دانشکده کشاورزی
گروه علوم دامی

رساله دکتری

تاثیر استفاده از کشت‌های زنده باکتریایی در گوساله‌های شیرخوار، سیلاژ ذرت و شرایط *in vitro*

جواد بیات کوهسار

دی ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

رساله دکتری تخصصی رشته تغذیه نشخوارکنندگان

تاثیر استفاده از کشتهای زنده باکتریایی در گوساله‌های شیرخوار، سیلاژ ذرت و شرایط *in vitro*

جواد بیات کوهسار

استادان راهنما

دکتر عبدالمنصور طهماسبی

دکتر عباسعلی ناصریان

استادان مشاور

دکتر رضا ولی زاده

دکتر رضا رضایی مکرم

دکتر علیرضا وکیلی

دی ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

گروه علوم دامی

این رساله با عنوان " **تاثیر تاثیر استفاده از کشتهای زنده باکتریایی در گوساله‌های شیرخوار، سیلاژ ذرت و شرایط *in vitro*** "

توسط آقای"**جواد بیات کوهسار**" در تاریخ / /۱۳۹۰ با نمره و درجه ارزشیابی در حضور هیأت داوران با موفقیت دفاع شد.

هیأت داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیأت	امضاء
۱	آقای دکتر طهماسبی	دانشیار	استاد راهنما	
۲	آقای دکتر عباسعلی ناصریان	استاد	استاد راهنما	
۳	آقای دکتر رضا ولی زاده	استاد	استاد مشاور	
۴	آقای دکتر رضا رضایی مکرم	استادیار	استاد مشاور	
۵	آقای دکتر علیرضا وکیلی	استادیار	استاد مشاور	
۶	آقای دکتر اسدا... تیموری یانسری	دانشیار	استاد مدعو خارجی	
۷	آقای دکتر علیرضا فروغی	استادیار	استاد مدعو داخلی	
۸	آقای دکتر محسن دانش مسگران	استاد	استاد مدعو داخلی	
۹	آقای دکتر علیرضا هروی	دانشیار	استاد مدعو داخلی	
۱۰	آقای دکتر علیرضا هروی	دانشیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

اظهار نامه

عنوان رساله:

اینجانب **جواد بیات کوهسار** دانشجوی دوره دکتری رشته تغذیه نشخوارکنندگان دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد نویسنده رساله:

تاثیر استفاده از کشتهای زنده باکتریایی در گوساله‌های شیرخوار، سیلاژ ذرت و شرایط *in vitro*

تحت راهنمایی دکتر طهماسبی متعهد می‌شوم:

- تحقیقات در این رساله توسط اینجانب انجام شده و از صحت و اصالت برخوردار است.
- در استفاده از نتایج پژوهش‌های محققان دیگر به مرجع مورد استفاده استناد شده است.
- مطالب مندرج در این رساله تاکنون توسط خود یا فرد دیگری برای دریافت هیچ نوع مدرک یا امتیازی به جایی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد است و مقالات مستخرج با نام "دانشگاه فردوسی مشهد" و یا "Ferdowsi University of Mashhad" به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی رساله تأثیرگذار بوده‌اند در مقالات مستخرج از آن رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این رساله، در مواردی که از موجود زنده (یا بافت‌های آنها) استفاده شده، ضوابط و اصول اخلاقی رعایت شده است.
- در کلیه مراحل انجام این رساله، در مواردی که به حوزه اطلاعات شخصی افراد دسترسی یافته یا استفاده شده، اصل رازداری، ضوابط و اصول اخلاق انسانی رعایت شده است.

تاریخ: / /۱۳۹۰

امضای دانشجو

مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه‌های رایانه‌ای، نرم افزارها تجهیزات ساخته شده) متعلق به دانشگاه فردوسی مشهد است. این مطالب باید به نحو مقتضی تولیدات علمی مربوطه ذکر شود.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این رساله بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

سپاسگزاری

حمد و سپاس بی‌پایان پروردگار یکتا را که توفیق کسب علم و دانش به این بنده حقیر عنایت فرمود. سلام و درود بی پایان به محضر مبارک و آسمانی حجت خدا و واسطه فیض هستی، امام عصر (روحی له الفداء). ارادت و تعظیم و درود بی پایان به ساحت مقدس و ملکوتی امام الرئوف، آقا علی بن موسی الرضا (علیه الاف التحیه و الثناء) که توفیق تحصیل در جوارشان نصیبم گردید که از بزرگترین افتخارات زندگیم می باشد.

تشکر و قدردانی می‌نمایم از پدر و مادر مهربانم که هر خیر و برکتی در زندگیم نصیبم می‌شود، از دعای خیر آنها و حمایت‌های بی‌دریغ شان می‌باشد. همچنین از زحمات و کمک‌های همسرم که در طول این دوره با صبر و بردباری مشکلات زندگی را بر من هموار نمود، نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

از تمامی اساتید گروه علوم دامی مخصوصا استاد راهنمای بزرگوار آقای دکتر عبدالمنصور طهماسبی که شمع این راه شد و از هیچ کمکی در انجام این پژوهش دریغ نکرد و استادان مشاور آقایان دکتر عباسعلی ناصریان، دکتر رضا ولی زاده، دکتر رضا رضایی مکرم و دکتر علیرضا وکیلی بی‌نهایت سپاسگزارم.

از مسئول محترم آزمایشگاه فناوری‌های نوین گروه صنایع غذایی آقای مهندس قزوینی و تکنسین آزمایشگاه دامپزشکی آقای مهندس براتی نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

همچنین از کلیه دوستانی که به نحوی در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند، نهایت تقدیر و تشکر را دارم.

چکیده

در این مطالعه سویه‌های خالصی از باکتری‌های تولید کننده و مصرف کننده اسید لاکتیک برای تولید کشت‌های زنده باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی خریداری شد و اثرات بالقوه آنها به عنوان پروبیوتیک یا افزودنی باکتریایی سیلویی در قالب چهار آزمایش مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش اول، ۲۴ راس گوساله ماده هلشتاین سه روز پس از تولد به طور تصادفی به تیمارهای : ۱) شاهد، ۲) گوساله‌های دریافت کننده پروبیوتیک تولید شده در شرایط آزمایشگاهی و ۳) گوساله‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک تجاری اختصاص داده شدند. گوساله‌های شیری پس از مصرف مقدار ۹۰۰ گرم استارتر برای سه روز متوالی از شیر گرفته شدند. اندازه‌گیری مصرف ماده خشک و ثبت اسکور مدفوع به صورت روزانه انجام شد. وزن‌کشی گوساله به صورت هفتگی و نمونه‌گیری خون در روزهای ۷، ۲۱، ۴۲ و ۹۰ پس از تولد انجام گرفت. بین تیمارها از نظر مصرف ماده خشک و میانگین افزایش وزن روزانه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). گوساله‌های دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسه با تیمار شاهد زودتر از شیر گرفته شدند. گوساله‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک به طور معنی‌داری وزن نهایی بالاتری داشتند. ارتفاع نهایی از جدوگاه و هیپ در گوساله‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک به طور معنی‌داری بالاتر بود ($P<0/05$). تعداد باکتری‌های لاکتوباسیل در مدفوع گوساله‌ها تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت و گوساله‌ها در دو هفته نخست بعد از تولد دارای اسکور مدفوعی بالاتری بودند. شیوع اسهال و پنومونی بین تیمارها مشابه نبود. غلظت متابولیت های خونی BHBA و گلوکز به طور قابل ملاحظه‌ای در گوساله‌های دریافت کننده پروبیوتیک بالاتر بود. در آزمایش دوم، دو افزودنی باکتریایی تولید شده در شرایط آزمایشگاه به صورت کشت تازه دارای چند سویه تخمیر همگن و تخمیر ناهمگن به همراه یک افزودنی باکتریایی تجاری (لاکتسیل) برای تلقیح سیلاژهای ذرت استفاده شدند. علوفه ذرت با ۳۰ درصد ماده خشک در سیلوهای آزمایشگاهی برای روزهای ۷، ۱۴، ۲۸، ۴۵ و ۹۰ (سه تکرار در هر تیمار) سیلو و ترکیب شیمیایی و خصوصیات تخمیری آنها تعیین شد. تجزیه پذیری شکمبه ای ماده خشک و پروتئین خام علوفه تازه و سیلوها با استفاده از روش *In situ* و تولید گاز در شرایط *In vitro* ارزیابی شد. در این مطالعه، تیمارها از نظر ماده خشک، ماده آلی، پروتئین خام و خاکستر اختلاف داشتند. با گذشت زمان پس از سیلو کردن، مقدار کربوئیدرات محلول در آب و پروتئین خام کاهش و غلظت نیتروژن آمونیاکی افزایش یافت. سیلاژ ذرت تلقیح شده با افزودنی تخمیر همگن به طور معنی‌داری پایداری هوازی پایین‌تری داشت ($P<0/05$). بین تیمارها از نظر فراسنجه‌های تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین خام اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($P<0/05$). استفاده از افزودنی‌های باکتریایی تاثیر معنی‌داری بر تولید گاز سیلاژهای ذرت در زمان‌های مختلف داشت. در آزمایش سوم اثرات تلقیح میکربی سیلاژ ذرت بر عملکرد گاوهای شیرده شکم اول در قالب یک طرح مربع لاتین ۳×۳ ارزیابی شد. مصرف ماده خشک به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت و در تیمار دارای سیلاژ تلقیح شده با افزودنی آزمایشگاهی بالاترین مقدار بود ($P<0/05$). بین تیمارها از نظر غلظت نیتروژن آمونیاکی و pH مایع شکمبه و نیز پارامترهای خونی اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>0/05$). تلقیح کردن سیلاژ ذرت با افزودنی‌های باکتریایی تاثیر معنی‌داری بر ترکیب شیر، تولید شیر و تولید شیر با چربی تصحیح شده نداشت ($P>0/05$). در آزمایش چهارم، اثر استفاده از کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک، ماده آلی و پارامترهای تخمیری در چهار مرحله در شرایط *In vitro* مورد بررسی قرار گرفت. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱) شاهد، ۲) پروپیونی باکتر فریدرینریچی، ۳) انتروکوکوس فیسیوم و ۴) مخلوط پروپیونی باکتر فریدرینریچی و انتروکوکوس فیسیوم بودند. مقدار ۰/۵ گرم ماده خوراکی، در آزمایش اول از جیره خالص و در آزمایش‌های دوم، سوم و چهارم از یک جیره بر پایه خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۱۰:۹۰، در داخل ویال‌های شیشه‌ای قرار داده شد. تیمارها، چهار تکرار در هر زمان، برای زمانهای ۲، ۴، ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت مورد انکوباسیون قرار گرفتند. قابلیت هضم ماده خشک به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت و تیمار شاهد پایین ترین مقدار قابلیت هضم ماده خشک را در ساعت ۲۴ بعد از شروع انکوباسیون در مراحل دوم تا چهارم داشت ($P<0/05$). تاثیر افزودن کشت‌های زنده میکربی بر pH محیط در شرایط *In vitro* در چهار مرحله معنی‌دار بود و تیمار شاهد پایین‌ترین مقدار را داشت ($P<0/05$). غلظت نیتروژن آمونیاکی در ساعات اولیه انکوباسیون پایین بود و با پیشرفت زمان انکوباسیون روند افزایشی داشت. غلظت اسیدهای چرب فرار به طور معنی‌داری تحت تاثیر تیمارها قرار گرفت ($P<0/05$).

واژه‌های کلیدی: کشت‌های زنده باکتریایی، پروبیوتیک، گوساله، سیلاژ ذرت

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول ۱

کلیات ۱

۱-۱. مقدمه ۱

۱-۲. اهداف عمده تحقیق ۷

فصل دوم ۹

بررسی منابع ۹

۲-۱. زمینه تاریخی ۹

۲-۲. تولید پروبیوتیک ۱۰

۲-۲-۱. انتخاب سویه‌ها ۱۰

۲-۲-۲. تولید ۱۱

۲-۳. پروبیوتیک‌های ترکیبی ۱۲

۲-۴. مهمترین سویه‌های باکتریایی استفاده شده برای تهیه کشت‌های زنده میکربی ۱۲

۲-۴-۱. باکتریهای تولید کننده اسید لاکتیک (لاکتوباسیلوس) ۱۲

۲-۴-۱-۱. متابولیسم ۱۳

۲-۴-۱-۲. ساختار دیواره سلولی باکتری ۱۴

۲-۴-۱-۳. کاربردهای صنعتی ۱۴

۲-۴-۲. بیفیدوباکتریوم ۱۵

۲-۴-۳. پروپیونی باکتریا ۱۶

۲-۴-۳-۱. ویژگیهای عمومی ۱۶

۲-۴-۳-۲. مسیرهای متابولیکی ۱۷

۲-۴-۳-۳. سوبسترای مطلوب، تولید اسید پروپیونیک، pH و نیازمندیهای دمایی ۱۸

۲-۵. ساز و کار عمل باکتری های مورد استفاده در کشت های زنده میکربی ۲۱

۲-۵-۱. اسیدهای آلی ۲۱

۲-۵-۲. پراکسید هیدروژن ۲۲

۲-۵-۳. دی اکسید کربن ۲۲

۲-۵-۴. باکتریوسین‌ها ۲۳

۲-۵-۵. ترکیبات ضد میکربی با وزن مولکولی پایین ۲۴

۲-۶. استفاده از کشت‌های زنده باکتریایی به عنوان پروبیوتیک در تغذیه گوساله‌های شیرخوار ۲۵

۲-۶-۱. عملکرد و تغذیه گوساله ۲۵

۲-۶-۲. مدیریت بهداشت ۲۶

۲-۶-۳. استفاده از آنتی بیوتیک‌ها در پرورش گوساله ۲۹
۲-۶-۴. اکولوژی میکربی دستگاه گوارش گوساله‌ها ۲۹
۲-۶-۴-۱. تنوع گونه‌های میکربی در مجرای دستگاه گوارش ۳۰
۲-۶-۴-۲. باکتریهای اسید لاکتیکی ۳۱
۲-۶-۴-۳.ایشرشیاکولی ۳۲
۲-۶-۴-۴. کامپیلوباکتر ژژونوی ۳۲
۲-۶-۴-۵. سالمونلا ۳۳
۲-۶-۶. نقش پروبیوتیک‌ها در سلامتی دستگاه گوارش و عملکرد گوساله‌ها ۳۴
۲-۷. اثر استفاده ازDFM باکتریایی در تخمیر شکمبه ۳۶
۲-۷-۱. تاثیر کشت های زنده باکتریایی بر الگوی تخمیری شکمبه ۳۹
۲-۷-۲. تولید اسید پروپیونیک ۴۹
۲-۷-۴. فاکتورهای تغییردهنده تولید اسید پروپیونیک و مصرف اسید لاکتیک ۵۲
۲-۷-۴-۱. ترکیب خوراک ۵۳
۲-۷-۴-۲. pH شکمبه‌ای ۵۴
۲-۸. استفاده از کشت های باکتریایی به عنوان افزودنی باکتریایی در تلقیح سیلو ۵۵
۲-۸-۱. افزودنی‌های باکتریایی ۵۶
۲-۸-۲. تاثیر افزودنی‌های باکتریایی سیلو بر عملکرد ۶۰
۲-۸-۲-۱. فاکتورهای موتر بر مصرف خوراک ۶۰
۲-۸-۲-۲. تاثیر تلقیح باکتریایی بر تخمیر شکمبه ۶۳
۲-۸-۲-۳. تاثیر تلقیح باکتریایی بر قابلیت هضم سیلاژ ۶۴
۲-۸-۴-۴. تاثیرات تغذیه سیلاژهای تلقیح شده بر عملکرد حیوان ۶۴
۲-۸-۴-۵. تاثیرات تغذیه سیلوهای تلقیح شده بر تولید شیر و ترکیب شیر ۶۵
فصل سوم ٦٧
مواد و روش‌های کلی ۶۷
۳-۱. تهیه پروبیوتیک ۶۷
۳-۱-۱. آماده سازی میکروارگانیسم‌ها ۶۷
۳-۱-۲. خشک کردن انجمادی نمونه‌ها ۶۸
۳-۱-۳. مدت و مکان اجرای طرح ۶۸
۳-۱-۴. انتخاب دامهای آزمایشی ۶۹
۳-۱-۵. مدیریت تولد ۶۹
۳-۱-۷. صفات اندازه‌گیری شده در آزمایش ۷۰
۳-۱-۷-۱. اسکور مدفوع ۷۰

۳-۱-۷-۲. اندازه گیری ماده خشک مصرفی ۷۰
۳-۱-۷-۳. اندازه‌گیری وزن ۷۰
۳-۱-۷-۴. سن قطع شیر ۷۱
۳-۱-۸. نمونه گیری ۷۱
۳-۱-۸-۱. نمونه‌گیری از مایع شکمبه ۷۱
۳-۱-۸-۲. نمونه‌گیری خوراک شروع‌کننده ۷۱
۳-۱-۸-۳. نمونه‌گیری از مدفوع ۷۲
۳-۱-۹. شمارش باکتریهای مدفوعی ۷۲
۳-۱-۹-۱. رقیق کردن نمونه‌ها ۷۲
۳-۱-۹-۲. کشت ۷۲
۳-۱-۹-۳. نحوه شمارش پرگنه‌ها ۷۴
۳-۲. مواد و روشها مربوط به آزمایش دوم ۷۵
۳-۲-۱. تهیه و تولید افزودنی باکتریایی در شرایط آزمایشگاهی ۷۵
۳-۲-۲. تیمارهای آزمایشی ۷۶
۳- ۲-۳. نحوه اعمال تیمارها ۷۶
۳-۲-۴. اندازه گیری ماده خشک ۷۷
۳-۲-۵. اندازه گیری pH ۷۷
۳-۲-۶. تعیین پایداری هوازی سیلاژها ۷۸
۳-۲-۷. ترکیب شیمیایی مواد سیلو شده ۷۸
۳-۲-۸. اندازه‌گیری غلظت کربوهیدرات‌های محلول ۷۸
۳-۳. آزمایش تولید گاز ۷۹
۳-۴. تعیین ناپدید شدن شکمبه ای با استفاده از کیسه های نایلونی(*In Sacco*) ۸۰
۳- ۴-۱. تجزیه آماری داده‌های مربوط به تجزیه پذیری ماده خشک و پروتئین خام ۸۰
فصل چهارم ۸۱
آزمایش اول ۸۱
٤-۱. چکیده ۸۱
٤-۲. مقدمه ۸۲
٤-۳. مواد و روش‌ها ۸۶
۴-۳-۱. سویه‌های باکتریایی ۸۶
۴-۳-۲. تیمارها و جیره های آزمایشی ۸۷
۴-۳-۳. اندازه‌گیریهای آزمایش ۸۷
۴-۳-۴. نمونه‌گیری از مایع شکمبه و متابولیت‌های خونی ۸۹

۴-۳-۵. جمع آوری مدفوع و شمارش لاکتوباسیل‌ها و کلیفرم‌ها ۹۰
۴-۳-۶. آنالیز آماری ۹۱
٤-٤. نتایج ۹۲
۴-۴-۱. عملکرد و شاخص‌های رشد بدنی گوساله‌ها ۹۲
۴-۴-۲. pH و شمارش باکتری‌های مدفوع ۹۴
۴-۴-۳. پارامترهای تخمیری شکمبه ۹۶
۴-۴-۴. متابولیت‌های خونی ۹۷
۴-۴-۵. از شیرگیری ناگهانی و متابولیت‌های خونی ۱۰۰
٤-٥. بحث ۱۰۲
۴-۵-۱. عملکرد و رشد شاخص‌های بدنی ۱۰۲
۴-۵-۲. pH و شمارش باکتری‌های مدفوع ۱۰۴
۴-۵-۳. پارامترهای تخمیری شکمبه ۱۰۵
۴-۵-۴. متابولیت های خونی ۱۰۶
۴-۵-۵. از شیر گیری ناگهانی و متابولیت های خونی ۱۰۶
٤-٦. نتیجه گیری ۱۱۰
فصل پنجم **۱۱۱**
آزمایش دوم ۱۱۱
۵-۱. چکیده ۱۱۱
۵-۲. مقدمه ۱۱۲
۵-۳. مواد و روش‌ها ۱۱۴
۵-۳-۱. تهیه سیلو ۱۱۴
۵-۳-۲. افزودنی‌ها باکتریایی ۱۱۵
۵-۳-۳. ترکیب شیمیایی سیلاژهای عمل آوری شده ۱۱۶
۵-۳-۴. تعیین تجزیه پذیری به روش کیسه‌های نایلونی ۱۱۷
۵-۳-۵. استفاده از روش تولید گاز ۱۱۷
۵-۳-۶. آنالیز آماری ۱۱۸
۵-٤. نتایج ۱۱۹
۵-۴-۱. تاثیرات تلقیح باکتریایی بر ترکیب شیمیایی و خصوصیات سیلاژهای ذرت ۱۱۹
۵-۴-۲. اثرات تلقیح باکتریایی بر پایداری هوازی سیلاژهای ذرت ۱۲۱
۵-۴-۳. اثرات تلقیح باکتریایی بر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین خام سیلوی ذرت ۱۲۲
۵-۴-۴. اثرات تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر تولید گاز در شرایط *In vitro* ۱۲۴
۵-۵. بحث ۱۲۷

۵-۵-۱. تاثیرات تلقیح باکتریایی بر ترکیب شیمیایی و ویژگی‌های سیلاژهای ذرت ۱۲۸
۵-۵-۲. اثرات تلقیح باکتریایی بر پایداری هوازی سیلاژهای ذرت ۱۳۰
۵-۵-۳. اثرات تلقیح باکتریایی سیلوهای ذرت بر تجزیه‌پذیری شکمبه‌ای ماده خشک و پروتئین خام ۱۳۱
۵-۵-۴. اثرات تلقیح باکتریایی بر پارامترهای تولیدی گاز علوفه تازه و سیلو شده ۱۳۲
۵-۶. نتیجه گیری ۱۳۳
فصل ششم **۱۳۵**
آزمایش سوم ۱۳۵
۶-۱. چکیده ۱۳۵
۶-۲. مقدمه ۱۳۶
۶-۳. مواد و روش‌ها ۱۳۸
۶-۳-۱. تهیه سیلو ۱۳۸
۶-۳-۲. افزودنی‌ها ۱۳۸
۶-۳-۳. آزمایش عملکردی ۱۳۹
۶-۴. نتایج ۱۴۲
۶-۴-۱. مصرف و قابلیت هضم خوراک ۱۴۲
۶-۴-۲. فاکتورهای تخمیری شکمبه ۱۴۳
۶-۴-۳. متابولیت‌های پلاسما ۱۴۴
۶-۴-۴. تولید و ترکیب شیر ۱۴۴
۶-۵. بحث ۱۴۵
۶-۵-۱. مصرف و قابلیت هضم خوراک ۱۴۵
۶-۵-۲. فاکتور های تخمیری شکمبه ۱۴۷
۶-۵-۳. متابولیت های پلاسما ۱۴۷
۶-۵-۴. تولید و ترکیب شیر ۱۴۸
۶-۶. نتیجه گیری ۱۴۹
فصل هفتم **۱۵۱**
آزمایش چهارم ۱۵۱
۷-۱. چکیده ۱۵۱
۷-۲. مقدمه ۱۵۳
۷-۳. مواد و روش‌ها ۱۵۶
۷-۳-۱. تهیه و تولید کشت های باکتریایی ۱۵۶
۷-۳-۲. تخمیر در شرایط *In vitro* با استفاده از روش Batch culture ۱۵۷
۷-۳-۳. نمونه گیری ۱۵۹

۷-۳-۴. آنالیز آماری ۱۵۹
۷-٤. نتایج ۱۵۹
۷-۴-۱. آزمایش اول: تاثیر افزودن کشت‌های زنده میکربی در شرایط *In vitro* با جیره خالص ۱۵۹
۷-۴-۲. آزمایش دوم: تاثیر افزودن کشت‌های زنده میکربی در شرایط *In vitro* با جیره بر پایه کنسانتره با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ ..... ۱۶۲
۷-۴-۳. آزمایش سوم: تاثیر افزودن کشت‌های زنده میکربی در شرایط *In vitro* با جیره بر پایه کنسانتره با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ با تزریق ساکارز ۱۶۵
۷-۴-۳. آزمایش چهارم: تاثیر افزودن کشت‌های زنده میکربی در شرایط *In vitro* با جیره بر پایه کنسانتره با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ و با pH اولیه ۵/۵ ..... ۱۶۸
۷-۵. بحث ۱۷۱
۷-٦. نتیجه‌گیری ۱۷۹
نتیجه‌گیری کلی ۱۸۰
پیشنهادات ۱۸۱
منابع ۱۸۳
پیوست‌ها ۱۹۹

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱. اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره‌های آزمایشی (بر اساس درصد ماده خشک)... ۸۹
جدول ۴-۲. تاثیر تغذیه پروبیوتیک بر زمان از شیرگیری، تغییرات وزن بدن و مصرف خوراک ۹۲
جدول ۴-۳. تاثیر تغذیه پروبیوتیک بر شاخص های رشد اسکلتی (سانتیمتر) ۹۴
جدول ۴-۴. تاثیر تغذیه پروبیوتیک بر pH و شمار باکتری های مدفوع ۹۵
جدول ۴-۵. تاثیر تغذیه پروبیوتیک بر پارامترهای تخمیری شکمبه ۹۷
جدول ۴-۶. تاثیر تغذیه پروبیوتیک بر غلظت پروتئین تام، هماتوکریت، گلبول‌های سفید خون و کورتیزول در زمان استرس از شیرگیری ۱۰۱
جدول ۵-۱. ترکیب شیمیایی و خصوصیات سیلاژ شده ذرت در روزهای مختلف پس از سیلوکردن ۱۲۰
جدول ۵-۲. تاثیر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر ضرائب تجزیه پذیری (میانگین± خطای استاندارد) و تجزیه پذیری موثر ماده خشک ۱۲۳
جدول ۵-۳. تاثیر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر ضرائب تجزیه‌پذیری (میانگین± خطای استاندارد) و تجزیه‌پذیری موثر پروتئین ۱۲۴
جدول۵-۴. خصوصیات تولید گاز و پارامترهای تخمینی علوفه تازه و سیلو شده ذرت ۱۲۶
جدول ۶-۱. اجزاء تشکیل دهنده و ترکیب مواد مغذی جیره های آزمایشی (بر اساس درصد ماده خشک).. ۱۴۰
جدول ۶-۲. اثر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر مصرف ماده خشک و قابلیت هضم ظاهری ۱۴۳
جدول ۶-۳. اثر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر pH و نیتروژن آمونیاکی شکمبه ۱۴۳
جدول ۶-۴. اثر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر غلظت‌های گلوکز و نیتروژن آمونیاکی خون ۱۴۴
جدول ۶-۵. تاثیر تلقیح باکتریایی سیلوی ذرت بر تولید شیر و ترکیبات شیر ۱۴۵
جدول ۷-۱. ترکیب جیره خالص مورد استفاده در آزمایش اول (درصد) ۱۵۸
جدول ۷-۲. ترکیب جیره خوراکی مورد استفاده در آزمایش دوم تا چهارم (درصد) ۱۵۸
جدول ۷-۳. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر ازت آمونیاکی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره خالص ۱۶۱
جدول ۷-۴. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت‌اسیدهای چرب فرار(میلی‌مول) در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره خالص ۱۶۱
جدول ۷-۵. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ ..... ۱۶۲
جدول ۷-۶. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده آلی در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ ..... ۱۶۳
جدول ۷-۷. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر ازت آمونیاکی در زمان‌های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ ..... ۱۶۴

جدول ۷-۸. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت‌اسیدهای چرب فرار(میلی مول) در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ ..... ۱۶۵
جدول ۷-۹. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ و تزریق ۱۰ درصد ساکارز ۱۶۶
جدول ۷-۱۰. تاثیر افزودن کشت های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده آلی در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ و تزریق ۱۰ درصد ساکارز ۱۶۶
جدول ۷-۱۱. تاثیر افزودن کشت های زنده باکتریایی بر ازت آمونیاکی در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ و تزریق ۱۰ درصد ساکارز ۱۶۷
جدول ۷-۱۲. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت‌اسیدهای چرب فرار(میلی مول) در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ و تزریق ۱۰ درصد ساکارز ۱۶۸
جدول ۷-۱۳. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده خشک در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ تعدیل شده با pH = ۵/۵ ..... ۱۶۹
جدول ۷-۱۴. تاثیر افزودن کشت های زنده باکتریایی بر قابلیت هضم ماده آلی در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ تعدیل شده با pH = ۵/۵ ..... ۱۶۹
جدول ۷-۱۵. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر غلظت‌اسیدهای چرب فرار (میلی مول) در زمان های مختلف انکوباسیون در جیره خوراکی با نسبت علوفه به کنسانتره ۹۰:۱۰ تعدیل شده با pH = ۵/۵ ..... ۱۷۶

فهرست شکل ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱. مسیرهای تشکیل اسید پروپیونیک از اسید لاکتیک یا پیروات ۵۰
شکل ۲-۲. رابطه بین مقدار آمونیاک سیلاژ و مصرف خوراک ۶۱
شکل ۳-۱. نحوه شمارش پرگنه ها ۷۵
شکل ۴-۱. تغییرات وزن بدن گوساله ها در طول دوره آزمایش ۹۳
شکل ۴-۲. تغییرات قوام مدفوع گوساله ها در طول دوره آزمایش ۹۸
شکل ۴-۴. غلظت اسدهای چرب استریفیه نشده در پلاسمای گوساله‌ها در طول دوره آزمایش ۹۸
شکل ۴-۵. تغییرات غلظت گلوکز خون گوساله ها در طول دوره آزمایش ۹۹
شکل ۴-۶. غلظت نیتروژن آمونیاکی خون گوساله ها در طول دوره آزمایش ۱۰۰
شکل ۵-۱. تاثیر تلقیح باکتریایی بر تغییرات دمایی سیلاژهای ذرت در روزهای ۴۵ و ۹۰ پس از سیلو کردن ۱۲۱
شکل ۵-۲. منحنی تولید گاز علوفه‌های تازه و سیلو شده ذرت در زمان‌های مختلف ۱۲۵
شکل ۷-۱. تاثیر افزودن کشت‌های زنده باکتریایی بر pH محیط در آزمایش اول ۱۶۰
شکل ۷-۲. تاثیر افزودنی باکتریایی بر pH محیط در آزمایش دوم ۱۶۳
شکل ۷-۳. تاثیر افزودن کشت زنده باکتریایی بر pH محیط در آزمایش سوم ۱۶۷
شکل ۷-۴. تاثیر افزودنی باکتریایی بر pH محیط در آزمایش چهارم گوشتی ۱۷۰

علامت اختصاری	معادل لاتین	معادل فارسی
ATP	Adenosine Tri Phosphate	آدنوزین تری فسفات
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus	ویروس گاوی عامل اسهال
BUN	Blood Urine Nitrogen	نیتروژن اوره‌ای خون
CFU	Colony Forming Unit	واحد تشکیل دهنده کلنی
CSPB	Calf Strains Probiotic Bacteria	پروبیوتیک با سویه باکتریایی با منشاء گوساله
DFM	Direct Fed Microbial	تغذیه مستقیم میکربی
GRAS	General Recognized as Safe	عموما بی خطر تشخیص داده شدن
LAB	Lactic Acid Bacteria	باکتری‌های اسید لاکتیک
ME	Metabolizable energy	انرژی قابل متابولیسم
MSPB	Multi Strains Probiotic Bacteria	پروبیوتیک با چند سویه باکتریایی
NDF	Neutral Detergent Fiber	فیبر نامحلول در شوینده خنثی
NEFA	None Esterified Fatty Acid	اسیدهای چرب غیر استریفیه
OMD	Organic Matter Digestibility	قابلیت هضم ماده آلی
PAB	Propionic Acid Bacteria	باکتری های اسید پروپیونیک
SCFA	Short Chain Fatty Acids	اسیدهای چرب کوتاه زنجیر
WSC	Water Soluble Carbohydrate	کربوئیدرات محلول در آب

فصل اول

کلیات

۱-۱. مقدمه

باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک (LAB) در محافظت از شیر و سبزیجات برای قرن‌ها استفاده شده است، اما جنبه‌های سلامتی شیر تخمیر شده در دهه اول قرن بیستم مشاهده شد (تمیم،۲۰۰۲). امروزه، پیشرفت‌های علمی و تکنولوژی اجازه استفاده از انواع گسترده‌ای از سویه‌های میکروارگانیسم‌های ویژه شامل باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک، پروپیونیک اسید باکتریاها (PAB) و بیفیدوباکتریاها و ترکیبات آنها به عنوان کشت‌های آغازگر، کشت های محافظ زیستی برای بهبود نگهداری، طعم و بافت شیر، سبزیجات، گوشت و فرآورده‌های غلات در مصارف انسانی و نیز در تغذیه دام به منظور بهبود قابلیت هضمی مواد مغذی و تثبیت فلور میکربی سیستم هضمی حیوانات و کاهش مقدار مواد نامطلوب محیطی و یا به عنوان افزودنی باکتریایی برای تلقیح سیلو را داده است.

مفهوم اولیه به کارگیری میکروارگانیسم‌ها در حیوانات شامل تغذیه مقادیر زیادی از میکروب‌های مفید و سودمند در زمانی که مریض یا تحت استرس هستند، می‌باشد. میکروارگانیسم‌های استفاده شده در این روش، در ابتدا پروبیوتیک نامیده می‌شد. اصطلاح پروبیوتیک اشاره به ماهیت شفابخشی و درمانی دارد. از

این رو، اداره دارو و غـذا ایـالات متحـده کارخانـه‌هـای خـوراک را ملـزم بـه اسـتفاده از واژه تغذیـه مسـتقیم میکروبـی (DFM) بـه جـای پروبیوتیـک کـرد. میکروارگانیسـم‌هـای اسـتفاده شـده بـه عنـوان DFM در نشخوارکنندگان شامل کشت‌های متنوع قارچی، باکتریایی و مخمری می‌باشد. هنگامی کـه بحـث از DFM می‌شود، هدف متاثر نمودن فعالیت میکروبی موجود در دسـتگاه گـوارش مـی‌باشـد. ایـن ترکیبـات از طریـق افزایش جمعیت میکروارگانیسم‌های مفید و استقرار آنها، سبب ممانت از بروز اسهال و افزایش وزن زنـده در گوساله‌ها و بره‌ها شده و نیز با توسعه میکروفلورای شکمبه شرایط بـرای افـزایش مصـرف خـوراک و توسـعه شکمبه را فراهم کرده و زمان از شیرگیری را تسریع می‌نمایند. شرایط نگهداری امروزی گوساله‌ها بـه نحـوی است که اغلب متاثر از اسهال و بیماری‌های تنفسی می‌باشند. اسهال عامل اصـلی ناخوشـی و مـرگ و میـر در اوایل زندگی گوساله‌ها می‌باشد و بیماری‌های تنفسی اغلـب در ۴ هفتگـی پدیـدار شـده کـه مخـارج سـنگین اقتصادی را بدلیل درمان و افت رشد به دنبال دارد. عوامل مختلفی می‌تواننـد باعـث شـیوع بـالای بیماریهـای تنفسی و روده‌ای شوند. بعد از تولد، بلافاصله گوساله از مادر جدا شده و از تماس بین مـادر و گوسـاله بـرای گرفتن فلور میکروبی مفید ممانعت به عمل می‌آید (فولر، ۱۹۸۹). با این وجود، استقرار باکتری‌هـا در دسـتگاه گوارش به سرعت صورت می‌پذیرد؛ به طوری که ایشرشیاکولی را می‌تـوان در تمـامی قسـمت‌هـای دسـتگاه گوارش بره و گوساله، ۸ ساعت پس از تولد و لاکتوباسیل‌هـا و اسـترپتوکوک‌هـا را ۲۴ سـاعت پـس از تولـد مشاهده نمود. در حیوانات سالم، لاکتوباسیل‌ها به سـرعت در دسـتگاه گـوارش اسـتقرار مـی‌یابنـد و در یـک هفتگی جمعیت آنها به $۱۰^{۷}$ تا $۱۰^{۹}$ می‌رسد. در گوساله‌های مبتلا به اسهال افزایش تعداد کلی‌فرم‌هـا گـزارش شده است. اشرشیاکلی در حیوانات جوان موجب بروز اسهال می‌شود، در حالی که افزایش تعداد کلی‌فـرم‌هـا نیز در حوالی از شیرگیری نیز قابل توجه می‌باشد. ایـن عوامـل بیمـاری‌زا بـرای اینکـه بتواننـد از طریـق تولیـد انتروتوکسین موجب بروز اسهال شوند، بایستی ابتدا در دستگاه گوارش استقرار یابند. گزارش شده اسـت کـه بروز اسهال در گوساله‌های تغذیه شده با کشت‌های زنده گونه‌های لاکتوباسیلوس و استرپتوکوکوس، کاهش

یافت (بیوچمن و همکاران، ۱۹۷۷ و فوکس، ۱۹۸۸). تیمرمن و همکاران (۲۰۰۵) یک آزمایش مقایسه‌ای با پروبیوتیک حاوی چند گونه (MSPB) و پروبیوتیک حاوی سویه‌های جدا شده از گوساله (CSPB) در جایگزین شیر انجام دادند و دریافتند که CSPB شیوع اسهال را در گوساله‌ها کاهش می‌دهد. ابه و همکاران (۱۹۹۵) با استفاده از بیفیدوباکتریوم پزودولانگوم و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در گوساله‌ها، کاهش در وقوع اسهال را مشاهده کردند.

علاوه بر این در سنین جوان‌تر، گوساله‌ها با تنش‌های مختلفی مانند انتقال، اخته کردن، شاخ سوزی، واکسیناسیون، محیط و از شیرگیری مواجه می‌باشند؛ در نتیجه حیوان شیر کمتری مصرف کرده (لورچ و فلو هارتی، ۱۹۹۹) و مستعد از دست دادن کارایی سدهای روده‌ای می‌شود (نابورز و همکاران، ۲۰۰۱ و سودرهولم و پردو، ۲۰۰۱) و احتمالا از ضعف سیستم ایمنی رنج می‌برند (شریدان و همکاران، ۱۹۹۴). به طور کلی، بیشترین پاسخ عملکردی به کشت‌های زنده باکتریایی در ۱۴ روز اول مصرف اتفاق افتاد (کراوفورد و همکاران، ۱۹۸۰ و هاتسون و همکاران، ۱۹۸۰). در مقابل، پژوهش‌های دیگر، هیچ‌گونه پاسخ عملکردی به تغذیه کشت‌های زنده باکتریایی در گوساله‌های تازه از شیر گرفته شده (دیو و توماس، ۱۹۸۱ و کرچر و همکاران، ۱۹۸۶) و گوساله‌های پرواری که تازه شروع به دریافت کشت‌های زنده باکتریایی نمودند (کیسلینگ و لاف گرین، ۱۹۸۱ و کرهبیل و همکاران، ۱۹۹۵)، مشاهده نشد.

هدف اصلی تغذیه کشت‌های زنده باکتریایی در حیوان بالغ اثرات سودمند بعد از شکمبه می‌باشد. البته شواهدی دال بر اثرات سودمند کشت‌های زنده باکتریایی بر شکمبه، به ویژه کمک به جلوگیری از اسیدوز شکمبه‌ای وجود دارد. خصوصیات اسیدوز شکمبه‌ای عبارتند از: کاهش در pH مایع شکمبه (زیر ۵/۶ برای اسیدوز تحت حاد و زیر ۵/۲ برای اسیدوز حاد) و افزایش در اسمولاریته مایع شکمبه‌ای (بیش از ۴۵۰ میلی‌اسمول). اسیدهای چرب فرار و اسید لاکتیک اسیدهای آلی عمده دخیل در تعیین pH و اسمولاریته مایع شکمبه می‌باشند. باکتری‌های تولیدکننده اسید لاکتیک (لاکتوباسیلوس و انتروکوکوس) ممکن است به

جلوگیری از اسیدوز شکمبه‌ای در گاوهای شیری کمک کنند (نوکک و همکاران، ۲۰۰۲)، چون به طور بالقوه حضور این باکتریها سبب می‌شود که میکروارگانیسم‌های شکمبه‌ای به حضور اسید لاکتیک در شکمبه سازگار شوند (یون و استرن، ۱۹۹۵). نشان داده شده است که تلقیح تخمیر در شرایط *in vitro* با باکتری‌های مصرف کننده اسیدلاکتیک، مگاسفرا السدنی (*Megasphaera elsdenii*)، به هنگام مصرف سوبستراهای سریع التخمیر از تجمع اسید لاکتیک، جلوگیری می‌کند (کانگ و هسیون، ۱۹۹۵). پروپیونی‌باکتریوم ممکن است اثر مشابهی داشته باشد، چون این باکتری‌ها لاکتات و گلوکز را به استات و پروپیونات تبدیل می‌کنند. نوکک و همکاران (۲۰۰۰) گزارش کردند گاوهای شیری دریافت‌کننده انتروکوکوس و لاکتوباسیلوس در مقایسه با گاوهای تغذیه شده با جیره کنترل، کاهش روزانه pH شکمبه بالاتر و pH شکمبه‌ای زیر ۵/۵ کمتری داشتند. در نشخوارکنندگان در حال رشد و گاوهای شیرده، پروپیونات ۶۱٪ (رینولد و همکاران، ۱۹۹۴) تا ۶۷٪ (هانتینگتون، ۲۰۰۰) گلوکز آزاد می‌کند. اثر افزایش دوز مصرفی (شاهد، 10^{7}، 10^{8}، 10^{9} و 10^{10} واحد تشکیل کلنی) از پروپیونی‌باکتریوم پروپیونیسی (*Propio*nibacterium *propionici*) بر تخمیر شکمبه در گاوهای نر تغذیه شده با جیره‌های پر کنسانتره توسط کیم و همکاران (۲۰۰۰) مطالعه شد. در این آزمایش در همه دوزهای مصرفی، استات کمتری تولید شد، سطوح پروپیونات بیشتر بود و نسبت استات به پروپیونات در همه دوزها به جزء دوز 10^{8}، کاهش یافت. مشخص شده است که پروپیونی باکتریوم پروپیونیسی، متابولیسم شکمبه را به سمت تولید استات کمتر و پروپیونات بیشتر سوق می‌دهد. با افزایش دوز پروپیونی‌باکتریوم پروپیونیسی، غلظت بوتیرات کاهش یافت و بعد از حذف پروپیونی باکتریوم پروپیونیسی، غلظت بوتیرات به سطح قبل از آزمایش برگشت. این پیشنهاد می‌کند که پروپیونی باکتریوم پروپیونیسی به طور موثری غلظت بوتیرات را در شکمبه کاهش می‌دهد. در مقابل، قربانی و همکاران، (۲۰۰۲) دریافتند که تغذیه پروپیونی‌باکتریوم یا پروپیونی باکتریوم با انتروکوکوس فیسیوم (*Entrococcus faecium*) تاثیری بر غلظت شکمبه‌ای ال- لاکتات، کل VFA، پروپیونات،