نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 131-122

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 122-131

بررسی کارآیی پروبیوتیک نوترکیب *لاکتوکوکوس‌لاکتیس* در تجزیه فیتات گیاهی در جیره‌های جوجه‌های گوشتی

حسن کرمانشاهی[1*] - رضا مجید زاده هروی[2]

تاریخ دریافت: 1393/10/16
تاریخ پذیرش: 1394/11/14

چکیده

این آزمایش به منظور مطالعه کارآیی پروبیوتیک نوترکیب *لاکتوکوکوس‌لاکتیس*[3] در تجزیه فیتات گیاهی در جیره‌های جوجه‌های گوشتی انجام شد. باکتری *لاکتوکوکوس‌لاکتیس* به تنهایی یا همراه با دو سویه باکتری لاکتوباسیل (*لاکتوباسیلوس کریسپاتوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*) به شکل مخلوط پروبیوتیکی به جیره‌ای که از نظر فسفر قابل دسترس کمبود داشت (نصف مقدار توصیه شده NRC (1994)) اضافه شدند. یک تیمار جیره‌ای دارای کمبود فسفر بدون اضافه کردن مکمل پروبیوتیکی بعنوان کنترل منفی در آزمایش گنجانده شد. جیره‌هایی با مقادیر فسفر توصیه شده (1994 NRC) به عنوان شاهد با مکمل و بدون مکمل پروبیوتیکی نیز تنظیم شدند. 288 قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه سویه تجاری راس 308 در 4 تکرار و 12 جوجه در هر تکرار تحت 6 تیمار آزمایشی قرار گرفتند. وزن بدن، میزان رشد، ضریب تبدیل بطور دوره‌ای و قابلیت هضم فسفر فیتاته، فاکتورهای استخوانی، فلور میکروبی روده و فاکتورهای خونی در این آزمایش اندازه گیری شدند. مقایسه وزن بدن بین تیمارهای مختلف نشان داد که کاهش فسفر قابل دسترس خوراک کاهش معنی‌داری را حتی در حضور پروبیوتیک نوترکیب در وزن بدن ایجاد کرد.قابلیت هضم فسفر فیتاته در تیمارهای مصرف کننده مخلوط پروبیوتیکی، در هر دو سطح فسفرقابل دسترس، حدود 20 درصد بالاتر از تیمارهای بدون پروبیوتیک بود. پرندگانی که از تیمارهای حاوی مکمل پروبیوتیکی *لاکتوکوکوس‌لاکتیس* به تنهایی تغذیه می‌کردند قابلیت هضم ظاهری حدود 18 درصد بیشتر از تیمارهای بدون پروبیوتیک (شاهد) برای فسفر فیتاته نشان دادند. همچنین فسفر سرم جوجه‌های مصرف کننده جیره های حاوی مخلوط پروبیوتیکی بالاتراز تیمارهای بدون مکمل بود. بررسی فلور میکروبی سکوم در 42 روزگی، جمعیت باکتری‌های گرم منفی روند کاهشی در مرغ های مصرف کننده پروبیوتیک نشان داد. نتایج تحقیق حاضر بیان می‌کند که استفاده از پروبیوتیک نوترکیب *لاکتوکوکوس لاکتیس* نتوانست تا افزایش معنی‌داری را در استفاده از فسفر فیتاته ایجاد کند. همچنین محتوای کم فسفر فیتاته در جیره های مورد استفاده در این مطالعه و همچنین افزایش ناکافی قابلیت هضم فسفر فیتاته احتیاجات فسفر پرنده را تامین نکرده است. لذا افزایش بیان ژن فیتاز توسط باکتری لاکتوکوکوس‌لاکتیس و استفاده همزمان آن با باکتری‌های پروبیوتیکی لاکتوباسیل پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، جوجه‌گوشتی، فیتاز، لاکتوکوکوس‌لاکتیس، نوترکیب.

مقدمه

فسفر یکی از عناصر ضروری برای همه حیوانات است. این عنصر نقش حیاتی در متابولیسم سلولی، تنظیم مکانیسمهای سلولی و در استحکام استخوان دارد. استخوان یک ارگان اصلی ذخیره فسفر در بدن است که 85% کل فسفر بدن را در خود جای می دهد. به دلیل نقش کلیدی فسفر در رشد و معدنی شدن استخوان، احتیاجات این عنصر در طی رشد پرنده به حداکثر خود میرسد. در خوراک حیوانات غیر نشخوار کننده مانند مرغ گوشتی که قسمت زیادی از اجزای آن از ترکیبات گیاهی است سعی بر این است تا هر چه بیشتر فسفر خوراک برای حیوان قابل دسترس باشد. در گیاهان، فسفر به اشکال مختلفی با مولکولهای آلی مانند فسفولیپیدها و پروتئین‌ها متصل شده است اما قسمت زیادی از فسفر گیاهی بعنوان بخشی از مولکول اسید فیتیک می‌باشد.اسید فایتیک (میو اینوزیتول هگزاکیس فسفات[4]) یکی از ترکیبات اصلی همه دانه های گیاهیاست و 60 تا 70 درصد کل فسفر گیاه را شامل می‌شود (7). به دلیل فعالیت کم فیتازی در دستگاه گوارش طیورقابلیت استفاده فسفر فیتاتی در آنها اندک است و به

1و2- به ترتیب استاد و استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
(*- نویسنده مسئول: (Email: hassbird@yahoo.com

3-*Lactococcus lactis*

4-Myo-inositol-hexakisphosphate

همین دلیل است که منابع فسفر معدنی از قبیل دی یا منو کلسیم فسفات به جیره های طیور افزوده می شود.قابلیت هضم این مواد معدنی در جوجه های گوشتی 80-85 درصد می‌باشد.

وجود فسفر فیتاته از منابع گیاهی و فسفر معدنی جذب نشده در مدفوع حیوانات تک معده‌ای نگرانی های زیست محیطی را به دلیل آلودگی محیط زیست و آب های جاری در مناطق پرورش این حیوانات افزایش داده است (18). فعالیت فیتازی در انواع مختلف باکتری ها نیز شناسایی شده‌اند که از جمله آنسویه‌های *سودوموناس*، *باسیلوس سابتیلیس*، *باسیلوس آمیلولیکوفاسینس*[1]، سویه‌های *کلبسیل*، *ایکولای‌وانترباکترها* را می توان نام برد. در مورد راسته باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک نتایج متغیری وجود دارد سویه‌های معدودی فعالیت اندکی نشان داده‌اند اما در اکثر سویه ها فعالیت فیتازی مشاهده نشده است (17و 21). استفاده از گونه های اخیر بعنوان پروبیوتیک در حیوانات تک معده‌ای اهمیت ویژه‌ای دارد. چند دلیل برای توجه به این باکتری ها برای ساخت پروبیوتیکها وجود دارد: 1- از رشد باکتری‌های بیماریزا جلوگیری می کند 2- چسبندگی مناسبی به سلول های اپیتلیوم روده دارد 3- دارای خاصیت حذف رقابتی هستند 4- همزیست های سالمی برای میزبان هستند که عملکرد سیستم ایمنی میزبان را افزایش می‌دهند (8). *لاکتوکوکوس‌لاکتیس* بعنوان یک سویه شناخته شده پروبیوتیک می‌باشد و جهت افزایش اثر گذاری تاثیر پروبیوتیکی مکمل میکروبی مورد استفاده قرار می‌گیرد(8). استفاده از پروبیوتیکهایی که عملکرد مکمل های آنزیمی را علاوه بر مزیتهای بهبود سلامتی داشته باشد مورد توجه قرار گرفته است. اسکلسون و همکاران (2) با تولید لاکتوباسیل‌های نوترکیب با قابلیت تجزیه فیتات عملکرد مناسبی را در تجزیه فیتات گیاهی در جیره جوجه های گوشتی مشاهده کردند. همچنین استفاده از لاکتوباسیلوس روتری نوترکیب در تجزیه بتا گلوکان بعنوان یک ماده ضد تغذیه‌ای در خوراک طیور، موفقیت آمیز بوده است (21). از اینرو در این تحقیق کارآیی یک باکتری پروبیوتیک *لاکتوکوکوس‌لاکتیس*نوترکیب با پتانسیل تجزیه فیتات گیاهی در بهبود عملکرد جوجه های گوشتی تغذیه شده با جیره های حاوی مقدار کم فسفر قابل دسترس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

پرنده و طرح آزمایشی

در این آزمایش 288 قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه سویه تجاری راس 308 پس از وزن کشی به صورت تصادفی در 24 قفس قرار داده شدند.جوجه ها در 4 تکرار و در هر تکرار 12 جوجه تحت 6 تیمار آزمایشی قرار گرفتند. تیمارها در این آزمایش به قرار زیر طراحی شدند:1-جیره حاوی فسفر قابل دسترس مطابق توصیه NRC (1994) و بدون پروبیوتیک2-جیره حاوی فسفر قابل دسترس مطابق توصیه NRC (1994) و پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس*3- جیره حاوی فسفر قابل دسترس مطابق توصیه NRC (1994) و مخلوط پروبیوتیکی 4- جیره حاوی 50% فسفر قابل دسترس توصیه شده NRC (1994) و بدون پروبیوتیک 5- جیره حاوی 50% فسفر قابل دسترس توصیه شده NRC 1994 و پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس6- جیره حاوی 50% فسفر قابل دسترس توصیه شده NRC (1994) و مخلوط پروبیوتیکی.

مکمل پروبیوتیکی

مخلوط پروبیوتیکیشامل باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* نوترکیب با قابلیت تولید آنزیم فیتاز باکتری *ایکولای*(مجیدزاده هروی و همکاران، اطلاعات منتشر نشده) (فعالیت آنزیمی 5 U/ml) و *لاکتوباسیلوسکریسپاتوس* و *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* جدا شده به ترتیب از قسمت چینه دان و سکوم جوجه های گوشتی بود(11).جهت آماده سازی باکتری ها برای اضافه کردن به جیره، به هم حجم رسوب باکتریایی پس از سانتریفوژ، محلول سوکرز 15% و شیر چربی گرفته شده[2] 25% اضافه شد و لوله به صورت مایل در داخل فریزر منجمد و سپس توسط دستگاه لئوفریزاتور خشک و سپس آسیاب گردید. سلولهای پروبیوتیکی به میزان 10^8 باکتری در هر گرم خوراک به جیره‌ها اضافه گردید.

اندازه‌گیری‌ها

وزن بدن، مصرف خوراک وافزایش وزن بصورت دوره‌ای اندازه‌گیری شد. قابلیت هضم ظاهری با استفاده از مارکر کروم انجام شد.بدین منظور اکسید کرم به نسبت 0/3 %کل جیره به طور کامل با جیره مخلوط گردید. مدت 3 ساعتجوجه ها در شرایط گرسنگی قرار گرفتند، سپس به مدت یک روز خوراک حاوی اکسید کرم به منظور عادت پذیری جوجه ها و سه روز خوراک دهی با جیره نشان دار به منظور نمونه گیری انجام شد (1). جیره های هر تیمار و مدفوع در هر تکرار جمع آوری و پس از برداشت یک نمونه همگن (50 گرم) برای تعیین درصداکسیدکرمدر دمای 20°C- نگهداری شد (6). قابلیت هضم مواد مغذی پس از تعیین درصد کرم مدفوع بر اساس فرمول زیر محاسبه می‌شود (12) :

$$\text{قابلیت هضم مواد مغذی} = \left(1 - \frac{\text{غلظت مارکر در جیره غذایی} \times \text{غلظت مواد مغذی در مدفوع}}{\text{غلظت مارکر در مدفوع} \times \text{غلظت در جیره غذایی}}\right) \times 100$$

1-*B. amyloliquefaciens*

2-Skimed milk

جدول 1- ترکیب جیره‌های آزمایشی استفاده شده در این مطالعه

Table1- Composition of theexperimental diets

اجزاء جیره غذایی (%) Ingredients (%)	0-21		21-42	
	50% P[3]recommended by NRC	P recommended by NRC	50% P recommended by NRC	P recommended by NRC
ذرت corn	53.67	53.67	58.55	58.55
گندم wheat	5	5	10	10
کنجاله سویا(44% پروتئین‌خام) Soybean meal(44% crude protein)	35.49	35.49	27.19	27.19
سبوس گندم Wheat bran	0.57	0.12	0.99	0.61
روغنآفتابگردان Sun floweroil	2	2	0.5	0.5
دی ال- متیونین DL-methionine	0.15	0.15	0.05	0.05
دی‌کلسیم فسفات Dicalcium phosphate	0.30	1.39	0.12	0.98
پودر کربنات کلسیم Calcium carbonate	1.91	1.27	1.82	1.33
پرمیکس ویتامین [1] vitamin premix[1]	0.25	0.25	0.25	0.25
پرمیکس معدنی2 Mineral premix[2]	0.25	0.25	0.25	0.25
نمک salt	0.41	0.41	0.28	0.29
مواد مغذی محاسبه شده Calculated nutrients				
انرژی قابل‌متابولیسم (Kcal/kg) Metabolizable energy (Kcal/kg)	2900	2900	2900	2900
پروتئین خام (%) Crude protein (%)	20.84	20.84	18.12	18.12
متیونین (%) Methionine (%)	0.47	0.47	0.34	0.34
لایزین (%) Lysine (%)	1.10	1.10	0.91	0.91
آرژنین (%) Arginine (%)	1.33	1.33	1.11	1.11
متیونین+سیستین(%) Methionine+ cysteine (%)	0.81	0.81	0.65	0.65
کلسیم (%) Calcium (%)	0.90	0.90	0.81	0.81
فسفر کل (%) Total phosphorus (%)	0.45	0.66	0.40	0.56
فسفر قابل دسترس (%) Available phosphorus (%)	0.20	0.4	0.15	0.31
سدیم (%) Sodium (%)	0.18	0.18	0.13	0.13

[1] هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل: 11000IU واحد ویتامینA، 1800IU ویتامین D_3، 5 میلیگرم ویتامین K3، 1/53 میلیگرم تیامین، 7/5 میلیگرم ریبوفلاوین، 12/4 میلیگرم پنتوتونات، 30/4 میلیگرم نیاسین، 1/53 میلیگرم پیرودوکسین، 1/26 میلیگرم اسید فولیک، 1/6 میلیگرم ویتامین B12، 5 میلیگرم بیوتین، 1100 میلیگرم کولین کلراید، 100 میلیگرم آنتی اکسیدان،

[2] هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل: 16/3 میلیگرم منگنز، 84/5 میلیگرم روی، 250 میلیگرم آهن، 20 میلیگرم مس، 0/48 میلیگرم کبالت، 20 میلیگرم سلنیم و 1/6 میلیگرم ید.

[1]One kilogram vitamin premix included: vitamin A, 11000 IU; vitamin D_3, 1800 IU; vitaminK3, 5mg; thiamine,1.53mg; Riboflavin, 7.5mg; pantothenate, 12.4mg; Niacin 30.4mg; pyridoxine 1.53mg;folic acid 1.26mg; Vitamin B12, 1.6mg; Biotin, 5mg; choline chloride, 1100mg; Antioxidant, 100mg.

[2]One kilogram mineral premix included: Mangnesium, 16.3 mg; Zinc, 84.5mg; Iron, 250mg; Copper, 20mg; Cobalt, 0.48 mg; selenium, 20 mg; iodide, 1.6 mg;

[3]Available Phosphorus

اندازه گیری فیتات در خوراک و مدفوع به روش ویلر و همکاران (1971) انجام گرفت و بصورت درصد ماده خشک گزارش شد. به منظور بررسی فلور میکروبی روده در 3 و 42 روزگی نمونه برداری از فلور ناحیه سکوم جوجه ها برداشته و در سه محیط MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)،M17 و EMB (Eiosinmethilen blue) به ترتیب برای بررسی جمعیت لاکتوباسیلها، لاکتوکوکوس لاکتیس و کلی باسیلی کشت شد.

در37 روزگی خونگیری از سیاهرگ بال انجام شد و مقادیر کلسیم، فسفر و کلسترول سرم خون توسط دستگاه اتوآنالایزر BiosystemS.A.-CostaBrava 30.08030) Barcelona,Spain)اندازه گیری شد. در 42 روزگی استخوان ران پای چپ جداسازی شد و قطر اپی فیز و دیافیز با استفاده از کولیس دیجیتال اندازه گیری و سپس فاکتورهای انرژی شکست (fracture energy)، سختی استخوان(stiffness) با دستگاه اینسترون(H5KS, Tinius Olsen Company)تعیین گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده های حاصل از این آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری SAS نسخه 9/1 (16) و روش مدل های خطی عمومی (GLM) در قالب طرح کاملا تصادفی آنالیز شدند و میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح احتمال 5% مقایسه گردیدند.

نتیجه و بحث

در سن 7 روزگی و 21 و 42 روزگی بیشترین وزن بدن متعلق به تیمارهایی با فسفر توصیه شدهمی‌باشد. مقایسه وزن بدن بین تیمارهای مختلف نشان می‌دهد که کاهش فسفر قابل دسترس خوراک به 50% فسفر توصیه شده توسط NRC کاهش معنی‌داری را در وزن بدن ایجاد کرده است (P< 0/01). بر این اساس مشخص می‌شود کهفعالیت فیتازی ترکیبات متفاوت باکتری‌های پروبیوتیکی (مخلوط پروبیوتیکی یا لاکتوکوکوس لاکتیس) مورد استفاده، کاهش وزن بدن ناشی از کمبود فسفر قابل دسترس را جبران نمی‌نماید. هر چند میانگین وزن بدن در تیمارهای حاوی مخلوط پروبیوتیکی در هر یک از دو سطح فسفر قابل دسترس بیشتر ازتیمارهای بدون پروبیوتیک و لاکتوکوکوس به تنهایی بود.این روند در افزایش وزن در کل دوره نیز قابل مشاهده بود (جدول2 و 3). در آزمایشی که از باکتری‌های تجزیه کننده فیتات (جدا شده از محیط شکمبه) در جیره جوجه‌های گوشتی استفاده شد، افزایشی را در رشد و وزن بدن جوجه های گوشتی مشاهده کردند که ناشی از فعالیت بالای فیتازی باکتری های مزبور بود (9) که با نتایج این آزمایش مغایرت داشت که به علت فعالیت کم فیتازی باکتری نوترکیب می‌باشد.در این مطالعه کمبود فسفر باعث کاهش مصرف خوراک و کاهش وزن شد کهدر تیمار مربوط به کمبود فسفر و بدون پروبیوتیک بطور معنی‌داری قابل مشاهده می‌باشد. مشخص شده که کمبود فسفر باعث کاهش ترشح هورمون رشد شده بطوریکه کاهش متابولیسم و مصرف خوراک و به دنبال آن کاهش رشد بدن را در طیور به همراه دارد (5). از طرفی محققین نشان دادند که استفاده از فیتاز بصورت آنزیم در خوراک استاندارد تاثیری بر مصرف خوراک، افزایش وزن و ضریب تبدیل نداشته است (13) که با نتایج مربوط به مقایسه بین تیمارهای حاوی فسفر توصیه شده این مطالعه انطباق دارد (جدول 3).

نتایج قابلیت هضم فسفر فیتاته نشان داد که قابلیت هضم در تیمارهای مصرف کننده مخلوط پروبیوتیکی در هر دو سطح فسفرقابل دسترس حدود 20 درصد بالاتر از تیمارهای بدون پروبیوتیک بود. همچنین مکمل پروبیوتیکی *لاکتوکوکوس لاکتیس* نیز در جوجه های مصرف کننده،قابلیت هضم ظاهری حدود 18 درصد بیشتر از تیمارهای بدون پروبیوتیک را ایجاد کرد (جدول 4) که بیانگر فعالیت فیتازی این مکمل‌های میکروبی است بطوریکه این فعالیت در میزان فسفر سرم منعکس شد و فسفر سرم جوجه های مصرف کننده مخلوط پروبیوتیکی بالاتر از سایر تیمارها بود هرچند تفاوت معنی‌دار به لحاظ آماری نشان نداد (P=0/0603).

جدول2-بررسی اثرات تیمار های مختلف خوراکی برمیانگین وزن بدن جوجه های گوشتی در سنین مختلف(g)[1]

Table 2- Effects of different dietary treatments on body weight of broiler chicks at different ages (g)[1]

سن (روز) Age (days)	P[2] recommended by NRC			50% P recommended by NRC			اشتباه استاندارد SE	سطح احتمال Prob.
	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس L.lactis	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس L.lactis	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic		
7	153.06 [a]	156.45 [a]	161.17 [a]	132.38 [b]	134.27 [b]	133.90 [b]	5.431	0.0023
21	631.61 [a]	614.42 [a]	644.00 [a]	444.85 [b]	439.01 [b]	457.99 [b]	17.586	0.0001
42	1985.4 [a]	1975.3 [a]	2071.4 [a]	1496.7 [b]	1415.00 [b]	1511.9 [b]	76.705	0.0001

[1]میانگین‌های هر ردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی دارمی‌باشند (P<0.05)

[1]Means within same row with different superscripts differ (P<0.05)

[2]Available Phosphorus

جدول 3- بررسی اثرات تیمار های مختلف خوراکی بر صفات عملکردی جوجه های گوشتی درسنین متفاوت[1]

Table 3-Effects of different dietary treatments onperformance traits of broiler chicks at different ages[1]

سن (روز) Age (days)	P[2] recommended by NRC			50% P recommended by NRC			اشتباه استاندارد SE	سطح احتمال Prob.
	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic		
Means of Growth Rate(g)								
0-21	589.61 [a]	572.42 [a]	602.00 [a]	402.85 [b]	397.01 [b]	415.99 [b]	17.586	0.0001
21-42	1353.80 [a]	1360.80 [a]	1427.40[a]	1051.80 [b]	976.00 [b]	1053.90 [b]	74.211	0.0008
0-42	1943.40 [a]	1933.30 [a]	2029.40 [a]	1454.70 [b]	1373.00 [b]	1469.90 [b]	76.705	0.0001
Means of Feed Intake(g)								
0-21	1093.11[ab]	1097.30[ab]	1242.21[a]	908.14[c]	1000.24[bc]	1048.31[bc]	51.494	0.0066
21-42	2800.70[a]	2822.80[a]	2932.90[a]	2133.80[b]	2082.20[b]	2636.50[a]	120.413	0.0002
0-42	3893.80[a]	3920.10[a]	4174.10[a]	3041.90[b]	3082.40[b]	3684.80[a]	163.806	0.0004
Means of Feed Efficiency								
0-21	1.52[c]	1.56[c]	1.58[c]	1.72[b]	1.92[a]	1.82[ab]	0.04	0.001
21-42	2.08	2.08	2.07	2.04	2.15	2.55	0.17	0.13
0-42	2.01	2.04	2.02	2.00	2.07	2.35	0.15	0.16

[1]میانگین‌های هرردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05)

[1]Means within same row with different superscripts differ (P<0.05)

[2]Available Phosphorus

احتمالا وجود باکتری‌های لاکتوباسیل در مخلوط پروبیوتیکی در کنار *لاکتوکوکوس لاکتیس* باعث کارآیی بهتر این باکتری در تجزیه فیتات گیاهی شده است زیرا باکترهای لاکتوباسیل با ایجاد شرایط اسیدی باعث محلول شدن فیتات و در دسترس قرارگرفتن آن در معرض آنزیم می‌گردد و از آنجا که فعالیت ایده‌آل فیتازنوترکیب تولیدی توسط باکتری *لاکتوکوکوس لاکتیس* در pH اسیدی است(10) بنابراین وجود باکتری‌های لاکتوباسیل شرایط ایده‌آلی را برای فعالیت فیتاز تولیدی توسط*لاکتوکوکوس لاکتیس* فراهم می‌آورد.مشخص شده است که کاهش pH روده از طریق اضافه کردن اسید های معدنی به جیره غذایی دچار کمبود فسفر قابل دسترس در جوجه های گوشتی موجب بهبود عملکرد آنها گردیده و محتوای فسفر سرم را افزایش دادهاست (4و 6)، اما این عمل تاثیری بر عملکرد جوجه های مصرف کننده جیره هایی با فسفر کافی نداشت (15)که با نتایج بدست آمده در این مطالعه منطبق است.

جدول 4- بررسی اثرات تیمار های مختلف خوراکی بر فراسنجه های خونی و قابلیت هضم فسفرفیتاته در جوجه‌های گوشتی[1]

Table 4-Effects of different dietary treatments onbloodmetabolites and phytate phosphorus digestibility in broiler chicks[1]

فراسنجه‌ها Parameters	P[2] recommended by NRC			50% P recommended by NRC			اشتباه استاندارد SE	سطح احتمال Prob.
	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic		
کلسیم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) calcium(mg/dl)	8.84	10.02	10.35	10.79	11.43	12.68	0.904	0.115
فسفر (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) Phosphorus(mg/dl)	4.45[abc]	5.17[ab]	5.49[a]	3.68[bc]	3.39[c]	3.94[abc]	0.518	0.0603
کلسترول(میلی‌گرم بر دسی‌لیتر) cholesterol(mg/d)	146.69	140.90	149.22	150.98	144.67	151.03	7.943	0.933
قابلیت هضم فسفر فیتاته (%) Phytate phosphorus digestibility (%)	48.65	64.92	67.83	43.59	61.35	63.11	10.633	0.539

[1]میانگین‌های هرردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05)

[1]Means within same row with different superscripts differ (P<0.05)

[2]Available Phosphorus

اما توجه به محتوی فسفر فیتاته جیره‌هایی با 50% فسفر قابل دسترس توصیه شده نشان می‌دهد که با وجود فعالیت فیتازی اندکی که در دستگاه گوارش ایجاد می‌شود، هنوز فسفر مورد نیاز حیوان که برابر با 0/4 درصد در دوره آغازین و 0/31 درصد در دوره میانداان می‌باشد را تامین نمی کند، بنابراین رشد کمتر در تیمارهای اخیر اجتناب ناپذیر است.

کاهش رشد در تیمارهای کمبود فسفر قابل دسترس در میانگین طول استخوان ران مشهود است (جدول 5). بطوریکه در خوراک‌های دارای فسفر قابل دسترس کمتر و بدون پروبیوتیک یا پروبیوتیک *لاکتوکوکوس لاکتیس* طول استخوان بطور معنی داری کمتر از تیمار حاوی مخلوط پروبیوتیکی و تیمارهای بدون کمبود بود (جدول 5).

این نتیجه منعکس کننده فعالیت کم آنزیم فیتازی و همچنین محتوی کم فسفر فیتاته در جیره می باشد. اما وضعیت بهتر ابعاد استخوانی (قطر اپیفیز و دیافیز وطول استخوان) در جوجه هایی که جیره حاوی پروبیوتیک مصرف می‌کردند ممکن است به دلیل جذب بهتر کلسیم در روده این پرنده ها باشد. مشخص شده که استفاده از پروبیوتیک ها به دلیل تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (پروپیونات و بوتیرات) در روده باعث رشد پرزها وهمچنین تولید بیشتر پروتئین های باند شونده به کلسیم در سلول های انتروسیت می‌گردد (17). ازاین رو بهبود جذب کلسیم را به همراه داشته که همانطور که در این مطالعه مشاهده شد بر خصوصیات استخوان منعکس شده است.

جدول 5- بررسی اثرات تیمار های مختلف بر فاکتورهای استخوان جوجه‌های گوشتی[1]

Table 5- Effects of different dietary treatments on bone characteristics of broiler chicks[1]

بر فاکتورهای استخوان bone characteristics	P[2] recommended by NRC			50% P recommended by NRC			اشتباه استاندارد SE	سطح احتمال Prob.
	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس *L.lactis*	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic		
انرژی شکست (N/mm) fracture energy	0.415	0.390	0.333	0.317	0.313	0.342	0.039	0.423
سختی‌استخوان (N/mm) stiffness	57.21	103.53	68.87	35.11	31.40	32.74	25.779	0.277
طول استخوان (mm) Length of bone	80.50 ^{ab}	81.88 ^{a}	82.25 ^{a}	70.893^{c}	74.98^{bc}	77.98 ^{ab}	1.866	.0065
قطر دیافیز (mm) Diameter of diaphysis	6.96^{bc}	8.35 ^{a}	7.83 ^{ab}	6.46 ^{c}	6.71^{bc}	6.77^{bc}	0.342	0.011
قطر اپیفیز (mm) Diameter of epiphysis	21.34 ^{a}	21.10 ^{a}	21.05 ^{a}	18.76 ^{b}	17.92 ^{b}	19.62 ^{ab}	0.522	0.002

[1]میانگین‌های هرردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (P<0.05)

[1]Means within same row with different superscripts differ (P<0.05)

[2]Available Phosphorus

بررسی فلور میکروبی سکوم در 42 روزگی نشان میدهد که جمعیت باکتریهای گرم منفی در تیمارهای مصرف کننده پروبیوتیک روند کاهشی را نشان می‌دهد بطوریکه این کاهش در تیمارهای مصرف کننده مخلوط پروبیوتیکی بیشتر قابل مشاهده استهر چند که به لحاظ آماری تفاوت معنی دار نیستکه احتمالا بدلیل واریانس زیاداعداد خام می تواند باشد (P<0/1). جمعیت لاکتوباسیلها مورد بررسی تفاوت آماری معنی داری نشان ندادند (جدول 6). در این مطالعه در تیمارهای مخلوط پروبیوتیک روند کاهش جمعیت باکتری های گرم منفیکه اغلب آنها پاتوژن هستند دور از انتظار نیست چون که فعالیت ضد ایکولای و سالمونلایی لاکتوباسیل های مورد استفاده در مخلوط پروبیوتیکی نشان داده شده است (11).

نتیجه گیری کلی

نتایج تحقیق حاضر بیان می کند که استفاده از پروبیوتیک نوترکیب *لاکتوکوکوس لاکتیس*نتوانست تا افزایش معنی داری را در استفاده از فسفر فیتاته ایجاد کند و قابلیت هضم را فقط بطور جزئی تغییر داد (حدود 18 درصد). سطح پایین فسفر فیتاته در جیره مورد استفاده در این مطالعه و همچنین افزایش ناکافی قابلیت هضم فسفر فیتاته احتیاجات پرنده را تامین نکرده و باعث بهبود صفات عملکردی نشده است. لذا ارتقاء بیان آنزیم فیتاز توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس و استفاده از باکتریهای پروبیوتیکی لاکتوباسیل بطور همزمان در آزمایش‌های بعدی پیشنهاد می‌گردد.

جدول 6- بررسی اثرات تیمار های مختلف بر جمعیت باکتریایی سکوم جوجه های گوشتی(log_{10})[1]

Table 6- Effects of different dietary treatments onbacteria population in cecum of broiler chicks[1]

سن(روز) Age(day)		P[2] recommended by NRC			50% P recommended by NRC			سطح احتمال Prob.
		بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس L.lactis	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	بدون پروبیوتیک No-probiotic	لاکتوکوکوس L.lactis	مخلوط پروبیوتیک Mixed probiotic	
۳روزگی 3days	باکتري هاي گرم منفي Gram negative bacteria	7.37±2.013	9.93±2.325	6.30±2.325	9.56±2.325	9.33±2.325	7.06±2.325	0.81
	لاکتوباسیل ها lactobacilli	6.97±1.97	9.73±2.281	6.26±2.281	9.40±2.281	8.93±2.281	3.60±2.281	0.42
۴۲روزگی 42days	باکتري هاي گرم منفي Gram negative bacteria	7.52±1.099	6.50±1.099	7.11±1.099	7.01±1.099	5.33±1.099	2.36±1.269	0.07
	لاکتوباسیل lactobacilli	8.39±0.730	7.43±0.730	7.85±0.730	7.74±0.730	7.79±0.730	7.21±0.843	0.5

[1]میانگین‌های هرردیف باحروف غیر مشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند ($P<0.05$)

[1]Means within same row with different superscripts differ ($P<0.05$)

[2]Available Phosphorus

منابع

1- Afkhami, M., H. Kermanshahi., and A. Golian. 2014. Nutrative value of three soybeam meals through in vitro techniques and in vivo evaluation in broiler chickens. Iranian journal of animal science, 6(1):8-16.(In Persian)

2- Askelson, T. E., A. Campasino., J. T. Lee., and T. Duong. 2014. Evaluation of phytate-degrading Lactobacillus culture administration to broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology, 80(3):943-950.

3- Boling-Frankenbach, S. D., J. L. Snow., C. M. Parsons., and D. H. Baker. 2001. The effect of citric acid on the calcium and phosphorus requirements of chicks fed corn-soybean meal diets. Poultry Science, 80(6):783-788.

4- Boling, S. D., D. M. Webel., I. Mavromichalis., C. M. Parsons., and D. H. Baker. 2000. The effects of citric acid on phytate-phosphorus utilization in young chicks and pigs. Journal of Animal Science, 78(3):682-689.

5- Carew, L. B., J., T. A. Gestone., F. A. Alster., and C. G. Scanes. 1985. Effect of phosphorus deficiency on thyroid function and growth hormone in the white Leghorn male. Poultry Science, 64(10):2010-2012.

6- Dansky, L. M., and F. W. Hill. 1952. Application of the chromic oxide indicator method to balance studies with growing chickens. Journal of Nutrition, 47(3):449-459.

7- Graf, E. 1983. Formation of [3H, 32P]phytic acid in germinating wheat. Anal Biochem 131(2):351-355.

8- Hammes, W. P. and R. F. Vogel. 1995. The genus Lactobacillus. Pages 19-54 in The lactic acid bacteria. Vol. 2. Wood B.J.B. and Holzapfel W.H., ed. Blackie Academic and Professional, London.

9- Lan, G. Q., N. Abdullah., S. Jalaludin., and Y. W. Ho. 2002. Efficacy of supplementation of a phytase-producing bacterial culture on the performance and nutrient use of broiler chickens fed corn-soybean meal diets. Poultry Science, 81(10):1522-1532.

10- Lei, X. G. and C.H. Stahl. 2001. Biotechnological development of effective phytases for mineral nutrition and environmental protection. Applied Microbiology and Biotechnology, 57(4):474-481.

11- Majidzadeh Heravi, R., H. Kermanshahi., M. Sankian., M. R. Nassiri., A. H. Moussavi., L. R. Nasiraii., and A. R. Varasteh. 2011. Screening of lactobacilli bacteria isolated from gastrointestinal tract of broiler chickens for their use as probiotic. African Journal of Microbiology Research, 5:1858-1868.

12- Maynard, L. A. and J. K. Loosli. 1969. Animal Nutrition, 6th ed. McGrow-Hill, New York, USA

13- Mohammadbagheri, N. and R. Najafi. 2014. Study the effect of citric acid and phytase supplementation on

performance, blood lipid, immune system and some carcass chracteristics of broiler chickens Iranian journal of animal science, 6(2):131-139. (In Persian)

14- National Research Councile. 1994. Nutrient requirement of poultry. 9 ed. NationalAcademy, Washington, DC.

15- Nourmohammadi, R., S. M. Hosseini., and H. Farhangfar. 2010. Effect of dietatry acidification on some blood parameters and weekly performance of broiler chickens. journal of animal veterinary advances, 9(24):3092-3097.

16- SAS Institute. 2004.SAS/STAT User's Guide: Statistics. Version 9.2 Edition. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

17- Scholz-Ahrens, K. E., P. Ade., B. Marten., P. Weber., W. Timm., Y. Acil., C. C. Gluer., and J. Schrezenmeir. 2007. Prebiotics, probiotics, and synbiotics affect mineral absorption, bone mineral content, and bone structure. Journal of Nutrition, 137(3 Suppl 2): 838S-846S.

18- Sreeramulu, G., D. S. Srinivasa., K. Nand., and R. Joseph. 1996. Lactobacillus amylovorus as a phytase producer in submerged culture. Letters in Applied Microbiology, 23: 385-388.

19- Sweeten, J. 1992. Livestock and poultry waste management: a national overview. Pages 4-15 in National livestock, poultry and aquaculture waste management. Blake JD M.W., ed. Amer Soc Agric Eng, St. Joseph, Minnesota.

20- wheeler E. L., and Ferrel R. E. 1971. A Metjod for phytic acid determination in wheat and wheat fractions. Cereal Chemistry, 48:312-320.

21- Yu, B., J. R. Liu., F. S. Hsiao., and P. W. S. Chiou. 2008. Evaluation of Lactobacillus reuteri Pg4 strain expressing heterologous -glucanase as a probiotic in poultry diets based on barley. Animal Feed Science and Technology, 141: 82–91.

22- Zamudio, M., A. Gonzalez., and J. A. Medina. 2001. Lactobacillus plantarum phytase activity is due to non-specific acid phosphatase. Letters in Applied Microbiology, 32(3): 181-184.

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 122-131

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 131-122

Study of a Recombinant *Lactococcuslactis* Performance to Degrade of phytate phosphorus in Broiler Chick Diets

H. Kermanshahi[1]*- R. Majidzadeh Heravi[2]

Received: 06-01-2015
Accepted: 03-02-2016

Introduction Phytic acid is a main compound in all plant seeds and contains 60 to 70% of total phosphorus in plant. Monogastric animals cannot use phytatephosphorus because of low phytase activity in their digestive tract. Thus in addition to unabsorbed mineral phosphorus, phytate phosphorus in fecal ofmonogastric animals may affect water and environment pollution. It is suggested to use of phytase enzyme for resolving of this problem. Phytase activity was showed in some bacteria like *pseudomonas*, *bacillus subtilis* and *amyloliquefaciens*. Few strain of lactic acid bacteria order showed phytase activity or were different for this activity. On the other hand these bacteria order are important as probiotic strains. There are numerous studies to use probiotic bacteria with specific enzyme activity for increasing nutrient availability to animals. This experiment was aimed to study of a recombinant *Lactococcuslactis* performance to degrade of phytate phosphorus in broiler chicken diets.

Materials and methods *Lactococcuslactis* was supplemented to a phosphorus deficient diet (50% of available phosphorus recommended by NRC) lonely or with two other lactobacillus bacteria (*lactobacillus crispatus*and *lactobacillus salivarus*) in rate of 10^8 CFU/g diet. Diets were also formulated with recommended available phosphorus by NRC with or without probiotic supplementation. Two hundred eighty eight one day old male Ross broiler chicks were subjected to 6 experimental treatment in 4 replicates and 12 chicks in each replicate. Growth performance, bone characteristics, intestinalmicroflora, and blood metabolites were measured. Apparent phytate digestibility was estimated by chromic oxide marker method. The chromic oxide was added in rate of 0.3% ofthediets. Phytate phosphorus was measured by the method of wheeler et al (1971). On day37, level of calcium, phosphorus and cholesterol of serum were measurement by bleeding from wing vein. Left thigh bone was isolated on 42 days and its dimensions and strength were measurement by Caliper and Instron instruments respectively.

Results and Discussion Body weights of deficiency phosphorus treatments showed significant decrease even in presence of recombinant probiotic ($P<0.01$). The use of mixed probiotics in treatments containing both level of available phosphorus showed digestibility of phytate phosphorus around % 20 higher than no probiotic treatments and, the treatments supplemented with *Lactococcuslactis* displayed higher phytate phosphors digestibility around %18 compared to control, although there was no significant difference. The serum phosphorus of chicks fed diets contained mixed probiotics showed an increased trend relation to no probiotic treatments ($P=0.0603$). The mean of thigh bone length was decreased in phosphorus deficiency, diet supplemented with *l.lactis* alone and, no probiotic treatments significantly ($P<0.05$). In 42 days age, lower gram negative bacteria were determined in the flora of chicken's caecum that used probiotic supplement but there was no significant difference. The mix probiotic treatment trends more effective than only *l.lactis* on reduction of gram negative population ($P<0.1$).

The results of this study declared that use of recombinant *Lactococcuslactis* may increase phytate phosphorus digestibility but low level of phytate phosphorus in diets and not enough increase in phytate digestibility didn't supply phosphorus requirement in chicks. Phosphorus level in serum of chickens feed by mixed probiotic bacteria showed that probably presence of lactobacilli accompany to *l.lactis* could improve efficiency of phytate degradation, because lactobacilli activity increased solubility of phytate by acid production and it could exposesphytate to phytase enzyme. Since the ideal activity of produced recombinant phytase is under acidic pH, then lactobacillus bacteria improved condition of intestine for recombinant phytase activity. Considering to the level of phytate P of diet with phosphorus deficient showed that phytase activity couldn't supply P requirement of chickens while the digestibility of phytate P was determined 63%. Therefore lower growth in mentioned treatment was not avoidable. Decrease of the thigh bone length in chickens fed by no probiotic or *l.lactis* treatments reflected low phytase activity and low phytate contain in diet. Also in treatments contain probiotic,

1 ,2- Professor and Assistant professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Iran, respectively.
(*-Corresponding author email: hassbird@yahoo.com)

appropriate bone dimensions (diagonal of epiphyses and diaphysis and length of bone) may attributed to better calcium absorbance in presence of lactic acid bacteria. It is showed that use of probiotic produces short fatty acids in intestine. It can stimulate villi growth and production of calcium binding protein in enterocyte cells. In this study, reduction of gram negative bacteria population were excepted since anti- E.coli and salmonella activity of mix probiotic was showed.

Conclusion Based on this study, it is suggested to develop of phytase gene expression in *Lactococcuslactis*by supplemental study and use of probiotic lactobacilli as same time.

Keywords: Broiler chicks, *Lactococcuslactis*, Phytase, Probiotic, Recombinant.