

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

رضا صدیقی وثاق^۱ و داریوش علیپور^{۲*}

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

تاریخ پذیرش ۱۲ خرداد ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۳ آبان ۱۳۹۴

چکیده

هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی باکتری‌های مصرف‌کننده اسیدلاکتیک و بررسی پتانسیل آنها در کنترل اسیدوز شکمبه‌ای در شرایط آزمایشگاهی بود. مایع شکمبه از سه رأس گاو هلشتاین جمع‌آوری گردید و جداسازی باکتری با استفاده از محیط کشت اختصاصی صورت گرفت. خصوصیات جدایه‌ها بر اساس شکل و رنگ آمیزی گرم، تولید ایندول، فعالیت کاتالازی و تخمیر برخی قندها بررسی شد. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از توالی یابی نوکلئوتیدی انجام گرفت. نتایج توالی یابی نشان داد که جدایه‌ها بیشترین خویشاوندی را با مگاسفرا السدنی DSM20460 داشتند. در مرحله بعد اثر جدایه‌ها بر کاهش اسیدلاکتیک و کنترل pH در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. مقدار یک گرم خوراک سریع‌تخمیر و ۱۰ میلی‌لیتر مایع شکمبه درون ویال‌های شیشه‌ای قرار داده شد و از هر جدایه دو دوز ۰/۵ و ۱ میلی‌لیتر به هر کدام تلقیح شد. ویال‌ها به مدت ۶ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند. تولید گاز، pH و اسیدلاکتیک هر نمونه اندازه‌گیری شد. استفاده از باکتری، غلظت اسیدلاکتیک را کاهش و تولید گاز و pH را افزایش داد ($p < 0/001$). نتایج نشان داد باکتری‌های مصرف‌کننده اسیدلاکتیک، پتانسیل کنترل اسیدوز شکمبه‌ای را دارند.

کلمات کلیدی: باکتری‌های مصرف‌کننده اسیدلاکتیک، مگاسفرا السدنی، pH اسیدلاکتیک

* نویسنده مسئول: داریوش علیپور

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

پست الکترونیک: alipourd@basu.ac.ir

مقدمه

جمعیت میکروبی در شکمبه دام‌های نشخوارکننده، به طور معمول برای هضم علوفه مناسب است و تغذیه این دام‌ها با مقدار زیادی مواد کنسانتره‌ای، تخمیر سریع میکروبی در شکمبه را در پی داشته و باعث کاهش pH می‌شود (۳۸ و ۱۳). اسیدوز توسط کاهش pH مشخص می‌شود که ناشی از تجمع اسیدهای آلی و تغییر تعادل میکروارگانیسم‌های شکمبه است (۷). بیشتر بودن نرخ تولید اسیدهای چرب فرار توسط میکروب‌ها نسبت به نرخ جذب آنها از طریق اپیتلیوم شکمبه، منجر به تجمع این ترکیبات در شکمبه و کاهش pH می‌گردد. کاهش pH تغییری را در الگوی تخمیر جمعیت میکروبی شکمبه از اسیدهای چرب فرار (VFA) به سمت اسید لاکتیک ایجاد می‌کند که به طور قابل توجهی قویتر از VFA است (۱۶) و سبب کاهش بیشتر pH می‌شود. لاکتات تشکیل شده در شکمبه ممکن است به سه روش حذف شود: عبور به بخش‌های پایین‌تر شکمبه - جذب مستقیم از شکمبه - تخمیر میکروبی (۳). باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات، اسید لاکتیک را متابولیزه کرده و بنابراین تجمع این محصول نهایی تخمیر را در شکمبه کنترل می‌نمایند، به ویژه وقتی جیره دام‌ها حاوی مقادیر بالای دانه است، این فرایند اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (۱۱). از باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات می‌توان *مگاسفرا السدنی* و *سلونوموناس رومینانتیوم* را نام برد. به هر حال، تکثیر این باکتری‌ها در pH پایین که ناشی از تجمع اسید لاکتیک است، مهار می‌شود (۱). در چنین شرایطی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیک می‌تواند سبب تقویت جمعیت این باکتری‌ها و تکثیر سریع‌تر آنها شود (۱). م. السدنی یکی از مهمترین باکتری‌ها برای این منظور می‌باشد. حدوداً ۶۵ تا بیش از ۹۵ درصد اسید لاکتیک داخل شکمبه

توسط *السدنی* مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۷، ۱۵ و ۱۸) و بنابراین به منظور استفاده جهت کنترل وقوع اسیدوز شکمبه‌ای حائز اهمیت است. مطالعات درون تنی و آزمایشگاهی، نقش اساسیم. السدنی در مهار تجمع اسید لاکتیک در طول انتقال به جیره متراکم را نشان داده است (۸). کانگ و هسین (۸) گزارش کردند که استفاده از م. السدنی در شرایط آزمایشگاهی غلظت لاکتات را کاهش داد و pH را افزایش داد. بنابراین، این مطالعه به منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مصرف‌کننده لاکتات از شکمبه گاوهای شیری و بررسی پتانسیل آنها در کنترل اسیدوز در شرایط آزمایشگاهی انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی

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

شرایط اسیدوز لاکتیکی، از جیره‌ای شامل ۹۰ درصد گلوکز و ۱۰ درصد کاه جو استفاده شد. مایع شکمبه از طریق فیستولا از سه رأس قوچ مهربان جمع‌آوری گردید و پس صاف کردن با چهارلایه پارچه متقال، تحت گاز CO₂ قرار داده شد. مقدار یک گرم خوراک و ۱۰ میلی لیتر مایع شکمبه درون ویال‌های شیشه‌ای قرار داده شد و از هر جدایه دو دوز ۵/۰ و ۱ میلی لیتر به هر کدام تلقیح شد. یک تیمار آنتی‌بیوتیک ویرجینامایسین نیز در نظر گرفته شد. ویال‌ها به مدت ۶ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند. تولید گاز و pH هر نمونه اندازه‌گیری شد. غلظت اسیدلاکتیک نمونه‌ها با استفاده از رنگ سنجی و طبق روش فیگن‌اسچو و ماریس (۴) مورد اندازه‌گیری قرار گرفت.

بررسی آماری

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

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

آزمایش‌های بیوشیمیایی

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

بررسی پتانسیل مهار اسیدوز؛ پتانسیل جدایه‌ها در جلوگیری از کاهش pH و مهار اسیدوز، در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. به منظور ایجاد

جدول ۱- ویژگی‌های فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

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

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

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

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

- اعداد با حروف متفاوت در یک سطر، اختلاف معنی دار دارند ($p < 0.0001$).

نتایج و بحث

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

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

نتایج حاصل از تست مهار اسیدوز در جدول ۲ ارائه شده است. از لحاظ pH، تیمار ویرجینامایسن بالاترین مقدار و تیمار شاهد کمترین مقدار را نشان داد ($p < 0.0001$). pH تیمارهای حاوی یک میلی لیتر از جدایه های R1 و R3 به طور معنی داری از تیمار شاهد

بالاتر بود. کمترین تولید گاز مربوط به تیمار ویرجینامایسن بود و سطح یک میلی لیتر تمام جدایه ها تولید گاز را نسبت به تیمار شاهد افزایش دادند ($p > 0.0001$)، بیشترین مقدار اسید لاکتیک را تیمار شاهد نشان داد و تمام جدایه ها نسبت به تیمار شاهد ویرجینامایسن اسید لاکتیک کمتری داشتند ($p > 0.0001$). کمترین میزان اسید لاکتیک نیز در سطح یک میلی لیتر جدایه R3 مشاهده شد.

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

4. Figenschou, D.L., Maris, J.P. (1991). Spectrophotometric method for the determination of microquantities of lactic acid in biological material. *Journal of Analytical Biochemistry* **195**: 308-312
5. Harley, J.P., Prescott, L.M. (2002). *Laboratory exercises in microbiology*. 5rd edition.
6. Henning, P.H., Horn, C.H., Steyn, D.G., Meissner, H.H., Hagg, F.M., (2010). The potential of *Megasphaera elsdenii* isolates to control ruminal acidosis. *Animal Feed Science and Technology* **157**: 13-9.
7. Krause, K. M., Oetzel, G.R. (2006). Understanding and preventing sub acuteruminal acidosis in dairy herds: A review. *Animal Feed Science and Technology* **126**: 215-36.
8. Kung, L., Hession, A.O. (1995). Preventing in vitro lactate accumulation in ruminal fermentations by inoculation with *Megasphaera elsdenii*. *Journal of Animal Science* **73**: 250-6.
9. Long, M., Feng, W.J., Li, P., Zhang, Y., He, R.X., Yu, L.H., He, J.B., Jing, W.Y., Li, Y.M., Wang, Z., Liu, G.W. (2014). Effects of the acid-tolerant engineered bacterial strain *Megasphaera elsdenii* H6F32 on ruminal pH and the lactic acid concentration of simulated rumen acidosis in vitro. *Research in Veterinary Science* **96**: 28-9.
10. MacFaddin, J.F. (2000). *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp: 363-7.
11. Mackie, R.I., Heath, S. (1979). Enumeration and isolation of lactate-utilizing bacteria from the rumen of sheep. *Applied and Environmental Microbiology* **38**: 416-21.
12. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V. and Clark, D.P. (2009). *Brock Biology of Microorganisms*. 12th edition. Pearson Education International, New York 4-25.
13. McDaniel, M.R., Higgins, J.J., Heidenreich, J.M., Shelor, M.K., Parsons, G.L., Henning, P.H., Drouillard J.S. (2009). Effects of *Megasphaera elsdenii* on ruminal pH, ruminal concentrations of organic acids, and bacterial genomes following a grain challenge. *Beef Cattle Research* 62-69.

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

نتیجه گیری

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

منابع

1. Aikman, P.C., Henning, P.H., Humphries, D.J., Horn, C.H. (2011). Rumen pH and fermentation characteristics in dairy cows supplemented with *Megasphaera elsdenii* NCIMB 41125 in early lactation. *Journal of Dairy Science* **94**: 2840-9.
2. Atwood, G., Li, D., Pacheco, D., Tavendale, M. (2006). Production of indolic compounds by rumen bacteria isolated from grazing ruminants. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1261-71.
3. Counotte, G.H.M., Prins, R.A., Janssen, R.H.A.M., Debie, M.J.A. (1981). Role of *Megasphaera elsdenii* in the fermentation of DL-[2-³C] lactate in the rumen of dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **42**: 649-55.

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

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

Sedighi Vesagh, R.¹, Alipour, D.^{2}*

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

Received Date: 25 October 2015

Accepted Date: 1 June 2016

Abstract

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

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

**Corresponding author: Alipour, D.*

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