مقدمه

کلسیم و فسفر دو عنصر معدنی اصلی دخیل در واکنش‌های بیولوژیکی هستند که در رشد و سلامتی طیور از اهمیت بالایی برخوردارند [۷۴]. معمولاً این دو عنصر را به دلیل ارتباط نزدیک سوخت و ساز به ویژه در استخوان‌سازی با هم مورد بحث قرار می‌دهند. با توجه به اهمیت کلسیم و فسفر بر رشد جوجه-های گوشتی هرگونه کمبود آنها در جیره دارای اثرات زیانباری بر سرعت رشد پرنده، توسعه سیستم اسکلتی و تولید خواهد بود [۳ و ۲۶]. انجمن ملی تحقیقات آمریکا [۵۰] حداقل فسفر قابل دسترس مورد نیاز پرنده را در سنین آغازین (۳-۰ هفتگی)، رشد (۶-۳ هفتگی) و پایانی (۸-۶ هفتگی) به ترتیب معادل ۰/۴۵، ۰/۳۵ و ۰/۳۰درصد جیره و میزان کلسیم مورد نیاز را ۱/۰، ۰/۹و ۰/۸درصد از جیره توصیه نموده است. نتایج بررسی‌های انجام گرفته نشان داده‌است که نه تنها مقدار این عناصر باید درجیره کافی باشد، بلکه نسبت آنها نیز باید متعادل باشد. بنابراین می‌توان انتظار داشت که احتیاجات کلسیم جوجه‌های گوشتی با توجه به تغییرات در سطح فسفر جیره تغییر نماید [۷۴]. نتایج تحقیقات انجام گرفته توسط کوتو و همکاران [۲۳] نشان داده است که نسبت کلسیم به فسفر قابل دسترس مورد نیاز جوجه‌های در حال رشد ۲/۲-۲ به ۱ می‌باشد.

فسفر سومین عنصر اصلی در جیره طیور می‌باشد که از لحاظ اقتصادی و محیط زیست از اهمیت ویژه‌ای در تغذیه جوجه‌های گوشتی برخوردار است [۴۰]. نشان داده شده است که میزان ۵۰ تا ۷۰ درصد فسفر منابع گیاهی جیره همانند ذرت به شکل فیتاتی می‌باشد [۳، ۲۱، ۳۹، ۵۴ و ۷۸] که در طیور بدلیل عدم وجود میزان کافی آنزیم فیتاز درون‌زادی قابل دسترس نبوده و یا از قابلیت دسترسی پایینی برخوردار می‌باشد [۶۳]. مولکول اسید فیتیک علاوه بر فسفر با چندین عنصر معدنی دیگر همانند کلسیم، آهن، روی، مس، منیزیم، سدیم، پتاسیم، پروتئین‌ها و مخصوصاً اسیدهای‌آمینه بازی (لیزین، هیستیدین

وآرژنین) و نشاسته تشکیل کیلات[1] داده و در نتیجه قابلیت دسترسی این مواد مغذی را در اقلام گیاهی تشکیل دهنده جیره (غلات و محصولات فرعی دانه‌های روغنی) کاهش و دفع آنها از طریق فضولات را افزایش می‌دهد [۲۲، ۴۰، ۴۷، ۶۰ و ۷۶].

در سال‌های اخیر چندین راهکار برای افزایش کارایی استفاده از بخش فسفر فیتاتی جیره متداول گردیده است [۴۰]، که از جمله این راهکارها می‌توان به تهیه جیره‌های با مقدار فسفر نزدیک به نیاز نگهداری پرنده، توسعه کشت گیاهان اصلاح شده با مقادیر فسفر فیتاتی پایین و افزودن آنزیم فیتاز به جیره اشاره نمود. از بین راهکارهای فوق، استفاده از آنزیم فیتاز مورد استقبال بیشتری قرار گرفته است [۴ و ۷۶]. نتایج تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که استفاده از فیتاز میکروبی نه تنها منجر به کاهش کمپلکس مواد معدنی- فیتات و پروتئین-مواد معدنی خواهد شد، بلکه منجر به بهبود عملکرد و افزایش قابلیت دسترسی فسفر، کلسیم، روی، منیزیم، مس، انرژی قابل متابولیسم ظاهری و قابلیت استفاده از اسید-های‌آمینه خواهدگردید [۹، ۴۰ و ۶۳]. پاسخ جوجه‌های گوشتی به افزودن آنزیم فیتاز به جیره ثابت نبوده و تحت‌تأثیر عوامل دیگری همانند سطح فسفر جیره، سطح ویتامین D_3 و سطح کلسیم جیره قرار دارد [۴۵، ۶۲ و ۸۰]. سطح کلسیم جیره از جمله عوامل مهمی می‌باشد که می‌تواند پاسخ جوجه‌های گوشتی به افزودن آنزیم فیتاز به جیره را تحت‌تأثیر قرار دهد به نحوی که با افزایش سطح کلسیم جیره و یا کاهش سطح فسفر پاسخ به آنزیم فیتاز افزایش می‌یابد [۲۹].

اهداف تحقیق

با توجه به اینکه در بیشتر مطالعات انجام گرفته در رابطه با تعیین اثرات سطح کلسیم جیره بر پاسخ آنزیم فیتاز از جیره‌های دارای سطح پایین فسفر غیر فیتاتی استفاده گردیده است [۲۹] و اثرات مثبت احتمالی فیتاز در بهبود استفاده از سایر مواد مغذی از جمله کلسیم جیره کمتر مد نظر قرار گرفته است، تعیین پاسخ جوجه‌های گوشتی به آنزیم فیتاز در جیره دارای سطح کافی فسفر غیر فیتاتی ولی حاوی سطوح متفاوت کلسیم می‌تواند در بهینه‌سازی استفاده از آنزیم فیتاز حائز اهمیت باشد. بنابراین هدف از انجام این آزمایش عبارت بود از تعیین اثرات کاهش سطح کلسیم جیره بر پاسخ جوجه‌های گوشتی به افزودن سطوح مختلف فیتاز به جیره‌های دارای مقادیر کافی فسفر غیر فیتاتی بود.

1-Chelate

فصل اول
مروری بر پژوهشهای انجام شده

۱-۱-اهمیت کلسیم

کلسیم و فسفر از مهمترین عناصر معدنی تشکیل دهنده استخوان بوده [۱۲] و نقش مهمی را در تشکیل و معدنی‌شدن استخوان‌ها و استحکام سیستم اسکلتی ایفا می‌نمایند. بعلاوه کلسیم در تشکیل لخته خون، انقباضات ماهیچه‌ای و تأمین کیفیت پوسته تخم مرغ به میزان زیادی دخیل می‌باشد [۷۴]. نتایج تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که ارتباط بسیار نزدیکی بین میزان کلسیم و فسفر جیره وجود داشته و سطح هر کدام از آنها در جیره می‌تواند میزان قابلیت استفاده ماده معدنی دیگر را تحت‌تأثیر قرار دهد [۱۲].

بخش عمده منابع کلسیم و فسفر به شکل معدنی بوده و از قابلیت بالایی برای انحلال در شرایط اسیدی برخوردار می‌باشند و به همین دلیل هضم و جذب کلسیم و فسفر به میزان زیادی تحت‌تأثیر pH روده قرار دارد. تغییر سطح کلسیم جیره از طریق تغییر در میزان pH روده می‌تواند به میزان زیادی هضم و جذب کلسیم و فسفر را تحت‌تأثیر قرار دهد [۴۱]. بعلاوه تفاوت در غلظت کلسیم جیره می‌تواند میزان هیدرولیز فسفر فیتاتی در روده کوچک را تحت‌تأثیر قرار دهد. بنابراین می‌توان پیش‌بینی نمود که افزایش غلظت کلسیم جیره می‌تواند با تشکیل کمپلکس نامحلول کلسیم-فیتات موجب کاهش هیدرولیز فسفر فیتاتی به وسیله آنزیم‌های برون‌زادی و درون‌زادی گردد. علاوه بر میزان کلسیم جیره، بالا بودن نسبت کلسیم به فسفر غیر فیتاتی جیره نیز می‌تواند با تشکیل کمپلکس نامحلول کلسیم-فسفر موجب کاهش قابلیت هضم و جذب اشکال محلول مواد معدنی از جمله فسفر گردد. بنابراین برای حصول حداکثر کارایی استفاده از کلسیم و فسفر جیره، توجه به سطح هر کدام از دو ماده معدنی مذکور و همچنین نسبت

بین آنها از اهمیت ویژه‌ای بر خوردار می‌باشد [۵۶]. با توجه به نقش کلسیم در بسیاری از واکنش‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی در بدن و اثر آن بر توسعه سیستم اسکلتی و سلامتی استخوان‌ها، درک متابولیسم و عوامل مؤثر بر میزان نیاز آن از اهمیت کاربردی بالایی برخوردار می‌باشد [۴۱].

۱-۲- تعادل کلسیم در بدن

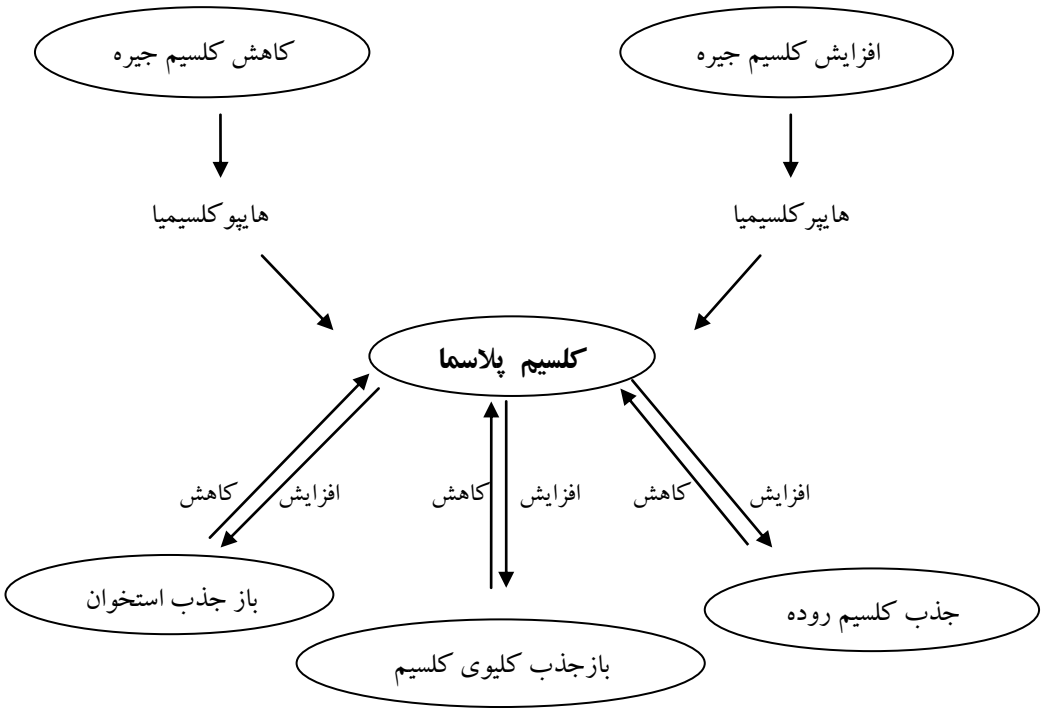
تعادل کلسیم در بدن به وسیله سه هورمون اصلی یعنی پاراتیروئید (PTH[1])،کلسیتونین[2]و۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول[3]یا شکل فعال ویتامین D_3 کنترل می‌گردد. پاراتیروئید عمدتاً با کاهش سطح کلسیم پلاسما و تا حدودی سایر عوامل مانند دی‌هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول تحریک و ترشح می‌شود. اندام‌های اصلی هدف هورمون پاراتیروئید کلیه‌ها و استخوان می‌باشند که موجب افزایش بازجذب استخوان [۵] و تبدیل ۲۵-هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول به ۱، ۲۵ دی هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول با استفاده از آنزیم ۲۵-هیدروکسی‌لاز در کلیه‌ها می‌گردد [۷۲]. ۱، ۲۵ دی هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول توسط بافت مخاطی روده از گردش خون جذب و موجب افزایش جذب کلسیم و انتقال یون‌ها از عرض غشاء سلول های روده‌ای می‌گردد. همچنین۱، ۲۵ دهیدروکسی‌کوله کلسیفرول، ترشح پروتئین باند شونده با کلسیم (کالبیندین[4]) از روده را کنترل می‌نماید [۱]. در هنگام کاهش غلظت کلسیم پلاسما، هورمون پاراتیروئید به همراه دی‌هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول، موجب جابجایی کلسیم و فسفر از سیستم اسکلتی و در نتیجه افزایش غلظت کلسیم پلاسما می‌گردد. از طرف دیگر ۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله‌کلسیفرول با افزایش جذب روده‌ای و باز جذب کلسیم از مجاری کلیوی، موجب افزایش کلسیم پلاسما می‌گردد.

افزایش کلسیم پلاسما منجر به افزایش دفع کلسیم ادراری و کاهش تشکیل ۱، ۲۵ دی هیدروکسی-کوله‌کلسیفرول خواهد گردید و در نتیجه با کاهش جذب کلسیم موجب افزایش معدنی‌شدن استخوان خواهد گردید. غلظت کلسیم پلاسما در هنگام افزایش بیش از نیاز، از طریق افزایش دفع کلسیم از ادرار، کاهش تشکیل ۱و ۲۵ دی هیدروکسی کوله کلسیفرول و در نتیجه کاهش بازده جذب کلسیم و همچنین ممانعت از بازجذب کلسیم از استخوان با افزایش کلسیتونین در سطح طبیعی تنظیم می‌گردد [۷۲].

بطور کلی می‌توان گفت که تعادل و انتقال کلسیم در استخوان، کلیه و روده به وسیله سه هورمون پاراتیروئید، کلسیتونین و ۱، ۲۵ دی هیدروکسی‌کوله کلسیفرول کنترل می‌گردد و تغییرات در میزان

1-Parathyroied Hormone
2-Calcitonine Hormone
3- Dehydro Cholecalciferol Hormone
4 -Calbindin

کلسیم، فسفر و ویتامین D_3 در بدن می‌تواند روی میزان انتقال کلسیم تأثیرگذار باشد [۵]. بعنوان مثال کمبود ویتامین D_3 در بدن می‌تواند موجب کاهش کلسیم پلاسما گردد و یا غلظت کلسیم پلاسما در زمانی که بدن با کمبود فسفر مواجه است افزایش می‌یابد. غلظت ۲۵ دی هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول پلاسما تنها در زمان کمبود ویتامین د کاهش یافته و تحت‌تأثیر کمبود مواد معدنی قرار نمی‌گیرد، اگرچه غلظت ۲۵هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول پلاسما و پروتئین باندکننده کلسیم در زمان کمبود کلسیم، فسفر و کمبود ویتامین د افزایش می‌یابد [۱] اثرات سطح کلسیم مصرفی بر کلسیم پلاسما در شکل ۱-۲ آورده شده است [۷۲].



شکل ۱-۲- اثرات مصرف کلسیم بر هموستازی کلسیم در بدن [۷۲]

۱-۲-۱-جذب کلسیم در بدن

سازگاری جوجه‌های گوشتی به جیره‌های با کمبود برخی از مواد مغذی از دیرباز شناخته شده است. مطالعات نشان می‌دهد پرندگانی که در معرض کمبود این مواد مغذی قرار می‌گیرند تلاش می‌نمایند تا این مواد را با راندمان بالاتری جذب نمایند که این مسئله موجب کاهش دفع از دستگاه گوارش می‌گردد. محققین مشاهده نموده‌اند که جوجه‌های تغذیه شده با کلسیم و فسفر محدود در جیره غذایی، کلسیم رادیوایزوتوپ (^{47}Ca) بیشتری را در مقایسه با جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های فاقد کمبود جذب می-

نمایند، بعلاوه نشان داده شده‌است که میزان آزادی کلسیم رادیوایزوتوپ استخوان‌ها نیز در سنین بالاتر کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد عادت‌پذیری به محدودیت تغذیه کلسیم و فسفر در نتیجه افزایش غلظت ۱، ۲۵ دی هیدروکسی کوله‌کلسیفرول و میزان کالبیندین در دئودنوم دلیل این مشاهدات باشد [۴].

نشان داده شده است که اغلب ترکیبات کلسیم در بدن نامحلول بوده و حلالیت آنها تحت‌تأثیر عواملی همانند تغییر در pH قرار می‌گیرد. با توجه به اینکه شرایط اسیدی جذب کلسیم را افزایش و شرایط قلیایی جذب آن را کاهش خواهد داد [۵۱]، استخوان‌ها در حیوانات مواجه با کمبود کلسیم بشدت از کلسیم تخلیه شده و میزان کلسیم آنها تقریباً به نصف تقلیل می‌یابد. هنگام کاهش کلسیم پلاسما، هورمون پاراتیروئید برداشت کلسیم از استخوان‌ها را تحریک نموده و موجب افزایش بازجذب کلیوی کلسیم می‌شود. هورمون پاراتیروئید همچنین تولید ۱ و ۲۵-دی‌هیدروکسی ویتامین D_3 در کلیه را تحریک نموده که موجب افزایش بازجذب کلیوی و جذب روده‌ای کلسیم می‌شود. مقدار پائین فسفر پلاسما نیز موجب تولید ۱ و ۲۵-دی‌هیدروکسی D_3 و برداشت بیشتر کلسیم از استخوان می‌شود [۱ و ۵]. ازاین‌رو هنگامیکه غلظت این مواد معدنی در جیره بیش از حد افزایش یابد به صورت کمپلکس کلسیم-فسفات رسوب نموده که در شرایط اسیدی دئودنوم نامحلول و در نتیجه ترشح هورمون پاراتیروئید کاهش و غلظت یون کلسیم در پلاسما افزایش می‌یابد. اثرات این کاهش ذخیره فسفر (به وسیله کاهش هورمون ممانعت کننده پاراتیروئید و کاهش بازجذب فسفات کلیوی) اجازه می‌دهد که همراه با کاهش فسفر جیره جذب کلسیم از روده به طور قابل توجه کاهش یابد. در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح کلسیم بالا و فسفر با قابلیت دسترس پایین و سطوح بالاتر ویتامین د (عامل اتصال کلسیم به پروتئین باند کننده) نسبت به جوجه‌هایی‌که جیره با سطوح فسفر قابل دسترس نرمال وکلسیم بالا مصرف نمودند، سرعت جذب کلسیم روده‌ای بالاتر خواهد بود [۷۲]. نتایج تحقیقات انجام گرفته نشان داده است که جذب کلسیم در روده تحت‌تأثیر سایر عوامل وابسته به جیره همانند افزودن آنزیم فیتاز [۱۵]، سطح چربی جیره و غیره قرار دارد [۷۷]. ناتان و همکاران [۱۵] گزارش کردند که با افزودن آنزیم فیتاز به جیره، جذب و ذخیره کلسیم افزایش خواهد یافت. بنابراین تعیین سطح مناسب استفاده از آنزیم فیتاز بر قابلیت دسترسی کلسیم بسیار حائز اهمیت است.

نتایج آزمایشات انجام گرفته نشان داده است که ذخیره کلسیم در بدن تحت‌تأثیر عوامل زیادی از جمله سطح کلسیم، فسفر و افزودن فیتاز به جیره قرار دارد [۲۳]. نشان داده شده است که جیره حاوی سطوح پایین کلسیم موجب ذخیره شکل پایدارتر کلسیم در بدن و تمایل به کاهش دفع آن به ویژه در

پرندگان مسن می‌گردد. در این مطالعات مقایسه میزان کالبیندین و نوع تغییرات آن نشان داده شده است که جوجه‌های گوشتی امروزی از سازگاری بالایی به جیره‌های با سطوح پایین کلسیم و فسفر برخوردار می‌باشند [۴]. ذخیره کلسیم دارای رابطه غیر خطی با مصرف خوراک می‌باشد، ولی ذخیره فسفر دارای ارتباط خطی با مصرف آن می‌باشد. این نتایج می‌تواند بیانگر این باشد که نسبت کلسیم ذخیره شده به کلسیم و فسفر جذب شده احتمالاً با افزایش مصرف هر دو ماده معدنی کاهش می‌یابد [۷۰]. تامیم و همکاران [۷۶] نیز نشان داده‌اند که افزایش سطح کلسیم جیره موجب کاهش جذب کلسیم از ۴۶/۳ به ۳۳/۶ و کاهش جذب فسفر از ۶۷/۹ به ۲۹/۴ درصد می‌گردد.

۱-۲-۲-دفع کلسیم از بدن

کلسیم و فسفر مصرفی در اسید معده قابل حل شدن می‌باشند، ولی در هنگام مصرف مقادیر مازاد از طریق جیره در دئودنوم به صورت فسفات کلسیم رسوب خواهند نمود [۷۲].کلسیم مازاد در روده به صورت فسفات کلسیم ($Ca_3(PO_4)_2$) نامحلول رسوب نموده و در نتیجه منجر به کاهش فسفات کلسیم در بدن می‌گردد [۵]. اگرچه دفع کلسیم از طریق مدفوع تابع سطح مصرف کلسیم جیره به فسفر و متابولیت‌های ویتامین D_3 نیز قرار دارد [۲۳]، ولی هنگامیکه منبع فسفر جیره قابلیت دسترسی کمی داشته باشد نیاز ویتامین D_3 بیشتر خواهد شد [۱]. نشان داده شده است که افزایش سطح کلسیم جیره اثر معنی-داری بر کاهش سطوح فسفر محلول در آب و نسبت فسفر محلول در آب به فسفر کل دارد، که این وضعیت با افزایش نسبت کلسیم به فسفر جیره از ۲ به ۱ به ۲/۲ به ۱ و یا ۲/۴ به ۱ به میزان زیادی تشدید می‌گردد. مصرف کلسیم بیش از نیاز نیز موجب کاهش رشد، کاهش راندمان مصرف خوراک و افزایش خاکستر و کشش‌پذیری استخوان می‌گردد [۲۳]. افزایش سطح جیره‌ای فسفر نیز موجب کاهش قابلیت دسترسی کلسیم در روده می‌گردد که این از طریق تحریک هورمون پاراتیروئید و در نتیجه افزایش بازجذب کلسیم از استخوان موجب کاهش خاکستر استخوان می‌گردد. کوتو و همکاران [۲۳] نشان داده-اند که افزودن ۲۵ هیدروکسی کوله کلسیفرول در جیره، موجب کاهش فسفر کل و کلسیم در مواد دفعی جوجه‌های گوشتی می‌گردد.

۱-۲-۳- دفع ادراری کلسیم

دفع ادراری کلسیم تابع سطح کلسیم پلاسما می‌باشد. افزایش سطح کلسیم پلاسما موجب افزایش دفع ادراری آن می‌گردد. در این شرایط تشکیل ۱، ۲۵ دی‌هیدروکسی کوله‌کلسیفرول از طریق کاهش بازده

جذب کلسیم کاهش خواهد یافت و کلسیتونین از بازجذب استخوان جلوگیری نموده و میزان کلسیم آزاد شده را کاهش می‌دهد [۱ و۵]. نتایج تحقیقات انجام گرفته بر روی اثرات سطوح کلسیم و فسفر قابل دسترس جیره بر میزان دفع کلسیم ادراری یکسان نمی‌باشد. نشان داده شده است که در جوجه‌های تغذیه شده با سطوح کلسیم بالا و فسفر قابل دسترس پایین، جذب کلسیم روده‌ای و دفع کلسیم ادراری افزایش می‌یابد، که تنها حدود ۵ تا ۱۰ درصد آن از کلیه‌ها بازجذب می‌گردد. علاوه براین با افزایش ترشح **۱، ۲۵** دی‌هیدروکسی‌کوله کلسیفرولاز از ترشح غده‌های پاراتیروئید جلوگیری نموده و در نتیجه دفع کلسیم ادراری را افزایش می‌دهد [۷۲].

شافی [۷۲] گزارش نموده است که افزایش سطح فسفر جیره، قابلیت دسترسی کلسیم در دیواره روده را کاهش و ترشح پاراتیروئید را افزایش می‌دهد که این موجب افزایش بازجذب استخوان و در نتیجه کاهش خاکستر استخوان می‌گردد. جیره حاوی سطوح کلسیم بالا و فسفر با قابلیت دسترسی پائین، با افزایش ترشح **۱، ۲۵** دهیدروکسی‌کوله کلسیفرول از ترشح غده‌های پاراتیروئید ممانعت نموده و دفع کلسیم ادراری را افزایش می‌دهد. آنسر و همکاران [۱۲] نیز گزارش نمودند که تغذیه جوجه‌های گوشتی با سه جیره به ترتیب حاوی نسبت کلسیم به فسفر ۱ به ۰/۵ (شاهد)، ۲ به ۰/۵ و ۳ به ۰/۵ موجب افزایش کلسیم و فسفر سرم و همچنین افزایش میانگین وزن کلیه نسبت به بدن در مقایسه با گروه شاهد گردید. در این آزمایش سیستم بدن پرندگان دچار آسیب‌های التهابی و منجر به تغییر رنگ، شکل، اندازه کلیه و مجرای ادراری گردیدند.

۱-۳- وظایف فیزیولوژیک کلسیم در بدن

از جمله وظایف کلسیم در فرایندهای بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی در بدن انسان و حیوان که در تحقیقات به طور گسترده بررسی شده است، می‌توان مواردی همانند ایجاد لخته، انقباض ماهیچه، انتقال ایمپالس‌های عصبی و پاسخ‌های هورمونی یا آزادکردن هیستامین از ماست‌سل‌ها [۸۳]، تشکیل استخوان و معدنی‌شدن آن و همچنین تأیین مقاومت اسکلتی را نام برد [۲۶]. در این بخش تلاش گردیده است وظایف کلسیم در استخوان‌سازی و همچنین در بافت‌های نرم بدن بطور اختصار مورد اشاره قرار گیرد.

۱-۳-۱- نقش کلسیم در استخوان سازی

وضعیت استخوان به طورعمومی به عنوان یک شاخص مهم در ارزیابی وضعیت کلسیم و فسفر جیره محسوب می‌گردد. کلسیم و فسفر از جمله مواد معدنی اصلی تشکیل دهنده ماتریکس استخوان می‌باشند

[۵۳]، به نحوی که بیش از ۹۹ درصد کلسیم و ۸۰ درصد فسفر در اسکلت یافت می‌شود. بعلاوه هورمون پاراتیروئید و هورمون‌های جنسی در معدنی‌شدن استخوان و سخت‌شدن منطقه رشد (پل‌های اپیفیزیال) نقش مهمی را ایفا می‌نمایند. علاوه بر این وجود و یا عدم وجود ویتامین د از اهمیت زیادی در جذب و استفاده از کلسیم در تشکیل استخوان برخوردار می‌باشد [۴۸].

با توجه به اینکه بروز ناهنجاری‌های استخوانی خسارات سالیانه زیادی را به پرورش‌دهنده گان جوجه-های گوشتی تحمیل می‌نماید، تلاش‌های زیادی در جهت شناخت مشکلات مربوطه و یافتن راه حل کاهش آنها در حال انجام می‌باشد. علل رشد غیر طبیعی استخوان بسیار پیچیده بوده و عوامل گوناگونی در آن تأثیرگذار می‌باشد که از جمله می‌توان به کمبود یا مازاد مواد معدنی (همانند کلسیم و فسفر)، سطح و یا نسبت نامناسب کلسیم به فسفر، سطح ویتامینD_3 جیره و غیره اشاره نمود. راما رائو و همکاران [۵۳] نشان داده‌اند که کاهش میزان معدنی‌شدن استخوان موجب کاهش قدرت کشش پذیری استخوان و افزایش احتمال شکستگی آن می‌گردد. از طرف دیگر نشان داده شده است که استخوان‌سازی ضعیف موجب کاهش مصرف خوراک و در نتیجه کاهش مقدار افزایش وزن، کاهش تعداد وکیفیت تخم مرغ در مرغان تخم‌گذار خواهد گردید.

۱-۳-۲- نقش کلسیم در بافت‌های نرم بدن

کلسیم علاوه بر داشتن نقش در توسعه استخوان، همچنین در تشکیل لخته خون، انقباضات ماهیچه و تأمین کیفیت پوسته تخم از اهمیت بسیار زیادی برخوردار می‌باشد [۲۶]. حدود یک درصد (۵۱۰ میلی-گرم) کلسیم و ۲۰ درصد فسفر در بافت‌های نرم بدن یافت می‌گردد، که در بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی بدن دخیل می‌باشند. بعلاوه درصد کمی از کلسیم و فسفر بدن در خون وجود دارد. با توجه به نقش مهم این عناصر در بسیاری از واکنش‌های مستلزم دخالت در اسیدهای نوکلئیک و فسفولیپیدها و تنظیم فعالیت ماهیچه‌ای قلبی-اسکلتی، فعالیت سایر آنزیم‌ها، انتقال ایمپالس‌های عصبی، کنترل پروتئین-های ناقل غشاء، حفظ فشار اسمزی، pH و غیره، اطمینان از وجود مقادیر کافی این عنصر در جیره جوجه‌های گوشتی بسیار ضروری می‌باشد. علاوه بر مقدار کلسیم، تعادل کلسیم و فسفر برای عملکرد بهینه بسیاری از واکنش‌های بیوشیمیایی در بدن ضروری می‌باشد. زیرا در واکنش‌هایی که نسبت کلسیم و فسفر در نسبت بهینه حفظ گردد، مکانیسم‌های متفاوت فیزیولوژیکی شامل ترشح و دفع و بازجذب به خوبی انجام خواهد گرفت. از این رو عدم تعادل این مواد معدنی در جیره منجر به عوارض متفاوت

پاتولوژیکی شامل اختلالات کلیوی و توسعه نقرس در جوجه‌های گوشتی می‌گردد. نشان داده شده است زمانیکه غلظت کلسیم جیره بالاتر از معمول باشد منجر به ایجاد نفریت و نقرس احشایی در جوجه‌های گوشتی می‌گردد [۱۲]. عبدالرحمان و همکاران [۱۱] گزارش کردند که افزایش سطح کلسیم جیره در طول دوره پرورش به دلیل ایجاد تغییرات در ترمیم بافت های مختلف بدن و تشکیل سنگ‌های اورولیت در بافت‌های کلیوی، موجب دفع ازت به شکل اوره در جوجه‌های گوشتی خواهد شد.

۱-٤- قابلیت دسترسی منابع کلسیم

بطور کلی منابع کلسیم موجود در جیره را می‌توان به دو بخش معدنی و آلی تقسیم‌بندی نمود. با توجه به اینکه قابلیت دسترسی منابع کلسیم و فسفر در جیره طیور متفاوت می‌باشد، بنابراین نوع منبع کلسیم و فسفر موجود در جیره بر روی جذب و استفاده از کلسیم جیره تأثیرگذار می‌باشد. منابع کلسیم موجود در جیره را از نظر خصوصیات شیمیایی می‌توان به دو بخش معدنی و آلی تقسیم بندی نمود که از نظر خصوصیات فیزیکی–شیمیایی با همدیگر تفاوت دارند [۳]. از جمله منابع آلی کلسیم در جیره می‌توان به کلسیم موجود در پودر گوشت و ماهی و تعدادی دیگر از اقلام خوراکی اشاره نمود. از جمله منابع معدنی کلسیم جیره می‌توان به مکمل‌های معدنی اشاره نمود که ۸۰ تا ۸۵ درصد کلسیم جیره را تأمین نموده و از اهمیت بیشتری در مقایسه با منابع آلی برخوردار می‌باشند. منابع معدنی اغلب به شکل فسفات و کربنات بوده و شامل سنگ‌آهک[1]، سنگ‌گچ[2]، سنگ فسفات[3]،گلوکونات کلسیم[4]، دی‌کلسیم‌فسفات و غیره می‌باشند [۷۲]. نشان داده شده است که منابع پودر استخوان و دولومیت در جوجه‌های گوشتی در مقایسه با سایر منابع از قابلیت دسترسی بالاتری برخوردار می‌باشند. در برخی مناطق از پوسته صدف به عنوان منبع اصلی کلسیم در جیره جوجه‌های گوشتی استفاده می‌شود و استفاده از خرده های سنگ آهک حاصل از استخراج سنگ آهک از معادن به میزان کمتری مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از سنگ آهک در جیره تنها در صورت پایین بودن ناخالصی‌هایی مانند منیزیم و فلوئور مناسب می‌باشد. سنگ آهک در مقایسه با پوسته صدف به دلیل عدم وجود ناخالصی هایی مانند شن و ماسه دارای کلسیم بیشتری می‌باشد [۳]. نتایج آزمایشات انجام گرفته نشان داده است که میزان قابلیت دسترسی منابع مختلف کلسیم همانندکربنات کلسیم ($CaCO_3$)، سیترات (CC)، سیترات–مالات (CCM) و پوسته صدف در

1- Limestone
2- Gypsum
3 - Rock phosphate
4 - Calcium gluconate

انسان و حیونات مشابه می‌باشند، اگرچه در تعدادی از مطالعات قابلیت دسترسی این منابع از سایر منابع کلسیم تا حدودی بالاتر می‌باشد [۱۵].

۱-۵- احتیاجات کلسیم

نتایج آزمایش‌های انجام گرفته نشان داده است که احتیاجات کلسیم جوجه‌گوشتی متفاوت بوده و تابع عوامل زیادی همانند سویه پرنده، سن، منبع مکمل کلسیم و قابلیت دسترسی آن می‌باشد. از طرف دیگر در هنگام تعیین احتیاجات کلسیم پرنده بایستی سایر عوامل همانند آسایش پرنده و تعادل میکروفلور روده‌ای را بدلیل نقش کلسیم روی pH دستگاه گوارش و در نتیجه قابلیت هضم و جذب سایر مواد مغذی مورد توجه قرار داد [۴۱]. با توجه به اینکه میزان کلسیم مورد نیاز تابع سایر عوامل می‌باشد، بیان مقادیر کلسیم مورد نیاز بصورت یک عدد مطلق غیر ممکن بوده و در هنگام بیان احتیاجات بایستی سایر شرایط و مخصوصاً سطح فسفر جیره را مورد توجه قرار داد. اگرچه انجمن ملی تحقیقات امریکا [۵۰] میزان کلسیم مورد نیاز جوجه‌های گوشتی را در مراحل آغازین و رشد و پایانی به ترتیب معادل ۱/۰ ، ۰/۹ و ۰/۸ درصد جیره بیان نموده است، تعدادی از منابع میزان کلسیم مورد نیاز را با توجه به سن و شرایط پرنده در حدود ۰/۶ تا ۱/۲ درصد از جیره بیان نموده اند [۷۵]. بعنوان مثال راما رائو و همکاران [۶۱] میزان کلسیم مورد نیاز جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین جهت رشد بهینه، بازده خوراک و معدنی شدن استخوان را ۰/۶ درصد بیان نموده‌اند. در بسیاری از مطالعات انجام گرفته نشان داده شد که مقدار کلسیم احتمالاً حداقل ۲۰ درصد از مقادیر پیشنهاد شده توسط نشریات انجمن ملی تحقیقات امریکا [۵۰] کمتر می باشد، که عمدتاً در ارتباط با کاهش یافتن زمان رسیدن به وزن بلوغ و همچنین بهبود مقادیر ضریب تبدیل خوراک و بطور کلی بازده بالاتر جوجه‌های گوشتی امروزی در مقایسه با سال‌های گذشته می‌باشد [۳۱]. در این بخش تلاش گردیده است بطور مختصر عوامل مؤثر بر احتیاجات کلسیم جوجه‌های گوشتی مورد بحث و بررسی قرار گیرند.

۱-۵-۱- سویه پرنده

سویه پرنده از جمله عوامل مؤثر بر میزان احتیاجات کلسیم می‌باشد، که نقش آن عمدتاً در ارتباط با تفاوت در سرعت رشد و در نتیجه بازده استفاده از خوراک می‌باشد. سویه‌های تجاری جوجه‌گوشتی امروز نسبت به سویه‌های گذشته از لحاظ رشد، ضریب تبدیل خوراک، مصرف مواد مغذی و کیفیت لاشه متفاوت بوده و در نتیجه میزان کلسیم مورد نیاز آنها در مقایسه با سویه‌های قدیمی‌تر بدلیل بالاتر

بودن کارایی جذب و ذخیره مواد مغذی تا حدودی پایین‌تر می‌باشد، اگرچه میزان مطلق کلسیم مورد نیاز آنها در دوره زمانی معین در مقایسه با سویه‌های دارای سرعت رشد پائین‌تر، بیشتر می‌باشد [۲۸].

۱-۵-۲- مرحله فیزیولوژیکی

مرحله فیزیولوژیکی نیز از جمله عوامل مؤثر بر میزان احتیاجات کلسیم طیور می‌باشد، به نحوی که انتظار می‌رود میزان کلسیم مورد نیاز پرنده با توجه به مراحل تکاملی سیستم اسکلتی پرنده متفاوت باشد. نتایج مطالعات انجام گرفته نشان داده است که با افزایش سن پرنده و کامل شدن مراحل تکامل سیستم اسکلتی از میزان حساسیت پرنده نسبت به پائین بودن سطح کلسیم جیره کاسته می‌شود [۲۱].

۱-۵-۳- جنسیت پرنده

تحقیقات انجام گرفته درباره احتیاجات کلسیم جوجه‌های گوشتی نشان داده است که میزان کلسیم مورد نیاز می‌تواند تحت‌تأثیر جنسیت پرنده مورد آزمایش قرار گیرد [۲۸]. درایور و همکاران [۳۱] در آزمایشی روی جوجه‌های گوشتی در دوره سنی ۱تا ۱۶ روزگی و استفاده از سطوح مختلف کلسیم ۰/۳۲۵، ۰/۴، ۰/۴۷۵، ۰/۵۵، ۰/۶۲۵ و ۰/۹ درصد و سطح ثابت فسفر غیر فیتاتی ۰/۴۵ درصد نشان داده‌اند که میزان افزایش وزن بدن به طور خطی با استفاده از سطوح ۰/۵۵ درصد و ۰/۶۲۵ درصد کلسیم در جیره به ترتیب برای نرها و ماده ها افزایش می‌یابد. در هر دو جنس ضریب تبدیل خوراک به طور خطی با افزایش کلسیم جیره به بیش از ۰/۶۲۵ درصد، و میزان کلسیم و خاکستر درشت‌نی نیز با افزایش میزان کلسیم جیره به بیش از ۰/۹ درصد کاهش یافت. در این آزمایش اثرات متقابل بین جنسیت و سطوح پروتئین و سطوح کلسیم جیره بر روی وزن بدن و مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک و درصد خاکستر درشت‌نی معنی‌دار نبود.

۱-۵-۴- سطح ویتامین د جیره

ویتامین D_3 یا کوله‌کلسیفرول در تغذیه طیور از اهمیت زیادی در تنظیم متابولیسم کلسیم و فسفر برخوردار بوده و بازجذب یون‌های کلسیم از دیواره روده را افزایش داده و بر روی متابولیسم استخوان تأثیر می‌گذارد [۶۹]. بعلاوه کوله‌کلسیفرول میزان استفاده از فسفر فیتاتی را با افزایش سنتز یا فعالیت آنزیم فیتاز، هیدرولیز فیتات و جذب کلسیم و فسفر افزایش می‌دهد [۶۰]. میزان ۲۵ هیدروکسی‌کوله کلسیفرول پلاسما و پروتئین باندکننده کلسیم در زمان کمبود مواد معدنی جیره تغییر نمی‌کند، ولی با

کمبود ویتامین د کاهش می‌یابد [۷۲]. میزان احتیاجات کوله‌کلسیفرول جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با جیره حاوی سطوح کافی کلسیم و فسفر غیر فیتاتی حدود ۲۰۰ تا ۵۰۰ واحد بر کیلوگرم می‌باشد، ولی گزارشات نشان می‌دهد که احتیاجات کوله‌کلسیفرول در جیره حاوی سطوح بالاتر از معمول کلسیم و فسفر افزایش می‌یابد و با توجه به اینکه کوله‌کلسیفرول استفاده از کلسیم و فسفر را افزایش می‌دهد می‌توان انتظار داشت که سطح کلسیم و فسفر مورد نیاز جیره با افزایش سطح ویتامین د جیره کاهش یابد [۶۰]. علاوه بر سطح ویتامین D_3 جیره، نوع متابولیت‌های ویتامین D_3 موجود در جیره نیز از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد. نشان داده شده است که با استفاده از مشتقات ویتامین د، همانند ۱، ۲۵ دی‌هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول یا ۲۵-هیدروکسی‌کوله‌کلسیفرول می‌تواند میزان استفاده از فسفر فیتاتی جیره را افزایش دهد. با توجه به اینکه دو عنصرکلسیم و فسفر از ارتباط بسیار نزدیکی با یکدیگر برخوردار می‌باشند و کمبود و مازاد هر یک از آنها در استفاده یا مقادیر احتیاجات دیگری تداخل می‌نماید، توجه به سطح فسفر جیره در هنگام بیان احتیاجات کلسیم از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. نشان داده شده است که تأمین نسبت کلسیم به فسفر حدود ۲ به ۱ برای حصول بهینه عملکرد و واکنش‌های متفاوت بدن که این دو ماده معدنی در آن‌ها حضور دارند ضروری می‌باشد [۱۲و۵۳].

۱-۵-۵- سطح فسفر جیره

فسفر دومین عنصر فراوان در بدن حیوانات‌تک‌معده‌ای می‌باشد که حدود ۸۰ درصد آن در ساختمان اسکلتی و باقی آن درمایعات و بافت‌های نرم بدن قرار دارد، که از اهمیت زیادی در مسیرهای فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بدن برخوردار می‌باشد به نحوی که با کاهش یا کمبود سطح فسفر جیره، مصرف خوراک سریعاً کاهش می‌یابد. نتایج مطالعات انجام گرفته نشان داده است که کمبود فسفر جیره ضمن کاهش مصرف خوراک موجب کاهش وزن بدن و خاکستر استخوان و افزایش مقادیر ضریب تبدیل خوراک می‌گردد [۵۱].

با توجه به اینکه بخش اعظم فسفر موجود در منابع گیاهی جیره به صورت متصل به اسید فیتیک بوده و قابلیت دسترسی آن نامشخص می‌باشد، برآورد سطح فسفر قابل دسترس جیره تا حدودی مشکل می‌باشد. بعنوان مثال اگرچه میزان میزان فسفر کل موجود در ذرت حدود ۰/۲۸ درصد می‌باشد، ولی شواهد نشان می‌دهد که تنها ۰/۰۸ درصد از فسفر موجود در ذرت برای پرنده قابل دسترس می‌باشد. فیتات موجود در اقلام گیاهی جیره علاوه بر کاهش قابلیت دسترسی فسفر جیره می‌تواند از طریق برقراری

اتصالات کوالانسی با سایر مواد مغذی و معدنی از جمله اسیدهای‌آمینه، نشاسته، کلسیم، روی و غیره موجب پایین آوردن میزان قابلیت دسترسی آنها در جیره نیز گردد. در طی سالیان گذشته استفاده از آنزیم فیتاز جهت شکستن اتصالات مربوطه و آزاد سازی فسفر و سایر مواد مغذی باند شده به مولکول فیتات بخوبی اثبات گردیده است [۲۱، ۴۰، ۶۰ و۷۶].

۱-۵-٦- استفاده از آنزیم فیتاز در جیره

اگرچه تحقیقات اولیه درباره کاربرد فیتاز در تغذیه حیوانات مربوط به حدود ۴۰ سال گذشته می باشد، اما کاربرد گسترده ی آن در تغذیه طیور به دهه گذشته بر می‌گردد [۴۴]. نتایج آزمایشات اولیه انجام گرفته روی فیتاز تولید شده از محیط کشت حاوی آسپرژیلوس بیانگر توانایی این آنزیم در افزایش قابل ملاحظه‌ی درصد خاکستر استخوان در جوجه‌های تغذیه شده با جیره فاقد فسفات معدنی بود. نتایج این آزمایش نشان داد که افزودن آنزیم فیتاز به جیره، جوجه‌های گوشتی را قادر می‌سازد که از بخش فسفر فیتاتی جیره به خوبی منابع معدنی فسفر استفاده نمایند [۷۵]. نتایج تحقیقات بعدی همچنین نشان داد که افزودن آنزیم فیتاز به جیره بر پایه منابع گیاهی می‌تواند موجب افزایش قابلیت دسترسی کلسیم جیره نیز گردد [۱۵]. نتایج آزمایش‌های انجام گرفته در طی سالیان گذشته نشان داده است که بخش عمده فسفر موجود در منابع گیاهی جیره به شکل فیتاتی می‌باشد که تنها در حدود ۳۳ درصد آن برای جوجه-های گوشتی قابل دسترس می‌باشد.

مولکول اسید فیتیک قادر است که علاوه بر فسفر با سایر مواد مغذی جیره همانند اسیدهای آمینه، نشاسته، کلسیم، روی و غیره نیز پیوند برقرار نماید و موجبات کاهش قابلیت دسترسی آنها را فراهم نماید. افزودن آنزیم فیتاز به جیره با شکستن پیوندهای موجود موجب آزادسازی فسفر و سایر مواد معدنی متصل شده به مولکول اسیدفیتیک می‌گردد و در نتیجه ضمن افزایش قابلیت جذب آنها موجب بهبود عملکرد نیز می‌گردد [۲، ۳ و۲۲]. اگرچه کارایی استفاده از آنزیم فیتاز در بهبود استفاده از فسفر و سایر مواد معدنی جیره بخوبی به اثبات رسیده است [۲۱، ۴۶ ، ۵۴ و ۵۷]، اما شواهد نشان می‌دهد که کارایی استفاده از این آنزیم تا حدود زیادی تحت‌تأثیر نوع غله مورد استفاده [۳۷]، سطح فسفر [۴۰] و سطح فیتاز مورد استفاده در جیره [۱] قرار دارد. آنزیم فیتاز علاوه بر آزادسازی فسفر و سایر مواد معدنی باند شده همانند کلسیم، پروتئین، اسیدهای آمینه و غیره موجب کاهش اثرات زیست محیطی دفع مقادیر مازاد این مواد مغذی از طریق فضولات نیز می‌گردد. با توجه به اهمیت نسبت مناسب کلسیم به فسفر در جیره، توجه به

سطح فسفر فیتاتی جیره و یا استفاده از آنزیم فیتاز در جیره در هنگام تعیین کلسیم مورد نیاز جوجه‌های گوشتی از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد [۳ و۴۴]. لیتیم و همکاران [۴۳]گزارش کرده اند که یک رابطه خطی بین فسفر محلول در آب همراه با کلسیم جیره و مقدار دفع فسفر فیتاتی وجود دارد. کوتو و همکاران [۲۳] نیز گزارش کرده اند که به دلیل تشکیل کمپلکس کلسیم-فسفات، افزایش سطوح کلسیم جیره، قابلیت حل فسفر معدنی را کاهش خواهد داد. شیخلر و همکاران [۷۳] گزارش کردند که نسبت-های مختلف کلسیم به فسفر کل، بر عملکرد و ذخیره مواد معدنی و فسفر فیتاتی در بلدرچین های ژاپنی از سن ۱ تا ۲۱ روزگی دارای اثرات متفاوتی می‌باشد.

فصل دوم
مواد و روش‌ها

۲-۱- جایگاه آزمایش

این آزمایش در زمستان سال ۱۳۸۹ شمسی در محل سالن تحقیقاتی تغذیه جوجه‌های گوشتی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان واقع در شهرستان سنندج، استان کردستان انجام گرفت. سالن آزمایش در ابعاد ۲۷×۹ به وسیله توری‌های فلزی به ۹۰ قفس بستری یا واحد آزمایشی به ابعاد یکسان ۱/۰×۱/۴ متر تقسیم‌بندی شده بود که مجموعاً ۴۸ جایگاه آن برای انجام این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- آماده کردن سالن آزمایش

به منظور آماده سازی سالن، ابتدا کلیه تجهیزات از قبیل توری‌های فلزی، دانخوری‌ها، آبخوری‌ها و سطل‌های خوراک از سالن خارج شدند و بعد از شستشوی کامل با محلول ضدعفونی‌کننده جرمی‌ساید[۱] (با غلظت یک لیتر در ۲۰۰ لیتر آب) ضدعفونی گردیدند. سپس سالن با استفاده از توری‌های فلزی به ۹۰ واحد آزمایشی تقسیم و آبخوری‌های زنگوله‌ای اتوماتیک (جامبو) و دانخوری در هر کدام از واحدها نصب و تنظیم گردید. گرمای مورد نیاز سالن با استفاده از یک بخاری اتوماتیک در وسط سالن و دو عدد بخاری پلار در دو طرف سالن تأمین گردید. از تراشه چوب به عنوان بستر به ارتفاع پنج الی هفت سانتی-متر استفاده گردید. ضد عفونی نهایی سالن با استفاده از آجرهای تجاری فرمان[۲] (حاوی ترکیبی از اگزیمتلین، پرکننده مواد اکسیدکننده و کاتالیزکننده) به تعداد سه عدد برای تمام سالن انجام گرفت و پس از دو روز از گازدهی با بازکردن تعدادی از هواکش‌ها و پنجره‌ها سالن هوادهی گردید. دمای سالن

۱- محصول شرکت فاضل درخشان (مخلوطی از ترکیبات پراکسید، سورفکتانت، اسیدهای ارگانیک و بافرهای غیر ارگانیک)

۲- شرکت دامیار جامع، قزوین، شهرک صنعتی لیا، بلوار تکنولوژی برتر، خیابان صانع

دو روز قبل از ورود جوجه‌ها تنظیم گردید. ساعاتی قبل از ورود جوجه‌ها، ظروف آبخوری کله‌قندی با الکترولیت[1] به میزان ۳۰ گرم در ۱۰۰۰ لیتر آب پر و در داخل هر کدام از واحدهای آزمایشی قرار داده شد. رطوبت سالن با استفاده از مه‌پاش به طور روزانه و در محدوده ۶۰ تا ۷۰ درصد نگهداری گردید. دمای سالن در روز اول آزمایش ۳۲ درجه و بصورت هفتگی به میزان سه درجه کاهش یافت تا در نهایت در دمای ۲۱-۲۲ درجه سانتی‌گراد ثابت گردید. در هفته اول آزمایش از سینی‌های پلاستیکی به‌عنوان دانخوری و آبخوری‌های کله قندی استفاده شد. روشنایی سالن به وسیله سه ردیف لامپ ۱۰۰ وات به فاصله تقریباً سه متر از همدیگر و هشت عدد در هر ردیف و ارتفاع ۲/۵ متر از کف سالن تأمین گردید. برنامه نوردهی سالن به صورت۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی تنظیم گردید. تهویه سالن به وسیله هشت عدد هواکش واقع در ضلع جنوبی سالن و به صورت عرضی انجام گرفت.

۲-۳- جوجه های مورد استفاده

آزمایش روی جوجه‌های گوشتی سویه راس۳۰۸ [۱۴] انجام گرفت. تعداد ۶۲۴ قطعه جوجه یک روزه (به تفکیک جنسیت) از شرکت صنعتی ثابت گیلان[2] خریداری شد. جوجه‌ها به طور تصادفی و در گروه‌های ۱۳ قطعه‌ای در داخل ۴۸ جایگاه بستری توزیع گردیدند، به نحوی‌که برای هر گروه آزمایشی چهار تکرار جوجه یک روزه جنس نر و چهار تکرار جوجه یک روزه جنس ماده در نظر گرفته شد. برنامه واکسیناسیون جوجه‌ها بر اساس توصیه دامپزشک و مطابق جدول ۲-۱ انجام گرفت. برای انجام واکسیناسیون به روش آشامیدنی، ابتدا به مدت دو ساعت تشنگی اعمال و سپس واکسن در اختیار آنها قرار گرفت. در هر نوبت به منظور جلوگیری از تنش پس از واکسیناسیون، از محلول مولتی ویتامین به همراه الکترولیت به آب آشامیدنی جوجه‌ها با (نسبت ۳/۶ گرم در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب) اضافه گردید.

۱- هر گرم از ترکیب مولتی ویتامین با الکترولیت حاوی: ۱۵۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۵ میلی‌گرم ویتامین E، ۳ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۵/۵ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۳ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۳۰ میلی‌گرم نیاسین، ۳۰ میکروگرم ویتامین B_{12} ، ۰/۶ میلی‌گرم اسیدفولیک، ۰/۲ میلی‌گرم ویتامین H_2، ۲ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۱۵ میلی‌گرم کلسیم پانتوتنات و ۱۲/۷ میلی‌گرم کولین‌کلراید

۲- نشانی دفترمرکزی: تهران خیابان اسکندری شمالی پلاک ۳۵ واحد ۱- تلفن: ۶۶۴۳۲۹۴۸-۰۲۱

جدول۲-۱: برنامه واکسیناسیون جوجه‌ها در زمان‌های مختلف

سن(روزگی)	نوع واکسن	نحوه واکسیناسیون
۵	برونشیت	قطره چشمی
۷	نیوکاسل (B۱)	قطره چشمی
۱۳	نیوکاسل (لاسوتا)	آشامیدنی
۱۶	گامبرو	آشامیدنی
۱۷	گامبرو	آشامیدنی
۲۳	برونشیت	آشامیدنی

۲-٤- طرح آزمایشی

در این آزمایش اثرات استفاده از سطوح مختلف کلسیم (۱ و ۰/۶درصد) و آنزیم فیتاز (۰، ۵۰۰ و ۲۵۰۰ واحد به ازاء هر کیلوگرم جیره) بر عملکرد و قابلیت استفاده کلسیم و فسفر در جوجه‌های گوشتی مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و به روش فاکتوریل (۳×۲) انجام گرفت. هر کدام از گروه‌های آزمایشی در هشت تکرار ۱۳ قطعه‌ای بود که در چهار تکرار پرنده نر و در چهار تکرار از پرنده ماده استفاده شد.

مدل آماری مورد استفاده به شرح زیر بود:

$$y_{ijk}= \mu+A_i+B_j+C_k+ AB_{ij} + BC_{jk} + AC_{ik} +ABC_{ijk} +\varepsilon_{ijk}$$

y_{ijk} : مقدار مشاهده واحد آزمایش i ام در تکرار j ام

μ : میانگین جامعه

A_i : اثر سطح کلسیم جیره

B_j : اثر سطح فیتاز

C_k: اثر جنسیت

ε_{ijk}: اثر خطای آزمایشی

۲-۵- جیره های آزمایشی

تمامی جوجه‌ها در طول آزمایش با جیره حاوی ذرت و سویا تغذیه می‌شدند که از نظر تمامی مواد مغذی به غیر از سطح کلسیم و آنزیم فیتاز یکسان بودند. جیره‌های آزمایشی (جدول۲-۲) مورد نظر بر اساس کاتالوگ سویه راس طوری تنظیم گردیدند که حداقل مواد مغذی توصیه شده توسط انجمن ملی تحقیقات آمریکا [۵۰] را تأمین نمایند.

۲-٦- فراسنجه های اندازه گیری شده

در این آزمایش فراسنجه‌های عملکرد (وزن بدن، مصرف خوراک، ضریب تبدیل خوراک و درصد تلفات)، سرم خون (میزان فسفر، کلسیم، آهن، آلکالین فسفاتاز و کلسترول) و معدنی‌شدن استخوان‌های درشت‌نی (خاکستر، کلسیم و فسفر)، انگشت و محتویات ایلئوم (خاکستر، کلسیم و فسفر) اندازه‌گیری گردید.

۲-٦-۱- عملکرد

در ابتدای آزمایش جوجه‌ها به صورت گروهی توزین و میانگین وزن آنها محاسبه گردید. در ابتدای آزمایش و در سنین ۱۴، ۲۱ و ۲۸ روزگی وزن جوجه‌ها و خوراک مصرفی مربوط به هر واحد آزمایشی به صورت گروهی اندازه‌گیری گردید. میانگین وزن بدن، افزایش وزن روزانه، ضریب تبدیل خوراک (گرم خوراک مصرفی به گرم افزایش وزن) و میزان تلفات (٪) گروه‌های آزمایشی مختلف در هر دوره آزمایش مطابق روابط ارائه شده در بخش ضمیمه محاسبه گردید. مقادیر ضریب تبدیل خوراک بر اساس درصد تلفات در هر دوره تصحیح گردید.

۲-٦-۲- خاکستر استخوان

در سن ۲۸ روزگی آزمایش، از هر تکرار سه قطعه جوجه انتخاب و پس از خونگیری از ورید بال (جهت اندازه‌گیری فراسنجه‌های سرمی) و وزن‌کشی، به روش قطع گردن کشتار شدند. سپس تمامی استخوان‌های انگشت و درشت‌نی هر سه پرنده کشتار شده جدا و پس از جداسازی بافت‌های ضمیمه آن (با استفاده از تیغ اسکارپل) در داخل پلاستیک‌های شماره‌گذاری شده قرار داده شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

برای اندازه‌گیری خاکستر استخوان انگشت، ابتدا نمونه‌های جمع‌آوری شده در دمای ۱۰۵ درجه در داخل آون به مدت ۲۴ ساعت و تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید و در داخل هاون چینی

آزمایشگاهی خرد شدند. نمونه‌های خرد شده پس از توزین در داخل بوته‌چینی در دمای ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد و در داخل کوره آزمایشگاهی به مدت ۱۰ ساعت خاکستر گردیدند.

برای خاکستر نمودن نمونه‌های استخوان ران، ابتدا بافت‌های ضمیمه جداسازی و به مدت ۷۲ ساعت در داخل اتانول ۹۸٪ نگهداری گردیدند. در طول مدت سه روزه محلول اتانول هر ۲۴ ساعت تعویض گردید. سپس جهت جدا سازی چربی از محلول دی اتیل اتر ۹۰ درصد همراه متانول ۱۰درصد به مدت ۷۲ ساعت استفاده گردید و هر ۲۴ ساعت محلول تعویض و سپس نمونه‌ها در داخل هود آزمایشگاهی خشک گردیدند. نمونه‌های مورد نظر به مدت ۱۰ ساعت با استفاده از آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد خشک و با استفاده از هاون چینی آزمایشگاهی خرد و پس از توزین در داخل بوته‌های چینی در داخل آون در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت مجدداً خشک و توزین گردیدند. نمونه‌های خشک در کوره آزمایشگاهی به مدت ۱۰ ساعت در دمای ۶۰۰ درجه خاکستر گردیدند. مقادیر فسفر با استفاده از روش رنگ سنجی و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر[1] گروه علوم دامی و مقادیر کلسیم با استفاده از دستگاه فلیم فوتومتر[2] دانشکده کشاورزی و با استفاده از روش‌های ارائه شده در بخش ضمیمه اندازه گیری شدند. تمامی موارد فوق بر اساس روش‌های تأیید شده [۱۳] انجام گرفت.

۲-۶-۳- فراسنجه های خونی

برای تهیه نمونه سرم خون در سن ۲۸ روزگی، از هر تکرار دو قطعه بر اساس متوسط وزن واحد آزمایشی انتخاب و خونگیری از ورید بال انجام گرفت. نمونه‌های خون برای آنالیز سرم در لوله‌های آزمایشی فاقد مواد ضد انعقاد جمع‌آوری و پس از جداسازی سرم با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ[3] با دور ۳۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه انجام گرفت. نمونه‌های سرم جدا شده تا زمان اندازه‌گیری فراسنجه‌های مورد نظر مانند آنزیم آلکالین فسفاتاز، فسفر، کلسیم، آهن، منیزیم و کلسترول در داخل فریزر و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. مقادیر فسفر، کلسیم، منیزیم، آهن، کلسترول و آنزیم آلکالین فسفاتاز

1- Spectrophotometer. Jasco V-570 - Made in Japan
2- Flamephotometer- BWB- Made-in England
3- Hettich – Zentrifugen – Model EBA 21– Distributer in Iran Poya Ehraz Co Tel (98)21 22887535