علاوه‌براین، در سیلاژهایی که دارای باکتری‌های تلقیحی هستند، میزان بیشتر اسیدپروپیونیک (داده‌ها گزارش نشده است) و اسید استیک در لحظه باز کردن سیلوها ممکن است در رشد کمتر مخمرها (جدول ۴) نقش داشته باشد (Avila *et al.*, 2012).

در طول دوره ارزیابی پایداری هوازی، اتانول پس از قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا از بین رفت (جدول ۵). کاهش اتانول پس از قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا به‌دلیل فرار شدن یا استفاده از آن برای تولید اسید استیک توسط باکتری‌ها است (Avila *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014)؛ از آن جایی‌که طی ارزیابی روز چهارم غلظت اسید استیک افزایش یافت، می توان نتیجه گرفت که کاهش غلظت اتانول به‌دلیل فرار شدن نبوده است (Carvalho *et al.*, 2014). همان‌طور که در نتایج حاصل از این مطالعه مشاهده شد، تلقیح سیلاژها با باکتری‌های اسید لاکتیک منجر به غلظت بالای اسید استیک و pH پایین پس از چهار روز قرار گرفتن در معرض هوا شد. این الگو می‌تواند به‌دلیل تأثیر باکتری‌های استیک اسید هوازی، عمدتاً جنس استوباکتر و گلوکونوباکتر باشد. این باکتری‌ها می‌توانند کربوهیدرات‌های محلول در آب و یا اتانول را به‌صورت هوازی به اسید استیک تبدیل کنند (Silva *et al.*, 2018). در سیلاژ شاهد چون طی ارزیابی پس از گذشت هشت روز غلظت اسید استیک افزایش نیافت، می‌توان فرض کرد که کاهش غلظت اتانول به‌دلیل فرار شدن باشد (Avila *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2014). مفاهیم مربوط به تغییرات غلظت محصولات نهایی تخمیر طی قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا پیچیده است. زیرا این متابولیت‌ها با گروه‌های مختلف ارگانیسم‌ها در ارتباط هستند (Carvalho *et al.*, 2014). پایداری هوازی سیلاژ عمدتاً با مهار رشد ریزجاندارانی است که می‌توانند در حضور اکسیژن در سیلوها رشد کنند. قارچ‌های رشته‌ای و مخمرها اصلی‌ترین ریزجاندارانی هستند که در تخریب هوازی سیلاژ نقش دارند (Santos *et al.*, 2016). مواد تلقیحی حاوی باکتری‌های اسیدلاکتیک تخمیرکننده ناهمگن که غلظت بالایی از اسید استیک تولید می‌کنند به‌دلیل اثر مهاری این اسید برای کنترل مخمر مناسب‌تر هستند (Silva *et al.*, 2018).

نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش، جدایه‌های باکتری اسیدلاکتیک آزمایش شده به‌عنوان باکتری‌های تلقیحی قادر به اصلاح پارامترهای تخمیری و شیمیایی سیلاژ ذرت پس از قرار گرفتن در معرض هوا بودند و اثرات مثبتی بر روی تخمیر و پایداری هوازی سیلاژ ذرت نشان دادند. استفاده از آن‌ها توصیه می‌شود، زیرا منجر به تولید بیشتر اسید استیک، pH پایدارتر، کاهش جمعیت مخمرها و قارچ‌ها، در نتیجه بهبود پایداری هوازی سیلاژهای تلقیح شده در مقایسه با سیلاژ شاهد شدند. با این حال، بهترین نتیجه هنگام قرار گرفتن نمونه‌های سیلاژ در معرض هوا، در سیلاژ تلقیح‌شده با جدایه ۱۶، جدایه تخمیرکننده ناهمگن اجباری *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* مشاهده شد؛ که ممکن است در نتیجه غلظت بالای اسید استیک تولید شده در این سیلاژ، همچنین جمعیت کمتر مخمرها و عدم رشد قارچ‌ها ایجاد شده باشد. بنابراین، این جدایه برای تولید افزودنی میکروبی سیلاژ مؤثر است. با این حال، نویسندگان توصیه می‌کنند که جدایه‌های باکتری‌ها در یک سیلوی با مقیاس مزرعه آزمایش شوند تا اثرات واقعی آن‌ها بررسی شود.

References

1. Addah, W., Baah, J., Groenewegen, P., Okine, E. K., & 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. https://doi.org/10.4141/CJAS10071
2. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis. Vol. 1. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
3. Assis, F. G. V., Avila, C. L. S., Pinto, J. C. & Schwan, R. F. (2014). New inoculants on maize silage fermentation, Revista Brasileira de Zootecnia, *43*(8), 395-403. https://doi.org/10.1590/S1516-35982014000800001
4. Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., & Schwan, R. F. (2009). Effects of an indigenous and a commercial *Lactobacillus buchneri* strain on quality of sugar cane silage. *Grass and Forage Science*, *64*, 384–394. https://doi.org/10.1111/j.1365-2494.2009.00703.x
5. Avila, C. L. S., Valeriano, A. R., Pinto, J. C., Figueiredo, H. C. P., Rezende, A.V., & Schwan, R. F. (2010). Chemical and microbiological characteristics of sugarcane silages treated with microbial inoculants. *Brazilian Journal of Animal Science*, *39*, 25–32. https://doi.org/10.1590/S1516-35982010000100004
6. Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Oliveira D. P., & Schwan, R. F. (2012). Aerobic stability of sugar cane silages with a novel strain of *Lactobacillus sp*. isolated from sugar cane. *Brazilian Journal of Animal Science*, *41*, 249–255. https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000200003
7. Avila, C. L. S., Carvalho, B. F., Pinto, J. C., Duarte W. F., & Schwan, R. F. (2014). Use of *Lactobacillus hilgardii* strains for enhancing quality of sugarcane silage. *Journal of Dairy Science*, *97*, 940–951. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6987
8. Basso, F. C., Bernardes, T. F., Roth, A. P. T. P., Lodo, B. N., Berchielli, T. T., & Reis, R. A. (2012). Fermentation and aerobic stability of corn silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *41* (7), 1789-1794. https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000700032
9. Carvalho, B. F., Avila, C. L. S., Miguel, M. G. C. P., Pinto, J. C., Santos, M. C., & Schwan, R. F. (2014). Aerobic stability of sugar-cane silage inoculated with tropical strains of lactic acid bacteria.*Grass and Forage Science*, *70*, 308-323. https://doi.org/10.1111/gfs.12117
10. Chen, L., Yuan, X. J., Li, J. F., Wang, S. R., Dong, Z. H., & 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. https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61482-X
11. Silva, T. C., Silva, L. D., Santos, E. M., & Oliveira, J. S. (2017). Importance of the fermentation to produce high-quality silage. pp. 1-22 in Fermentation Processes Croatia. A. Jozala, ed. IntechOpen.
12. Deraize, R. E. (1961). Routine analysis of carbohydrate and lignin in herbage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *12*, 152-159. https://doi.org/10.1002/jsfa.2740120210
13. Fabiszewska, A. G., Zielinska, K. J., & Wrobel, B. (2019). Trends in designing microbial silage quality by biotechnological methods using lactic acid bacteria inoculants: A minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(76), 1-8. https://doi.org/10.1007/s11274-019-2649-2
14. Jatkauskas, J., Vrotniakiene, V., & Stoskus, R. (2018). Variations in fermentation, bacterial population and aerobic stability in maize silage. *Zemdirbyste-Agriculture*, *105*(4), 377–382. https://doi.org/10.13080/z-a.2018.105.048
15. Kung, L., and R. Shaver. 2001. Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. Focus on Forage, 3: 1–5. https://fyi.extension.wisc.edu/forage/interpretation-and-use-of-silage-fermentation-analysis-reports.
16. Kung, L., Shaver, R. D., Grant, R. J., & Schmidt, R. J. (2018). Silage review: Interpretation of chemical, microbial, and organoleptic components of silages. *Journal of Dairy Science*, *101*, 4020–4033.

https://doi.org/10.3168/jds.2017-13909
17. Lee, S. S., Lee, H. J., Paradhipta, D. H. V., Joo, Y. H., Kim, S. B., Kim, D. H., & Kim, S. C. (2019). Temperature and microbial changes of corn silage during aerobic exposure. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, *32*, 988–995. https://doi.org/10.5713/ajas.18.0566
18. Nkosi, B. D., Meeske, R., Langa, T., & 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. https://doi.org/10.4314/sajas.v41i4.5
19. Oude Elferink, S. J. W. H., Krooneman, J., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F., Faber, F., & Driehuis, F. (2001). Anaerobic conversion of lactic acid to acetic acid and 1, 2-propanediol by *Lactobacillus buchneri*. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*, 125–132. https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.125-132.2001
20. Pang, H., Zhang, M., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., & Cai, Y. (2011). Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Animal Science Journal*, *82*, 642–653. https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2011.00894.x
21. Ranjit, N. K., & 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. https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(00)74912-5
22. Saarisalo, E., Skytta, E., Haikara, A., Jalava, T., & Jaakkola, S. (2007). Screening and selection of lactic acid bacteria strains suitable for ensiling grass. *Applied and Environmental Microbiology*, *102*, 327–336. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03103.x
23. Santos, A. O., Avila, C. L. S., & Schwan, R. F. (2013). Selection of tropical lactic acid bacteria for enhancing the quality of maize silage. *Journal of Dairy Science*, *96*, 7777–7789. https://doi.org/10.3168/jds.2013-6782
24. Santos2016, A. O., Avila, C. L. S., Pinto, J. C., Carvalho, B. F.Dias, D. R., & 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. https://doi.org/10.1111/jam.12980
25. SAS Institute. 2013. SAS User's Guide. Version 9.4. SAS Inst. Inc.,Cary , NC.
26. Silva, L. D., Pereira, O. G., Silva, T. C., Leandro, E. S., Paula, R. A., Santos, S. A., Ribeiro, K. G., & Valadares Filho, S. C. (2018). Effects of *Lactobacillus buchneri* isolated from tropical maize silage on fermentation and aerobic stability of maize and sugarcane silages. *Grass and Forage Science*, *73*, 660–670. https://doi.org/10.1111/gfs.12360