



اثر افزودنی باکتریایی تولید کننده اسید لاکتیک ناهمگن بر ترکیبات شیمیایی و خصوصیات تخمیری مخلوط یونجه پلاسیده شده به همراه تفاله پرتقال

مجتبی کریمی^۱، مقصود بشارتی^{۲*}، اکبر تقی زاده^۳، رشید صفری^۲

۱- دانش آموخته کارشناسی تغذیه دام، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
۲- استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر، دانشگاه تبریز
۳- استاد گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۵/۶/۱۲ - تاریخ پذیرش: ۹۶/۱/۲۵)

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثرات افزودنی باکتریایی لالسیل (لاکتوباسیلوس بوچنری ۴۰۷۸۸) بر خصوصیات شیمیایی و پایداری هوازی سیلاژ یونجه پلاسیده شده و خرد شده با اندازه متوسط ۲ سانتی متر به همراه تفاله پرتقال، انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) علوفه یونجه پلاسیده (تیمار شاهد)، (۲) علوفه یونجه پلاسیده به همراه تفاله پرتقال (با نسبت ۷۰ به ۳۰) بدون افزودنی باکتریایی، (۳) تیمار ۲ به همراه $1/5 \times 10^8$ cfu/g افزودنی لالسیل، (۴) تیمار ۲ به همراه 3×10^8 cfu/g افزودنی لالسیل، (۵) تیمار ۲ به همراه $4/5 \times 10^8$ cfu/g افزودنی لالسیل بودند و به مدت ۹۰ روز در دمای اتاق سیلو شد. داده‌های بدست آمده در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی آنالیز گردید. pH تمام نمونه‌ها کمتر از ۴/۵۵ بود اما شاهد در مقایسه با سایر تیمارها بالاتر بود ($P < 0/05$). افزودن تفاله پرتقال و مکمل باکتریایی به یونجه پلاسیده سبب افزایش معنی دار کربوهیدرات محلول در آب (WSC) و کل اسیدهای چرب فرار tVFA شد ($P < 0/05$). کمترین مقاومت در برابر فساد پذیری مربوط به تیمار ۱ و بیشترین مقدار مربوط به تیمار ۵ بود (به ترتیب ۵۶ ساعت و ۲۰۰ ساعت پس از قرار گرفتن در مجاورت هوا). بطور کلی افزودنی باکتریایی لاکتوباسیلوس بوچنری به همراه تفاله پرتقال با در دسترس قرار دادن کربوهیدرات قابل تخمیر برای لاکتوباسیلها و کاهش سریع pH و محدود نمودن تکثیر مخمرها و قارچها سبب افزایش پایداری هوازی و بهبود کیفیت سیلوی حاصله گردید.

واژه‌های کلیدی: پایداری هوازی، تفاله پرتقال، سیلاژ یونجه، لاکتوباسیلوس بوچنری

مقدمه

بهبود شرایط شکمبه و تولید در واحدهای دامپروری به بهبود شرایط هضم الیاف وابسته است (Hashemzadeh *et al.*, 2011). یونجه در حالت خشک نسبت به حالت سیلو شده بیشتر مصرف می‌شود به طوری که در برخی موارد، بیش از نیمی از بخش خشبی جیره را شامل می‌گردد (Hashemzadeh *et al.*, 2011; Soltani *et al.*, 2009; Kowsar *et al.*, 2008). ولی تولید سیلاژ یونجه در سال‌های اخیر بیشتر توجه دامداران را به خود جلب نموده است که دلیل آن به عوامل زیر باز می‌گردد: ۱- کاهش از دست دادن برگ و مواد غذایی در مزرعه پس از برداشت نسبت به روش خشک کردن یونجه، ۲- تأخیر کمتر در زمان انبار نمودن به دلیل آب و هوای نامطلوب و ۳- همچنین، سیلاژ در دامداری‌های صنعتی خود را بهتر با شرایط مکانیزاسیون وفق داده است (Curtis, 1996). از حدود ۳۰ تا ۴۰ سال پیش افزودن منابع کربوهیدراتی و افزودنی باکتریایی برای بهبود کیفیت سیلاژ مورد بررسی قرار گرفته است. تفاله مرکبات، تفاله گوجه‌فرنگی، تفاله سیب، تفاله چغندر قند و بقایای حاصل از پوست‌گیری پسته از جمله فرآورده‌های فرعی بخش صنایع تبدیلی و کشاورزی است که به عنوان منبع بالقوه‌ای جهت تغذیه دام معرفی می‌شوند. این مواد بسته به فصل تولید میوه در کارخانجات مربوطه تولید شده و عمدتاً بدون استفاده دور ریخته می‌شوند که موجب آلودگی محیط زیست می‌گردند (سید مومن، ۱۳۸۲).

قرار گرفتن سیلاژ در معرض هوا در زمان خوراک‌دهی سبب فساد سیلاژ می‌گردد. مخمرهایی که قادر به متابولیزه کردن اسید لاکتیک هستند اولین عامل بروز فساد محسوب می‌شوند که سبب افزایش pH می‌شوند (Kleinschmit and Kung, 2006) که این تغییرات نیز محرکی جهت رشد سایر میکروارگانیسم‌های مضر در سیلاژ است (Kleinschmit and Kung, 2006; Woolford, 1990) که در نهایت سبب کاهش تولید دام به دلیل کاهش ارزش مواد غذایی یا بروز مسمومیت می‌گردد. گزارش شده است که استفاده از لاکتوباسیلوس بوچنری سبب بهبود پایداری هوازای سیلاژ می‌گردد (Kleinschmit and Kung, 2006). از آن زمان تا کنون تحقیقات بسیاری توسط بسیاری از محققین بر روی این میکروارگانیسم صورت گرفته که اثبات گردیده است که

لاکتوباسیلوس بوچنری از طریق تبدیل غیرهوازی اسید لاکتیک به اسید استیک سبب افزایش مقاومت سیلاژ نسبت به فساد هوازای می‌گردد (Oude Elferink *et al.*, 2001).

در طول سال مقدار زیادی از محصولات فرعی کارخانجات آمیوه‌گیری در دسترس می‌باشد و اگر این محصولات به درستی از محیط دفع نشود در دراز مدت به یک مشکل زیست محیطی تبدیل می‌شود. سیلاژ یونجه به دلیل ظرفیت بافوری بالا و کربوهیدرات سریع التخمیر کم، کیفیت پایینی دارد (Guler, 2001) و از آنجایی که تفاله پرتقال غنی از کربوهیدرات‌های سهل الهضم است می‌توان در موقع ذخیره سازی به علوفه یونجه اضافه شود و تخمیر را بهبود بخشد در نتیجه کیفیت سیلو افزایش می‌یابد. هدف از این آزمایش بررسی اثرات افزودنی تجاری لالسیل (لاکتوباسیلوس بوچنری) در ۳ سطح مختلف 1.0×10^8 ، 1.5×10^8 و 3×10^8 بر روی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی مخلوط سیلاژ یونجه پلاسیده شده و تفاله پرتقال در مقیاس آزمایشگاهی بود.

مواد و روش‌ها

سیلوهای آزمایشی در مهر ماه سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی اهر دانشگاه تبریز پر شدند. این منطقه در عرض جغرافیایی ۳۹ درجه و ۵ دقیقه شمالی و طول جغرافیایی ۴۷ درجه و ۳۳ دقیقه شرقی قرار گرفته است. ارتفاع آن از سطح دریا ۱۳۴۱ متر بوده و میزان بارندگی سالانه ۲۵۰ الی ۴۰۰ میلی‌متر است و دارای اقلیم سرد و کوهستانی می‌باشد. علوفه یونجه چین چهارم در مرحله قبل از گلدهی برداشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق پلاسیده شد و همراه با تفاله پرتقال به صورت دستی به اندازه‌های تئوریک ۲/۵ سانتی متری خرد گردید. تفاله پرتقال از کارخانجات آمیوه‌گیری تهیه گردید و شامل پوست و بخش‌هایی از پالپ بود. مقدار ۱۷۵۰ گرم از علوفه یونجه پلاسیده شده با ۷۵۰ گرم از تفاله پرتقال مخلوط شده و پس از افزودن سطوح ۰، 1.0×10^8 cfu/g و 3×10^8 cfu/g و 4.5×10^8 cfu/g از افزودنی لالسیل (حاوی 3×10^8 لاکتوباسیلوس بوچنری MT40788) به مدت ۹۰ روز سیلو گردید. آب مقطر که برای حل نمودن افزودنی‌های باکتریایی استفاده شد نیز به تیمار شاهد که ۲/۵ کیلوگرم

آب مقطر قرار گرفت و ۲ دقیقه تکان داده شد. بعد به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. سپس مایع بالایی آن برداشته و به نسبت ۱ به ۱۰ رقیق گردید و یک میلی‌لیتر از مایع رقیق شده در یک لوله آزمایش ریخته و یک میلی‌لیتر آب مقطر، ۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک خالص و ۰/۱۵ میلی‌لیتر فنل ۸۰ درصد وزنی به آن اضافه گردید. پس از سرد شدن، نمونه‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شدند. برای تهیه استاندارد، از گلوکز استفاده شد.

میزان پایداری هوازی با استفاده از روش Adesogan (2004) *et al.* با اندکی تغییرات انجام گرفت. این روش میزان ۲۰۰ گرم از هر تکرار را درون ظروف یکبار مصرف بدون درب ریخته و یک دما سنج در مرکز هر توده سیلویی و ۲ دماسنج در ۲ نقطه مختلف اتاق (دمای محیط ۱۲ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. زمانی که دمای توده سیلویی به ۲ درجه بالاتر از دمای محیط رسید، سیلاژ فاسد در نظر گرفته شد. به منظور اندازه‌گیری اسیدهای چرب فرار کل در سیلو از روش Markham (1942) استفاده شد.

داده‌های بدست آمده از این آزمایش توسط نرم افزار SAS (۲۰۰۲) با رویه ANOVA، در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفتند. مدل آماری طرح به صورت زیر بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = مقدار هر مشاهده، μ = میانگین کل، T_i = اثر تیمار، e_{ij} = خطای آزمایش است. برای مقایسه میانگین‌ها از رویه دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث‌ها

خصوصیات و ترکیبات شیمیایی یونجه و تفاله پرتقال قبل از سیلو کردن: خصوصیات و ترکیبات شیمیایی یونجه پلاسیده شده و تفاله مرکبات قبل از سیلو کردن در جدول ۱ ذکر گردیده است.

علوفه یونجه پلاسیده شده بود نیز قبل از سیلو کردن اضافه گردید. سیلوهای آزمایشگاهی مورد استفاده از جنس لوله‌های UPVC با ارتفاع ۹۰ سانتیمتر و به قطر ۱۰ سانتیمتر با گنجایش ۲/۵ کیلوگرمی که در قسمت پایین سیلوها به منظور خروج پساب، یک شیر تعبیه شده بود استفاده گردید و پس از پر شدن سیلو به صورت دستی فشرده شدند سپس درب سیلوها محکم بسته شد و بدین نحو از نفوذ هوا به داخل سیلو جلوگیری شد و در دمای اتاق نگهداری شدند. در پایان ۹۰ روز، سیلوها باز و بلافاصله pH، ماده خشک، و کربوهیدرات محلول نمونه‌ها اندازه‌گیری شده و باقی‌مانده نمونه‌ها برای اندازه‌گیری Ash، ADF، NDF، CP در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای ۷۲ ساعت خشک و جهت استفاده در مراحل بعدی نگهداری شد (Filya, 2003). برای اندازه‌گیری خاکستر خام نمونه‌ها با استفاده از آسیاب با توری یک میلی‌متری آسیاب شدند. نمونه‌های آسیاب شده در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت قرار گرفتند. NDF و ADF طبق روش Van Soest *et al.* (1991) بدون استفاده از آنزیم آمیلاز و سدیم سولفات اندازه‌گیری شدند. پروتئین خام با روش ذکر شده در AOAC سال ۲۰۰۲ تعیین گردید.

جهت استخراج عصاره سیلاژ مقدار ۲۰ گرم نمونه تر در داخل مخلوط‌کن ریخته و به میزان ۱۸۰ سی‌سی آب مقطر به آن اضافه شد. مخلوط آب و سیلاژ به مدت ۳۰ ثانیه مخلوط شدند. مخلوط ایجاد شده از دو لایه صافی، عبور داده شد. عصاره صاف شده برای تعیین میزان کل اسیدهای چرب فرار مورد استفاده قرار گرفت. مقدار یک میلی‌لیتر اسید متافسفریک ۲۵ درصد (حجم / وزن) به ۵ میلی‌لیتر عصاره صاف شده جهت تعیین اسیدهای چرب فرار اضافه شد. نمونه‌های آماده شده، ابتدا روی یخ و سپس به همراه یک نمونه بدون اضافه شدن مواد به عنوان پشتیبانی، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در سردخانه دانشکده نگهداری شدند. قبل از تجزیه شیمیایی، نمونه‌ها طی یک شبانه روز در دمای محیط جهت ذوب شدن یخ‌ها قرار گرفتند.

برای اندازه‌گیری کربوهیدرات‌های محلول در آب از روش فنل سولفوریک استفاده شد (Dubois *et al.*, 1956). به این منظور، ۱۰ گرم از سیلوی تازه در ۹۰ میلی‌لیتر

نیز نتایجی مشابه را گزارش نموده‌اند (Nishino *et al.*, 2008; Whiter and Kung, 2001; Curtis, 1996; Ely, 1981). برخی نیز نتایجی عکس این نتایج را گزارش نموده‌اند (Filya, 2003; Yanbing and Nishino, 2011; Schmidt *et al.*, 2009). به طور کلی می‌توان دلیل کاهش pH را نسبت به تیمار شاهد مربوط به بالا بودن کربوهیدرات محلول در سایر تیمارها و در دسترس قرار گرفتن ماده مغذی بیشتر جهت غالبیت جمعیت باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک و تولید اسید لاکتیک دانست.

مقدار ماده خشک تحت تأثیر افزودنی باکتریایی و یا تفاله مرکبات قرار نگرفت ($P < 0.05$) (جدول ۲). سایر بررسی‌ها نیز نتایجی مشابه با نتایج این تحقیق را گزارش کردند (Hashemzadeh *et al.*, 2014; Driehuis *et al.*, 2001; Filya, 2003; Filya *et al.*, 2007; Kung *et al.*, 2003).

افزودن تفاله پرتقال به علوفه یونجه پلاسیده سبب کاهش در میزان پروتئین خام نسبت به تیمار شاهد گردید ($P < 0.05$) که دلیل این امر احتمالاً پروتئین خام پایین در تفاله پرتقال می‌باشد (جدول ۲). افزودنی باکتریایی در سطح پایین تغییری در میزان پروتئین خام نسبت به LB0 ایجاد نکرد اما در ۲ سطح بالاتر خود سبب کاهش پروتئین خام نسبت به تیمار LB0 گردید ($P < 0.05$). نتایج این آزمایش با سایر مطالعات که افزودنی باکتریایی را بی تأثیر بر میزان پروتئین خام گزارش نمودند مطابقت داشت (Kung and Ranjit, 2001; Francisco *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2009).

افزودن تفاله پرتقال به سیلاژ یونجه موجب افزایش قابل توجه میزان کربوهیدرات محلول نسبت به تیمار شاهد گردید ($P < 0.05$). همچنین استفاده از افزودنی باکتریایی سبب کاهش میزان کربوهیدرات محلول نسبت به تیمار یونجه پلاسیده و تفاله پرتقال بدون افزودنی گردید ($P < 0.05$) (جدول ۲). در آزمایشی نیز افزودن تفاله مرکبات به سیلوی علوفه ماراندو سبب افزایش عددی در میزان کربوهیدرات محلول گردید که این افزایش عددی غیر معنی‌دار بود اما این غیر معنی‌داری توسط افزایش محتویات قندی در سیلاژ جهت تخمیر میکروبی مربوط گردید (Thiago *et al.*, 2005) و احتمالاً دلیل آن مربوط به این است که میزان استفاده از تفاله

جدول ۱. خصوصیات و ترکیبات شیمیایی یونجه و تفاله پرتقال قبل از سیلو کردن.

Table 1. Chemical composition of wilted alfalfa and orange pulp before ensiling.

Item	Wilted alfalfa	Orange pulp
Chemical composition		
DM	35	25
pH	6.34	5.08
NDF (% of DM)	30.9	24.5
ADF (% of DM)	29.91	22.8
WSC (% of DM)	3.8	5.2
CP (% of DM)	18.02	6.12

DM: dry matter, NDF: neutral detergent fibre, ADF: acid detergent fibre, WSC: water soluble carbohydrate, CP: crude protein.

اثر تفاله پرتقال و افزودنی باکتریایی بر ارزش تغذیه‌ای سیلاژ یونجه پلاسیده شده: اثر تفاله پرتقال و افزودنی باکتریایی بر ارزش تغذیه‌ای سیلاژ یونجه پلاسیده شده در جدول ۲ آورده شده است. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن یک منبع کربوهیدراتی مانند تفاله پرتقال به سیلاژ یونجه سبب کاهش pH سیلاژ نسبت به تیمار شاهد گردید ($P < 0.05$). نتایج با آزمایشاتی که اثر منابع مختلف کربوهیدراتی را بر سیلاژ علوفه‌های متفاوت بررسی نمودند مطابقت داشت (اسدی و همکاران، ۱۳۸۳؛ Hashemzadeh *et al.*, 2011; Touqir *et al.*, 2007). داده‌های این آزمایش با داده‌های آزمایشی که تفاله مرکبات را به همراه علوفه چاودار و یولاف استفاده نمودند نیز مطابقت داشت (Miller *et al.*, 1959). سایر محققین افت pH در سیلاژ تفاله مرکبات نسبت به ابتدای دوره گزارش نمودند (Volanis *et al.*, 2004).

افزودنی باکتریایی نیز سبب کاهش معنی‌دار pH نسبت به تیمار شاهد گردید ($P < 0.05$). این روند کاهشی در میزان pH با افزایش میزان استفاده از افزودنی از لحاظ عددی افزایش یافت لیکن اختلاف معنی‌داری میان ۴ سطح مختلف آزمایش مشاهده نگردید. در آزمایشی افزودنی باکتریایی لالسیل سبب کاهش pH و افزودنی اکوسایل اختلاف معنی‌داری در سطح pH نسبت به تیمار شاهد ایجاد نکرد (Hashemzadeh *et al.*, 2011). در اثر اضافه نمودن ال-بوجنری بر سیلوی جو پس از یک دوره ۶۹ روزه کاهش pH را در تیمارهای آزمایشی گزارش نمودند (Kung *et al.*, 2001) سایر تحقیقات صورت گرفته

کاهش در میزان کربوهیدرات محلول را در سطح بالاتر افزودنی ال-بوچنری تا نصف تیمار شاهد گزارش نمود اما در سطح پایین تر ال-بوچنری و هر دو سطح ال-پلانتروم تغییرات معنی داری مشاهده نشد (Ranjit and Kung, 2000). در آزمایشی دیگر اثر ۱۴ نوع افزودنی مختلف باکتریایی شامل دو گونه از ال-بوچنری را بر روی سیلاژ یونجه چین اول و چین دوم مورد بررسی قرار گرفت، که میزان کربوهیدرات چین اول در تمامی افزودنی‌ها نسبت به تیمار شاهد کاهش یافت و در یونجه چین دوم هر دو گونه ال-بوچنری به همراه ۶ نوع افزودنی دیگر کاهش و ۶ افزودنی دیگر افزایش در میزان کربوهیدرات محلول را نسبت به تیمار شاهد نشان دادند (Filya et al., 2007). نتایج این آزمایش با نتایج بسیاری از آزمایشات دیگر که اثرات افزودنی ال-بوچنری را بر روی سیلاژ علوفه‌های متفاوت مورد بررسی قرار دادند مطابقت داشت (McAllister et al., 1998; Kung and Ranjit, 2001; Kleinschmit et al., 2006; Kung et al., 2003). این کاهش در میزان کربوهیدرات محلول را می‌توان توسط افزایش فعالیت باکتریایی و تخمیری توسط باکتری‌ها در جهت تولید اسیدهای آلی تفسیر نمود.

مرکبات در این آزمایش بسیار پایین تر از آزمایش ما بوده است. نتایج این آزمایش با آزمایش دیگری که تفاله مرکبات را به همراه علوفه های تانزانیا به مدت ۶۰ روز سیلو کرده بود نیز مطابقت داشت (Silva et al., 1997). اضافه نمودن ۱۲۰ گرم در کیلوگرم ماده خشک از تفاله مرکبات به علوفه سبب افزایش ۳ درصدی میزان کربوهیدرات محلول می‌گردد (Silva et al., 1997). در دو آزمایش متفاوت نیز استفاده از یک منبع کربوهیدراتی مانند ملاس سبب افزایش میزان کربوهیدرات محلول نسبت به تیمار شاهد گردید (اسدی و همکاران، ۱۳۸۳؛ Hashemzadeh et al., 2014). در تحقیقی دیگر اثر ال-بوچنری را به تنهایی و به همراه باکتری‌های تخمیر کننده همگن در سطوح متفاوت در یک دوره ۹۰ روزه سیلویی بر روی علوفه چاودار چندساله، کاهش در میزان کربوهیدرات محلول در تیمار ال-بوچنری نسبت به تیمار شاهد را گزارش گردیده است (Driehuis et al., 2001). نتایج این آزمایش با آزمایش (Filya 2003) که تأثیر ال-بوچنری، ال-پلانتروم و مخلوطی از ۲ باکتری را بر روی سه علوفه ذرت، سورگوم و گندم را در یک دوره ۶۰ روزه سیلویی مورد بررسی قرارداد نیز مطابقت داشت. آزمایشی دیگر که تأثیر ال-بوچنری و ال-پلانتروم را در دو سطح مختلف بر روی سیلوی ذرت مورد بررسی قرار داد نیز

جدول ۲. خصوصیات شیمیایی سیلاژ یونجه پلاسیده شده و تفاله پرتقال بعد از ۹۰ روز (بر اساس ماده خشک).

Table 2. The chemical composition of wilted alfalfa and orange pulp silage after 90 d (% DM basis)

Item	Silage treatment ¹					SEM
	CON	LB0	LB1	LB2	LB3	
DM	33.03	30.20	33.93	30.93	31.03	0.923
pH	4.50 ^a	4.34 ^b	4.33 ^b	4.26 ^b	4.24 ^b	0.043
WSC	1.33 ^c	1.99 ^a	1.26 ^d	1.40 ^b	1.40 ^b	0.009
TVFA	13.66 ^c	18.00 ^b	18.33 ^b	21.66 ^a	22.33 ^a	0.394
NDF	29.56	31.36	31.03	29.83	30.03	0.658
ADF	20.96 ^b	23.23 ^a	19.46 ^{bc}	20.13 ^b	20.46 ^b	0.327
CP	17.75 ^a	16.87 ^b	17.06 ^b	16.31 ^c	16.18 ^c	0.95

¹Treatment: wilted alfalfa with no additive (as control treatment), wilted alfalfa (1750g) mixed with fresh orange pulp (750g) and treated with LAB for final application rate of 0, 2.5, 5 and 7.5 g LAB inoculant/ton (LAB 0, LAB 1, LAB 2 and LAB 3 respectively).

Means within a row followed by different letters differ significantly ($P < 0.05$).

۱۴ نوع افزودنی مختلف باکتریایی بر روی علوفه یونجه چین اول، در ۶ افزودنی افزایش در NDF، ۵ افزودنی بدون تغییر و ۳ افزودنی کاهش در میزان NDF را گزارش نمود (Filya et al., 2007). در مرحله دوم همین آزمایش بر روی علوفه یونجه چین دوم ۱۰ افزودنی کاهش، ۲ افزودنی افزایش و ۲ افزودنی دیگر بدون تغییر نسبت به تیمار شاهد گزارش گردید (Filya et al., 2007).

تغاله پرتقال در تیمار ۲ سبب افزایش معنی‌دار ADF نسبت به تیمار شاهد گردید ($P < 0.05$). افزودنی باکتریایی در هر ۳ سطح مصرفی سبب کاهش میزان ADF نسبت به تیمار ۲ گردید که این کاهش معنی‌دار بود ($P < 0.05$ ، جدول ۲). در بررسی اثر افزودنی ال-بوچنری بر سیلوی ذرت، ال-بوچنری در سطح پایین مصرفی سبب کاهش ADF گردید (Ranjit and Kung, 2000). در مطالعه صورت گرفته دیگر از همین محققین افزودنی ال-بوچنری در هر ۳ سطح مصرفی سبب کاهش عددی ADF در سیلوی ۱۰۰ روزه جو گردید که سطح پایین مصرفی ال-بوچنری در سطح ۰.۰۵ معنی‌دار بود (Kung and Ranjit, 2001). سایر مطالعات نیز کاهش در میزان ADF را در اثر استفاده از افزودنی باکتریایی گزارش نمودند (Hashemzadeh et al., 2014; Adesogan et al., 2004; Kizilsimsek et al., 2007).

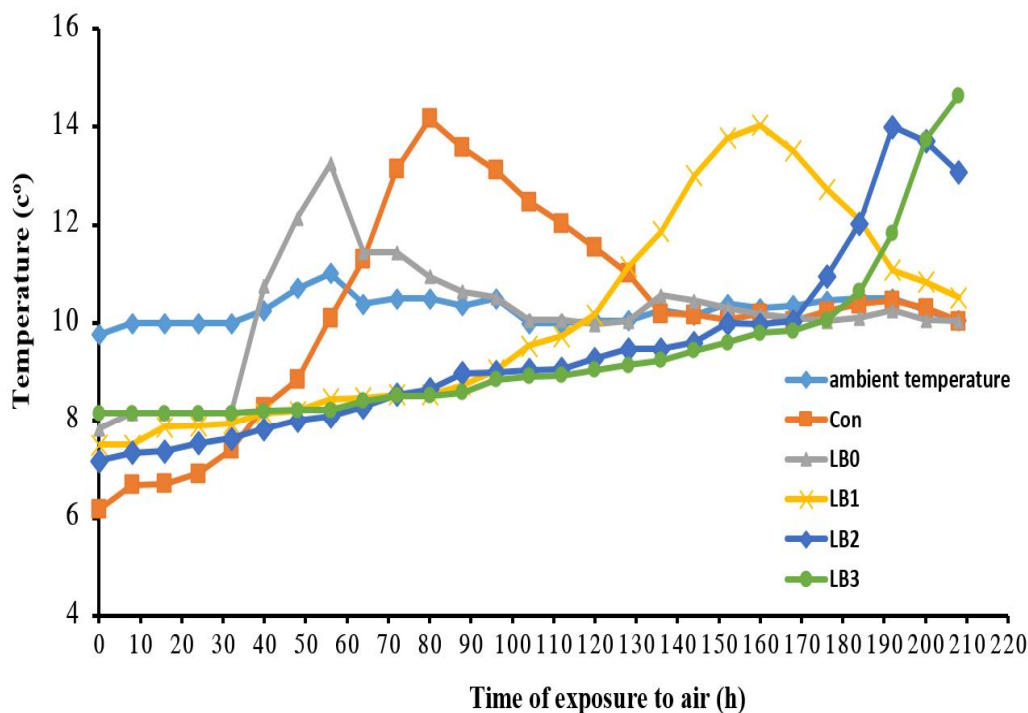
اثر تغاله پرتقال و افزودنی باکتریایی بر پایداری هوازی سیلاژ یونجه پلاسیده شده: افزودن تغاله پرتقال به سیلوی یونجه سبب کاهش پایداری هوازی نسبت به تیمار شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی گردید (شکل ۱). می‌توان بالا بودن میزان کربوهیدرات محلول و احتمالاً اسید لاکتیک و نبود اسیدهای چرب فرار را به عنوان دلایل اصلی در تسریع وقوع فساد هوازی سیلاژ نام برد (Adesogan et al., 2004)، در این تیمار یکی از دلایل فساد هوازی را می‌توان مربوط به پایین بودن ماده خشک دانست. میزان پایداری هوازی در ۳ تیماری که از افزودنی باکتریایی ال-بوچنری در آن‌ها استفاده گردید نسبت به تیمار شاهد و تیمار LB0 افزایش یافت که این میزان افزایش در پایداری هوازی به ترتیب در LB1، LB2 و LB3 با افزایش دز مصرف ال-بوچنری روند صعودی داشت (۲۰۰، ۱۹۲، ۱۴۴ ساعت). در یک مقاله مروری به این نکته اشاره شد که در

کل اسیدهای چرب فرار در تیمار یونجه پلاسیده به همراه تغاله پرتقال بدون افزودنی باکتریایی نسبت به تیمار شاهد افزایش یافت ($P < 0.05$) (جدول ۲). افزودن ملاس به علوفه یونجه در آزمایش دیگری سبب افزایش در میزان کل اسیدهای چرب فرار گردید (Hashemzadeh et al., 2011). افزایش در میزان کل اسیدهای چرب فرار در تحقیقات سایر محققین که اثر منابع مختلف کربوهیدراتی را بر روی سیلاژ علوفه‌های متفاوت بررسی کردند نیز گزارش گردیده است (اسدی و همکاران، ۱۳۸۳؛ Aksu et al., 2006; Khan et al., 2006; Chase, 1988; Islam et al., 2001; Woolford, 1990). افزودنی باکتریایی در سطح پایین‌تر از توصیه کارخانه نتوانست سبب ایجاد تغییرات معنی‌داری نسبت به تیمار دوم گردد ولی در دو سطح دیگر استفاده شده از افزودنی باکتریایی، میزان کل اسیدهای چرب فرار نسبت به سایر تیمارها افزایش یافت. نتایج این آزمایش با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (McAllister et al., 1998; Kleinschmit et al., 2006; Dawson et al., 1999; Baytok et al., 2005). آزمایش با ۱۴ نوع افزودنی باکتریایی بر روی علوفه یونجه چین اول، تمامی افزودنی‌ها سبب افزایش اسیدهای چرب فرار گردید (Filya et al., 2007). این افزایش در میزان کل اسیدهای چرب فرار را می‌توان با جمعیت بالای باکتری‌های اسید لاکتیکی و در دسترس بودن منبع کربوهیدراتی جهت تولید اسید لاکتیک و اسید استیک در تیمارهای آزمایشی نسبت به تیمار شاهد مربوط دانست.

افزودن تغاله پرتقال به علوفه یونجه پلاسیده موجب افزایش عددی کوچکی در میزان الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) گردید که این مقدار از نظر آماری معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) (جدول ۲). این افزایش اندک در میزان NDF را می‌توان در نتیجه تولید اسید استیک بیشتر به دلیل وجود کربوهیدرات محلول بالاتر در این تیمار دانست. زیرا در تولید هر مولکول اسید استیک، ماده خشک به شکل یک مولکول دی‌اکسید کربن از دست می‌رود و باعث افزایش نسبت NDF می‌گردد (ماده خشک تیمار ۲ پایین‌تر است). افزودنی باکتریایی در هر ۳ سطح تغییری در میزان NDF نسبت به تیمار شاهد ایجاد نکرد. بسیاری از تحقیقات نیز نتایجی مشابه با نتایج آزمایش فعلی را گزارش کردند (Hashemzadeh et al., 2014; Ranjit and Kung, 2000; Kung and Ranjit, 2001; Kizilsimsek et al., 2007; Ely 1981; Gordon et al.,

سبب بهبود پایداری هوازی گردید و این پاسخ مثبت ال-بوچنری به پایداری هوازی با افزایش دز مصرف، تا ۴۸۰ ساعت پس از قرارگیری سیلاژ گراس‌ها در مجاورت هوا ادامه یافت (Driehuis *et al.*, 2001). در آزمایش دیگری نیز اثر ال-بوچنری به تنهایی و در ترکیب با ال-پلانتروم بر روی علوفه گندم، سورگوم و ذرت مورد بررسی قرار گرفت که در تمامی تیمارها بهبود پایداری هوازی گزارش گردید (Filya, 2003). نتایج این آزمایش با نتایج سایر محققین مطابقت داشت (Driehuis *et al.*, 2001; Weinberg *et al.*, 1995). به طور کلی تأثیر ال-بوچنری را بر بهبود پایداری هوازی می‌توان توسط افزایش اسید استیک تولیدی توسط باکتری‌ها و همچنین کاهش میزان کربوهیدرات محلول باقی‌مانده و اسید لاکتیک و تجمع پایین‌تر نیتروژن آمونیاکی تفسیر نمود.

مطالعات انجام شده بر روی سیلاژ علوفه‌های متفاوت با استفاده از افزودنی‌های متفاوت باکتریایی مختلف ما بین سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۵، ۳۰ درصد از مقالات بهبود در پایداری هوازی را گزارش نمودند و سایر مقالات یا افزودنی باکتریایی تأثیری بر روی پایداری هوازی نداشتند و یا حتی سبب کاهش آن گردیده است (Muck and Kung, 1997). نتایج این آزمایش با نتایج آزمایشی که افزودنی ال-بوچنری را در ۲ سطح مختلف بر روی سیلاژ ذرت مورد بررسی قرار داده بود کاملاً مطابقت داشت (Ranjit and Kung, 2000). طی سه آزمایش متفاوت که افزودنی ال-بوچنری را به تنهایی و همراه با ال-پلانتروم بر روی علوفه گراس در بازه‌های ۹۰ و ۱۸۰ روزه مورد بررسی قرار داده شده بود، در تمامی آزمایشات ال-بوچنری هم به تنهایی و هم در ترکیب با ال-پلانتروم



شکل ۱. اثر تفاله پرتقال و افزودنی باکتریایی بر پایداری هوازی سیلاژ یونجه

Figure 1. Effects of Orange pulp and Bacterial additives on aerobic stability of Alfalfa silage.

نتیجه گیری

همان گونه که انتظار می‌رفت با بالا رفتن سطح مصرفی سبب افزایش پایداری هوازی سیلاژ نهایی گردید. با توجه به نتایج ذکر شده به طور کلی می‌توان این گونه نتیجه گیری نمود که استفاده از یک منبع کربوهیدراتی به عنوان منبعی قابل استفاده برای جمعیت باکتریایی مفید و یا افزودنی‌های باکتریایی در تهیه سیلاژ با کیفیت از یونجه، به دلیل کمبودهای این گیاه ارزشمند ضروری است.

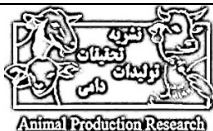
افزودن تفاله پرتقال به علوفه یونجه پلاسیده شده منجر به کاهش pH نهایی سیلاژ و افزایش کربوهیدرات محلول، کل اسیدهای چرب فرار، الیاف نامحلول در شوینده اسیدی و در طرف مقابل سبب کاهش پایداری هوازی و پروتئین خام نسبت به تیمار شاهد گردید. افزودنی باکتریایی نیز سبب بهبود پارامترهای تخمیری و افزایش کیفیت کلی سیلاژ گردید. افزودنی باکتریایی

منابع

- اسدی الموتی ع.، علیخانی م.، قربانی غ.ر.، و سمیع ع. ح. ۱۳۸۳. اثر افزودنی های مختلف بر کیفیت تخمیر سیلوی ارزن در شرایط آزمایشگاهی. مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، ۳: ۱۴۹-۱۶۱.
- سید مومن، س. م. ۱۳۸۲. مطالعه اثرات سطوح بقایای پوست گیری و تانن موجود در آن بر رشد بدن و تولید کرک بز کرکی راینی. پایان نامه کارشناسی ارشد علوم دامی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج.
- Adesogan A. T., Krueger N., Salawu M. B., Dean D. B., and Staples C. R. 2004. The Influence of Treatment with Dual Purpose Bacterial Inoculants or Soluble Carbohydrates on the Fermentation and Aerobic Stability of Bermudagrass. *Journal of Dairy Science*, 87: 3407-3416.
- Aksu T., Baytok E., Karlı M. A. and Muruz H. 2006. Effects of formic acid, molasses and inoculant additives on corn silage composition, organic matter digestibility and microbial protein synthesis in sheep. *Small Ruminant Research*, 61: 29-33.
- Association of official Analytic chemists (AOAC). 2002. Official method of Analytic. Vol. 1. 17 thed. AOAC, Arlington, VA. Pp: 120-155.
- Baytok E., Aksu T., Karlı M. A. and Muruz H. 2005. The effects of formic acid, molasses and inoculant as silage additives on corn silage composition and ruminal fermentation characteristics in sheep. *Turkish journal of Veterinary and Animal Science*, 29: 469-474.
- Bernardes T. F., Reis R. A. and Moreira A. L. 2005. Fermentative and microbiological profile of marandugrass ensiled with citrus pulp pellets. *Science Agriculture*, 62(3): 214-220.
- Chase L. E. 1988. Controlling silage quality. In: *Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacture*. Cornell University, Ithaca, NY, pp. 41.
- Contreras-Govea F. E., Muck R. E., Mertens D. R. and Weimer P. J. 2010. Microbial inoculant effects on silage and in vitro ruminal fermentation, and microbial biomass estimation for alfalfa, BMR corn, and corn silages. *Animal Feed Science and Technology*, 163: 2-10.
- Curtis J. L. 1996. Effect of variety on the forage yield, ensiling characteristics, and nutritive value of alfalfa, and effects of cutting, stage of maturity, and silage additives on the preservation and nutritive value of alfalfa silage. A dissertation. Kansas state university. Department of animal science and industry collage of agriculture.
- Dawson L. E. R., Ferris C. P., Steen R. W. J., Gordon F. J. and Kilpatrick D. J. 1999. The effects of wilting grass before ensiling on silage intake. *Grass and Forage Science*, 54: 237-247.
- Driehuis F., Oude Elferink S. J. W. H. and Van Wikselaar P. G. 2001. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculated with *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria. *Grass and Forage Science*, 56: 330-343.
- Dubois A., Giles M. K. A., Hamilton J. K., Ronerts P. A. and Smith F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Ely L. O. 1981. Chemical evaluation of lactobacillus addition to alfalfa, corn, sorghum, and wheat forage at ensiling. *Journal of Dairy Science*, 65: 1041-1046.
- Filya I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*, 86: 3575-3581.
- Filya I., Muck R. E. and Contreras-Govea F. E. 2007. Inoculant effects on alfalfa silage: fermentation products and nutritive value. *Journal of Dairy Science*, 90: 5108-5114.

- Gordon F. J., Dawson L. E. R., Ferris C. P., Steen R. W. J. and Kilpatrick D. J. 1999. The influence of wilting and forage additive type on the energy utilization of grass silage by growing cattle. *Animal Feed Science and Technology*, 79: 15-27.
- Guler T. 2006. Silage and use of animal nutrition. 2001. Conferences. Firat University Veterinary Faculty Publication. Elazig, Turkey. 27-36.
- Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Ghorbani G. R., Ghasemi E., Taghizadeh A., Kargar S. and Yang W. Z. 2014. Interactive effects of molasses by homofermentative and heterofermentative inoculants on fermentation quality, nitrogen fractionation, nutritive value and aerobic stability of wilted alfalfa (*Medicago sativa* L) silage. *Journal of Animal Physiology and Nutrition*, 98: 290-299.
- Hashemzadeh-Cigari F., Khorvash M., Ghorbani G.R. and Taghizadeh A. 2011. The effects of wilting, molasses and inoculants on the fermentation quality and nutritive value of lucerne silage. *South African Society for Animal Science*, 41: 377-388.
- Holzer M., Mayrhuber E., Danner H. and Braun R. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. *Trends in Biotechnology*, 21(6): 282-287.
- Hu W., Schmidt R. J., McDonell E. E., Klingerman C. M., and Kung Jr. L. 2009. The effect of *Lactobacillus buchneri* 40788 or *Lactobacillus plantarum* MTD-1 on the fermentation and aerobic stability of corn silages ensiled at two dry matter contents. *Journal of Dairy Science*, 92(8): 3907-3914.
- Islam M., Enishi O., Purnomoadi A., Higuchi K., Takusari N. and Terada F. 2001. Energy and protein utilization by goats fed Italian ryegrass silage treated with molasses, urea, cellulose or cellulase +lactic acid bacteria. *Small Ruminant Research*, 42: 49-60.
- Khan M. A., Sarwar M., Nisa M., Iqbal Z., Khan M. S., Lee W. S., Lee H. J. and Kim H. S. 2006. Chemical composition, in situ digestion kinetics and feeding value of Oat grass (*Avena sativa*) ensiled with molasses for Nili-Ravi Buffaloes. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 19: 1127-1133.
- Kizilsimsek M., Schmidt R. J. and Kung Jr. L. 2007. Effects of a Mixture of Lactic Acid Bacteria Applied as a Freeze-Dried or Fresh Culture on the Fermentation of Alfalfa Silage. *Journal of Dairy Science*, 90: 5698-5705.
- Kleinschmit D. H. and Kung L. Jr. 2006. A Meta-Analysis of the Effects of *Lactobacillus buchneri* on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn and Grass and Small-Grain Silages. *Journal of Dairy Science*, 89: 4005-4013.
- Kowsar R., Ghorbani G. R., Alikhani M., Khorvash M. and Nikkhab A., 2008. Corn silage partially replacing short lucerne hay to optimize forage use in total mixed rations for lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 4755-4764.
- Kung Jr. L. and Ranjit N. K. 2001. The Effect of *Lactobacillus buchneri* and Other Additives on the Fermentation and Aerobic Stability of Barley Silage. *Journal of Dairy Science*, 84: 1149-1155.
- Kung Jr. L., Taylor C. C., Lynch M. P. and Neylon J. M. 2003. The Effect of Treating Alfalfa with *Lactobacillus buchneri* 40788 on Silage Fermentation, Aerobic Stability, and Nutritive Value for Lactating Dairy Cows. *Journal of Dairy Science*, 86: 336-343.
- Kung L. and Muck R. E. 1997. Effects of silage additives on ensiling. *Proceedings of the Silage: Field to Feedbunk North American Conference, Hershey, NRAES-99*, 187-199.
- Markham R. 1942. A steam distillation apparatus suitable for micro-Kjeldahl analysis. *Biochemistry Journal*, 36, 790.
- McAllister T.A., Feniuk R., Mir Z., Mir P., Selinger L. B. and Cheng K. J. 1998. Inoculants for alfalfa silage: Effects on aerobic stability, digestibility and the growth performance of feedlot steers. *Livestock Production Science*, 53: 171-181.
- Miller W. J., Dalton H. L. and Miller J. K. 1959. Immature Forage Mixtures with Citrus Pulp versus More Mature Forage without Additive for Silage. *Journal Paper No. 115 of the College Experiment Station University of Georgia, College of Agriculture Experiment Stations*.
- Muck R. E. 1987. Dry matter level effects on alfalfa silage quality. 1. Nitrogen transformations. *Transactions of the ASAE*, 30(1): 7-14.
- Nadeau E. M. G., Buxton D. R., Russell J. R., Allison M. J. and Young J. W. 2000. Enzyme, bacterial inoculant, and formic acid effect on silage composition of orchard grass and alfalfa. *Journal of Dairy Science*, 83: 1487-1502.
- Nishino N., Wada H., Yoshida M., and Shiota H. 2004. Microbial Counts, Fermentation Products, and Aerobic Stability of Whole Crop Corn and a Total Mixed Ration Ensiled with and Without Inoculation of *Lactobacillus casei* or *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Dairy Science*, 87: 2563-2570.
- Oude Elferink S. J. W. H., Krooneman J., Gottschal J. C., Spoelstra S. F., Faber F. and 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.

- Ranjit N. K. and Kung Jr. 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.
- Schmidt R. J., Hu W., Mills J. A. and Kung Jr. L. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 92: 5005–5010.
- Silva A.G., Wanderley R.C., Pedroso A.F. and Ashbell G. 1997. Ruminant digestion kinetics of citrus peel. *Journal of Animal Feed Science and Technology*, 68: 247-257.
- Soltani, A., Ghorbani, G.R., Alikhani, M., Samie, A.H. and Nikkhah, A., 2009. Ground versus steam-rolled barley grain for lactating cows: A clarification into conventional beliefs. *Journal of Dairy Science*, 92: 3299-3305.
- Touqir N. A., Ajmal Khan M., Sarwar M., Nisa M., Lee W. S., Lee H. J. and Kim H. S. 2007. Influence of Varying Dry Matter and Molasses Levels on Berseem and Lucerne Silage Characteristics and Their In situ Digestion Kinetics in Nili Buffalo Bulls. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 20(6): 887-893.
- Van Soest P. J., Robertson J. B. and Lewis B. A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583.
- Volanis M., Zoiopoulos P. and Tzerakis K. 2004. Effects of feeding ensiled sliced oranges to lactating dairy sheep. *Small ruminant Research*, 53: 15-21.
- Weinberg Z. G., Ashbell G., Bolsen K. K., Pahlow G., Hen Y. and Azrieli A. 1995. The effect of a prop ionic acid bacterial inoculant applied at ensiling, with or without lactic acid bacteria, on the aerobic stability of pearl-millet and maize silages. *Journal of Applied Microbiology*, 78: 430-436.
- Whiter A.G. and Kung L. 2001. The effect of a dry or liquid application of *Lactobacillus plantarum* MTD1 on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*, 84: 2195–2202.
- Woolford M. K. 1990. The detrimental effects of air on silage. *Journal of Applied Bacteriology*, 68: 101–116.
- Yanbing L. and Naoki N. 2011. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Japanese Society of Grassland Science, Grassland Science*, 57: 184–191.



Effects of lactobacillus inoculants on characteristics and composition of alfalfa wilted by orange pulp silage

M. Karimi¹, M. Besharati^{2*}, A. Taghizadeh³, R. Safari²

1. MS.c student, Ahar Faculty of Agriculture and Nature resources, University of Tabriz, Iran
2. Assistant professor, Ahar Faculty of Agriculture and Nature resources, University of Tabriz, Iran
3. Professor, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Iran

(Received: 9-2-2016 – Accepted: 4-14-2017)

Abstract

This study was conducted to study the effects of *LALSIL* inoculants (*Lactobacillus Buchneri* 40788: LAB) on laboratory characteristics and aerobic stability in alfalfa wilted and chopped into 2 cm of average length with orange pulp silage. Experimental treatments were 1: wilted alfalfa with no additive (control), 2: wilted alfalfa and orange pulp (at a ratio of 70 to 30 percent) with no inoculant, 3: treatment 2 plus 1.5×10^8 cfu/g of *LALSIL* inoculants, 4: treatment 2 plus 3.0×10^8 cfu/g of *LALSIL* inoculants, and 5: treatment 2 plus 4.5×10^8 cfu/g of *LALSIL* inoculants. Experimental treatments were ensiled in triplicate laboratory mini silos for 90d at room temperature. The data were analyzed as a completely randomized design. The pH of all silages was less than 4.55, but pH was significantly higher for control ($P < 0.05$). Addition of orange pulp and bacterial inoculants to wilted alfalfa caused a significant increase in water soluble carbohydrate (WSC) and total volatile fatty acids (tVFA) ($P < 0.05$). The least amount of aerobic stability of was for the treatment 1 and most one was for treatment 5 (56 and 200h after exposure to air, respectively). Results suggest that orange pulp and bacterial inoculants could improve quality of alfalfa silage by altering the availability of WSC, the rapid decline pH and limiting the proliferation of yeasts and fungi.

Keywords: Aerobic stability, Alfalfa silage, *Lactobacillus Buchneri*, Orange pulp.

*Corresponding author: m_besharati@hotmail.com