فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال چهاردهم، شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰ ص. ۳۸-۳۱

مقاله پژوهشی

بررسی اثر فسفو مایسین، *ساکارومایسس بولاردی* و *ساکارومایسس سرویزیه* بر عملکرد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن اینترلوکین-٦ در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین

صابر صابونی، محمد چمنی*، علی اصغر صادقی، مهدی امین-افشار، ناصر امام جمعه کاشان

گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

* (نویسنده مسئول مکاتبات): m.chamani@srbiau.ac.ir

تاریخ دریافت: مهر ۱۴۰۰ تاریخ پذیرش: دی ۱۴۰۰

چکیده

تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر آنتی‌بیوتیک فسفو مایسین و همچنین پروبیوتیک مخمری ساکارومایسس بولاردی و ساکارومایسس سرویزیه بر عملکرد، فعالیت آنتی اکسیدانی و بیان ژن اینترلوکین-۶ در گوساله‌های شیرخوار هلشتاین انجام شد. جهت انجام آزمایش ۲۰ راس گوساله تازه متولد شده هلشتاین پس از تغذیه با آغوز در قالب یک طرح کاملا تصادفی از سن ۳ روزگی در ۵ تیمار و ۴ تکرار (هر تکرار شامل ۱ راس گوساله) به مدت ۶۰ روز توزیع شدند. جیره تیمارهای آزمایشی شامل ۱: شاهد (بدون مصرف آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک)، ۲: فسفومایسین (۰/۱۶۵ گرم/کیلوگرم وزن بدن)، ۳: ساکارومایسس بولاردی محلول در شیر (۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن)، ۴: ساکارومایسس سرویزیه محلول در شیر (۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن) و ۵: مخلوط ساکارومایسس بولاردی و ساکارومایسس سرویزیه به صورت محلول در شیر (هرکدام ۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن) بودند. مقدار خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل هیچ یک از تیمارها تفاوت معنی‌داری را با شاهد نداشتند (P>۰/۰۵). مقدار آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز سرم و همچنین مقدار بیان ژن اینترلوکین-۶ در کل دوره در گوساله‌هایی که از مخلوط ساکارومایسس بولاردی و ساکارومایسس سرویزیه استفاده کرده بودند بالاترین اختلاف معنی‌دار را با شاهد داشتند (P<۰/۰۵). به طور کلی استفاده از مخلوط پروبیوتیک‌های مخمری نسبت به استفاده جداگانه آن‌ها و همچنین نسبت به آنتی‌بیوتیک در تغذیه گوساله‌ها تاثیر بیشتری بر روی سیستم آنتی‌اکسیدانی و سیستم ایمنی گوساله‌ها داشت.

کلیدواژه‌ها: فسفومایسین، پروبیوتیک، اینترلوکین-۶، هلشتاین، عملکرد.

مقدمه

صنعت پرورش گاو با مدیریت، مراقبت، تغذیه و خوراکدهی گوساله‌ها در ماه‌های نخست می‌تواند بازدهی قابل توجهی داشته باشد [۱]. عملکرد اولیه دستگاه گوارش هضم و جذب مواد مغذی است [۲]. از طرفی نقش دستگاه گوارش در حفاظت میزبان از تغییر مداوم میکروارگانیسم‌ها، سموم و مواد شیمیایی در لومن و جلوگیری از انتقال کنترل نشده به گردش خون سیاهرگ باب کبدی، به همان اندازه حائز اهمیت است [۳].

نگهداری یک دستگاه گوارش سالم و کاربردی از نظر انرژتیک نیز حائز اهمیت است چراکه ۲۰ درصد از مصرف اکسیژن و ۳۰ درصد از فعالیت‌های متابولیک و سنتز پروتئین حیوان را تشکیل می‌دهد [۴]. بنابراین، دگرگونی‌هایی که در دستگاه گوارش به وجود می آیند، می‌توانند بر بسیاری از سیستم‌های بیولوژیکی موجود در حیوان تاثیر بگذارند و حفظ عملکرد و سلامت دام را مختل نمایند.

اختلالات گوارشی در دام از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و گوساله ها به‌دلیل حساستر بودن، بیشترین میزان بروز مرگ و میر را در مزرعه نسبت به بقیه دام‌ها دارند [۵]. گوساله‌های شیر خوار در طی دوره پرورش تحت تاثیر انواع مختلفی از استرس ها و فشارهای سیستم پرورشی می‌باشند که کارایی انها را تحت تاثیر قرار می‌دهد [۶]. برخی از تنش‌ها می‌توانند با تغییر میکرواورگانیسم‌های شکمبه و روده، موجب کاهش عملکرد رشد و سیستم ایمنی و در نتیجه افزایش خسارت ناشی از مرگ و میر شوند [۷].

یکی از راه‌های غلبه بر مشکلات دستگاه گوارش در گوساله‌ها، استفاده از افزودنی‌های خوراکی می‌باشد. مواد افزودنی خوراکی موادی هستند که برای افزایش اثر بخشی مواد مغذی، مورد استفاده قرار می‌گیرند و اثرشان را با تغییر جمعیت میکروبی دستگاه گوارش به حیوان اعمال می‌کنند. علاوه بر این، آنها در مقادیر غیر درمانی با خوراک‌ها مخلوط می‌شوند و از حیوانات در برابر انواع تنش‌های زیست محیطی مضر حفاظت می‌کنند [۸].

یکی از مواد افزودنی آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که در طی دهه‌های گذشته به‌علت اثرات درمانی به‌طور گسترده‌ای در جیره‌های دامی استفاده شده است [۹]. اثرات سودمند آنتی‌بیوتیک‌های خوراکی به‌طور کلی با تغییرات باکتری‌های روده و تعامل آن‌ها با حیوان میزبان، از جمله تعاملات باکتریایی با بافت روده و همچنین سیستم ایمنی، ارتباط دارد. بدین ترتیب میکروبیوتای روده نه تنها در تبدیل مواد مغذی در دستگاه گوارش دخیل است، بلکه ممکن است بر بهداشت و سلامت حیوانات تأثیر داشته باشد و یا آن را تقویت کند [۱۰].

همچنین اخیرا مشخص شده است که پروبیوتیک‌ها به عنوان یکی از افزودنی‌های مهم خوراکی، دارای خاصیت تحریک رشد، افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی و تقویت سیستم ایمنی بسیار بالایی هستند [۱۱].

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب مصرف شوند نتایج مفیدی برای سلامت میزبان در پی خواهند داشت. این میکروارگانیسم‌ها در دامنه وسیعی از بیماری‌ها مانند عفونت‌ها، آلرژی‌ها و بیماری‌های التهابی استفاده می‌شوند و با ایجاد تعادل در جمعیت فلور میکروبی روده بر بهبود عملکرد حیوان و سیستم ایمنی آنها اثر مثبتی دارند [۱۲].

مدیریت گوساله ها در ماه های نخست تضمین کننده سلامت و تولید آینده آنها است. وضعیت فیزیولوژیکی ویژه حیوان در این دوره شامل توانایی جذب مولکول درشت به ویژه ایمیونوگلوبولین‌ها از روده و مستعد بودن به عفونت روده و اسهال است. افزودن آنتی بیوتیک‌ها و پروبیوتیک‌ها در دوره ذکر شده از جمله مکمل‌هایی هستند که می‌توانند در حفظ سلامت گوساله‌ها موثر واقع شوند [۱۳].

بر اساس مطالعات صورت گرفته یکی از آنتی بیوتیک‌هایی که برای کاهش اسهال گوساله‌ها می‌تواند کاربرد داشته باشد، فسفومایسین می‌باشد. فسفومایسین از مشتقات فسفونیک اسید بوده و دارای کوچک‌ترین مولکول در میان آنتی بیوتیک‌های شناخته شده می‌باشد که با کشتن و جلوگیری از رشد باکتری‌ها، به بهبود سلامتی و رشد دام کمک می‌نماید [۱۴].

اما امروزه به‌علت نگرانی از اینکه استفاده از آنتی بیوتیک‌ها می‌تواند به افزایش مقاومت باکتری‌ها کمک کند، استفاده از پروبیوتیک ها به عنوان جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها در نظر گرفته می‌شود [۱۲].

برخی از تحقیقات اثرات پروبیوتیک‌های مخمری بر بهبود پارامترهای عملکردی و ایمنی دام را اثبات نموده‌اند [۱۵]. جنس ساکارومایسس شامل دو گونه مشهور ساکارومیسس سرویزیه و ساکارومیسس بولاردی می‌باشد که یکی از کاربردی‌ترین پروبیوتیک‌های مخمری بوده و عموماً برای مبارزه با میکروارگانیسم‌های بیماریزای روده مورد استفاده قرار می‌گیرند و بنابراین می‌توانند مزیت‌های ویژه‌ای بر بهبود عملکرد میزبان داشته باشند [۱۶].

با توجه به اهمیت و حساسیت پرورش گوساله‌ها و اثر مثبت پروبیوتیک‌ها به عنوان افزودنی بر رشد، سلامت و تحریک سیستم ایمنی و همچنین جایگزین مناسب بجای آنتی بیوتیک‌ها، تحقیق حاضر به منظور بررسی استفاده از آنتی‌بیوتیک فسفومایسین، دو گونه

مخمر پروبیوتیکی به صورت جداگانه و مخلوط بر عملکرد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بیان ژن اینترلوکین ۶ در گوساله‌ها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در استان تهران در شهرستان شهریار با مشخصات جغرافیایی بین ۵۰ درجه و ۵۶ دقیقه تا ۵۱ درجه و ۵۳ دقیقه طول شرقی و ۳۵ درجه و ۳۳ دقیقه تا ۳۵ درجه و ۴۰ دقیقه عرض شمالی انجام شد.

جهت انجام آزمایش ۲۰ راس گوساله تازه متولد شده هلشتاین با میانگین وزن تولد ۲/۵ ± ۴۲/۵ کیلوگرم پس از تغذیه با آغوز در قالب یک طرح کاملا تصادفی از سن ۳ روزگی در ۵ تیمار و ۴ تکرار (هر تکرار شامل ۱ راس گوساله) به مدت ۶۰ روز توزیع شدند. جیره تیمارهای آزمایشی شامل ۱: شاهد (بدون مصرف پروبیوتیک)، ۲: فسفومایسین (۰/۱۶۵ گرم/کیلوگرم وزن بدن)، ۳: پروبیوتیک محلول در شیر روزانه بر پایه *Saccharomyces boulardii* (۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن)، ۴: پروبیوتیک محلول در شیر روزانه بر پایه*Saccharomyces cerevisiae* (۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن) و ۵: مخلوط پروبیوتیک‌های مخمری *Saccharomyces boulardii* و *Saccharomyces cerevisiae* به صورت محلول در شیر روزانه (هرکدام ۱ گرم/کیلوگرم وزن بدن) بودند.

آنتی‌بیوتیک فسفومایسین محصول شرکت بتسون اسپانیا بود و ترکیبات موجود در این محصول شامل آنتی‌فسفومایسین کلسیم ۲۵%، فروکتوز ۱و۶ دی فسفات و نیز نمک‌های معدنی (غیرآلی) بود.

پروبیوتیک‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه (*Saccharomyces cerevisiae CNCM-1077*) و ساکارومایسس بولاردی (*Saccharomyces cerevisiae var. boulardii CNCM I-1079*) مورد استفاده در این تحقیق به ترتیب از محصولات شرکت تجاری ماهان ایران و لالمند فرانسه بودند که هر گرم از آن‌ها حاوی ۲×۱۰^{۱۰} *CFU/g* سلول زنده مخمر بود.

گوساله‌ها از روز اول تا سه روزگی با آغوز (به میزان ۱۰% از وزن بدن) تغذیه شدند. از روز چهارم به بعد، روزانه ۴ لیتر شیر به گوساله‌ها خورانیده شد. گوساله ها علاوه بر شیر به صورت آزادانه به جیره کاملا مخلوط دسترسی داشتند. جیره غذایی گوساله‌ها با استفاده از جدول NRC (۲۰۱۱) تنظیم شد. مواد خوراکی مورد استفاده در جیره و ترکیب شیمیای آن در جدول ۱ ارائه شده است. مقدار ۱۰ درصد یونجه (جایگزین با سبوس گندم) در اندازه ۲ تا ۳ سانتی‌متر از سن ۳۵ روزگی به خوراك آغازین اضافه شد.

جدول ۱ - مقادیر مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی جیرهٔ استارتر

ترکیبات جیره	درصد در جیره	ترکیبات شیمیایی	درصد در جیره
جو	۵	ماده خشک	۸۸/۸۵۱
ذرت دانه ای	۳۵	کل مواد مغذی قابل هضم	۸۳/۴۷۶
کنجالهٔ سویا	۳۳/۲	پروتئین خام	۱۸/۸۳
سبوس گندم	۲۰	فیبر خام	۴/۳۳۸
نمک آسیاب شده	۱	عصاره اتری	۸/۷۱۲
کربنات کلسیم	۱/۲	الیاف نامحلول در شوینده خنثی	۱۰/۹۳
اکسید منیزیم	۰/۳	الیاف نامحلول در شوینده اسیدی	۵/۶۵۲
دی کلسیم فسفات	۰/۳	کلسیم	۱/۰۷۶
جوش شیرین	۱	فسفر	۰/۴۴۳
مکمل ویتامینی	۱/۵		
مکمل مواد معدنی	۱/۵		
جمع	۱۰۰		

هر کیلوگرم مکمل ویتامینی دارای ۲ میلیون واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۵۰ هزار واحد بین‌المللی ویتامین D، ۳۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۶۰۰ میلی‌گرم آنتی اکسیدان و هر کیلوگرم مکمل معدنی دارای ۱۲۵۰۰ میلی‌گرم مس، ۱۰ میلی‌گرم کبالت، ۱۰۰ میلی‌گرم ید، ۴۰۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰ هزار میلی‌گرم منگنز، ۶۵۰۰ میلی‌گرم روی و ۱۰ میلی‌گرم سلنیوم می‌باشد.

عملکرد

خوراک گوساله‌ها از روز چهارم هر روز بوسیله ترازوی دیجیتال وزن شد و در حد اشتها در اختیار هر گوساله قرار داده شد. با کسر مقدار باقیمانده خوراک از مقدار اولیه در صبح روز بعد، مقدار خوراک خورده شده هر گوساله ثبت و در نهایت خوراک مصرفی کل دوره محاسبه گردید. وزنکشی هر ده روز یک بار پیش از خوراك دهی نوبت صبح انجام شد. جهت بدست آوردن میانگین افزایش وزن کل دوره، با تقسیم حاصل تفاوت مقدار وزن انتهای دوره‌ی پرورش هر گوساله از وزن بدو تولد بر تعداد روزهای سپری شده در دوره مربوطه استفاده شد. در نهایت ضریب تبدیل خوراک برای هر گوساله، با تقسیم خوراک مصرفی کل دوره بر میزان افزایش وزن بدن در کل دوره بدست آمد.

(متوسط افزایش وزن/متوسط خوراک مصرفی) = ضریب تبدیل غذایی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نمونه‌گیری خون قبل از تغذیهٔ وعدهٔ صبح در روزهای ۱۰، ۳۰ و۶۰ از سیاهرگ دمی ۳ راس گوساله در هر تیمار انجام شد. برای تهیه سرم لوله‌های آزمایش حاوی نمونه خون به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. نمونه‌های سرم در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند تا بعداً جهت تعیین پارامترهای آنتی‌اکسیدانی استفاده شوند [۱۷].

فعالیت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از کیت‌های تجاری پارس آزمون توسط دستگاه الایزا ریدر (مدل ELX800، Bio-Tek) در طول موج ۴۱۲ نانومتر برای گلوتاتیون پراکسیداز اندازه‌گیری شد. غلظت سوپر اکسید دیسموتاز به روش نیتروبلوتترازولیوم (NBT) در طول موج۵۶۰ نانومتر محاسبه شد. همچنین فعالیت آنزیم کاتالاز با روش Claiborne در طول موج ۲۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بیان ژن اینترلوکین-۶ (IL-6)

نمونه‌های خون برای بررسی برای بیان ژن IL-6 در انتهای دوره از گوساله‌ها جمع‌آوری شدند و در تانک حاوی ازت مایع به آزمایشگاه ژنتیک مولکولی و بیوتکنولوژی منتقل و تا زمان استخراج RNA در دمای ۸۰- درجه سلسیوس ذخیره شد. مراحل کار سنجش بیان نسبی ژن مربوطه، جداسازی نسبی RNA، ساخت cDNA و بررسی بیان ژن IL-6 که با روش Real-Time PCR بود. نمونه‌های خون با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت یکتاتجهیز آزما و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. برای ساخت cDNA از کیت QuantiFast Reverse Transcriptase شرکت کیاژن (QIAGEN, 205311) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده، cDNA هر نمونه از روی RNA استخراج شده آن تهیه شد. توالی پرایمرهایی که برای بررسی ژن IL-6 استفاده شدند، شامل پرایمرهایی جهت Real time PCR و پرایمرهای مربوط به ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی جهت نرمال‌سازی بودند (جدول ۲). با استفاده از پرایمرهای Real time PCR و استفاده از Sybergreen، بیان ژن در نمونه‌های cDNA تهیه شده از نمونه آزمایشی، مورد ارزیابی قرار گرفت [۱۸].

آنالیز آماری داده‌ها

داده‌های جمع‌آوری شده در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از مدل خطی عمومی (GLM) و به وسیله نرم‌افزار آماری [۱۹] مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد انجام گرفت. مدل آماری طرح به صورت $Y_{ij}= \mu + A_i + e_{ij}$ بود. در این مدل Y_{ij}: مقدار هر مشاهده برای صفت مورد مطالعه، μ: میانگین مشاهدات، A_i: اثر تیمارهای آزمایشی و e_{ij}: اثر خطای آزمایشی می‌باشند.

نتایج

تاثیر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد گوساله‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است. خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل گوساله‌ها در تیمارهای آزمایشی تفاوت معنی‌داری را با شاهد نداشتند (P>۰/۰۵).

نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سرم خون گوساله‌ها در جدول ۴ ارئه شده است. مقدار آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز سرم خون تیمارهای ۴ و ۵ در ۶۰ روزگی با شاهد اختلاف معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵) اما مقدار آن‌ها در ۳ و ۳۰ روزگی در بین هیچکدام از

تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشتند (P>۰/۰۵). برای مقدار آنزیم کاتالاز سرم خون گوساله‌ها در هیچ یک از تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P>۰/۰۵).

نتایج اثر جیره‌های آزمایشی بر بیان ژن اینتر لوکین-۶ در جدول ۵ ارائه شده است. در روز سوم آزمایش اختلاف مقدار بیان ژن اینترلوکین-۶ در بین هیچ یک از تیمارها معنی‌دار نشد (P>۰/۰۵). در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش، اختلاف بیان ژن اینترلوکین-۶ در گوساله‌هایی که از دو گونه مخمر پروبیوتیکی به صورت مخلوط استفاده کرده بودند، با شاهد و سایر تیمارها افزایش معنی‌داری داشتند (P<۰/۰۵).

جدول ۲- توالی آغازگرهای استفاده شده در آزمایش

نام ژن	توالی پرایمر	اندازه ژن (pb)
اینترلوکین-۶ (IL-6)	F:5′-TGATGGATGCTTCCAAACTG-3′	۲۰
	R:5′-GAGCATTGGAAGTTGGGGTA-3′	۲۰
ژن مرجع (GAPDH)	F:5′-GTATTGGGCGCCTGGTCACC-3′	۲۰
	R:5′-CGCTCCTGGAAGATGGTGATGG-3′	۲۰

جدول ۳- اثر تیمارهای آزمایشی بر عملکرد گوساله ها در کل دوره

عملکرد	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	تیمار ۴	تیمار ۵	SEM	P-value
خوراک مصرفی (کیلوگرم/۶۰ روز)	۲۸/۴۸۹	۳۳/۴۹۲	۳۴/۹۰۶	۳۶/۳۷۶	۳۹/۶۱۷	۳/۳۲۷	۰/۲۴۹
افزایش وزن بدن (کیلوگرم/۶۰ روز)	۲۱/۵۰۰	۲۳/۲۵۰	۲۵/۵۰۰	۲۶/۷۵۰	۲۸/۲۵۰	۲/۹۷۳	۰/۵۲۹
ضریب تبدیل	۱/۳۳۷	۱/۴۴	۱/۳۷	۱/۳۷۰	۱/۴۲۶	۰/۱۶۴	۰/۹۷۱

میانگین‌های هر ردیف با حرف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: ***خطای استاندارد*** میانگین.

جدول ۴- اثر تیمارهای آزمایشی بر فعالیت آنتی اکسیدانی گوساله ها در سنین مختلف

آنزیم های آنتی اکسیدانی	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	تیمار۵	SEM	P-value
GPX							
۳ روزگی	۴/۴۲۵	۶/۹۳۱	۸/۸۲۲	۹/۴۴۲	۱۳/۵۱۷	۳/۱۶۳	۰/۳۹۷
۳۰ روزگی	۶/۱۶۷	۶/۹۱۶	۸/۸۰۲	۱۱/۳۳۷	۱۳/۲۰۳	۳/۴۲۶	۰/۵۸۱
۶۰ روزگی	۸/۲۷۵^{c}	۳/۸۸۹^{c}	۱۱/۶۳۱^{bc}	۱۶/۱۸۹^{b}	۲۹/۰۶۸^{a}	۲/۳۷۶	۰/۰۰۰
CAT							
۳ روزگی	۰/۲۷۰	۰/۲۷۰	۰/۲۷۰	۰/۲۷۰	۰/۲۷۱	۰/۰۰۰	۰/۳۱۴
۳۰ روزگی	۰/۲۷۲	۰/۲۷۲	۰/۲۷۲	۰/۲۷۱	۰/۲۷۸	۰/۰۰۳	۰/۵۷۱
۶۰ روزگی	۰/۲۷۰	۰/۲۷۰	۰/۲۷۱	۰/۲۷۱	۰/۲۷۱	۰/۰۰۰	۰/۲۲۳
SOD							
۳ روزگی	۳۲۶/۳۲۵	۴۳۲/۱۶۵	۴۵۶/۱۹۳	۵۰۳/۴۹۶	۶۰۱/۳۹۹	۲۰۷/۶۴۹	۰/۹۱۳
۳۰ روزگی	۲۱۵/۹۶۰	۲۵۴/۹۰۴	۴۹۸/۸۳۴	۵۲۲/۱۴۵	۷۰۷/۵۳۸	۱۴۶/۷۸۴	۰/۱۸۲
۶۰ روزگی	۲۰۰/۰۱۰^{b}	۴۹۵/۵۶۵^{ab}	۵۲۱/۹۱۱^{ab}	۷۰۶/۲۹۴^{a}	۸۱۲/۵۵۹^{a}	۱۲۵/۰۰۵	۰/۰۴۹

میانگین‌های هر ردیف با حرف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین.

جدول ۵- اثر تیمارهای آزمایشی بر بیان ژن اینترلوکین-۶ گوساله‌ها در سنین مختلف

بیان ژن اینترلوکین-۶	تیمار۱	تیمار۲	تیمار۳	تیمار۴	تیمار۵	SEM	P-value
۳ روزگی	۰/۹۵۰	۰/۹۵۴	۱/۰۹۰	۱/۰۹۸	۰/۹۸۱	۰/۱۷۶	۰/۱۱۸
۳۰ روزگی	۲/۲۸۰^{b}	۲/۴۱۲^{b}	۲/۴۶۳^{b}	۲/۲۶۳^{b}	۳/۱۶۴^{a}	۰/۱۴۴	۰/۰۰۰
۶۰ روزگی	۱۴/۳۵۰^{b}	۱۴/۳۸۳^{b}	۱۵/۰۴۹^{b}	۱۴/۳۸۰^{b}	۲۳/۲۷۴^{a}	۱/۲۸۲	۰/۰۰۰

میانگین‌های هر ردیف با حرف غیر مشترک نشانه اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

SEM: خطای استاندارد میانگین.

بحث

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که میانگین خوراک مصرفی، افزایش وزن و ضریب تبدیل خوراکی گوساله‌ها در کل ۶۰ روز تحت تاثیر جیره‌های آزمایشی قرار نگرفت اما خوراک مصرفی و افزایش وزن در گوساله‌هایی که از مخلوط پروبیوتیک‌های مخمر ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی استفاده کرده بودند بیشتر از شاهد و سایر تیمارها بود.

نتایج متفاوتی از اثر پروبیوتیک بر صفات عملکردی گوساله‌های شیری بدست آمده است. مشابه با این تحقیق انجام شده، [۲۰] در صفات وزن بدن و ماده خشک مصرفی در بین تیمارها تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند ولی پیشنهاد کردند که محصولات تخمیری پروبیوتیکی تاثیر مثبتی بر سلامتی گوساله‌های قبل از شیرگیری دارد و این محصولات می‌توانند برای کاهش اسهال گوساله‌ها در شرایط تجاری که بدتر از حالت عادی هستند، استفاده شوند. همچنین [۲۱] در صفات مصرف خوراک و تغییر وزن بدن تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد مشاهده نکردند و بیان داشتند که مخمرها باعث بهبود سلامت دستگاه گوارش گوساله‌های جوان و کاهش مرگ و میر می‌شود. اما در مقابل، نتایج حاصل از سایر مطالعات روی گوساله‌ها نشان داد که افزودن پروبیوتیک به جیره‌ی گوساله‌ها سبب افزایش معنی‌دار در صفات عملکردی شده است [۲۲]. برخی مطالعات دیگر نشان دادند که استفاده از پروبیوتیک در شیر با بهبود میانگین افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراکی و سن از شیرگیری گوساله‌ها، باعث افزایش عملکرد گوساله‌ها می‌شود و بیان داشتند که استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث بهبود رشد و عملکرد سیستم ایمنی گوساله‌ها می‌شود [۲۳]. به‌طور کلی اثر پروبیوتیک‌ها را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که این میکروارگانیسم‌ها از طریق جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و یا میکروارگانیسم‌هایی که در مصرف مواد مغذی با میزبان رقابت می‌کنند اثر مثبت خود را بر افزایش خوراک مصرفی نشان می‌دهند [۱۸، ۲۴]. از سوی دیگر، تنها کربوهیدراتی که گوساله‌های جوان قادر به گوارش آن می‌باشند، لاکتوز می‌باشد. بنابراین، سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس موجود در مکمل‌های پروبیوتیکی مورد استفاده در آزمایش کنونی، این کربوهیدرات را با کارایی بالا تخمیر نموده و منجر به بهبود وزن می‌گردد [۲۵].

این تحقیق نشان داد که استفاده از انتی بیوتیک فسفومایسین و پروبیوتیک‌های مخمری تاثیری بر وضعیت آنزیم کاتالاز سرم خون گوساله‌ها نسبت به گروه شاهد نداشت. هم راستا با این تحقیق [۱۷] هنگامی‌که از پروبیوتیک‌های مخمر زنده (*Debaryomyces hansenii*) در جیره‌ی لاروهای ماهی استفاده کردند، مشاهده کردند که فعالیت کاتالاز تحت تاثیر قرار نگرفت. از طرفی در نتایج ازمایش حاضر مشخص شد مقدار آنزیم‌های گلوتاتیون پراکسیداز و سوپراکسیددیسموتاز در ۶۰ روزگی در گوساله‌هایی که از مخمر ساکارومایسس سرویزیه و همچنین از مخلوط مخمر ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی استفاده کرده بودند افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد و سایر تیمارها داشتند. همسو با نتایج ازمایش حاضر مطالعات مختلف ثابت کرده‌اند که استفاده از پروبیوتیک‌ها وضعیت آنتی اکسیدانی حیوان را تحت تاثیر قرار می‌دهد به‌طوریکه حیواناتی که در معرض استرس اکسیداتیو هستند، ممکن است از توانایی پروبیوتیک‌ها برای افزایش سطح آنتی اکسیدانی و خنثی سازی اثرات انواع *ROS* ها بهره‌مند شوند [۲۶]. افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی پلاسمای خون گوساله‌های هلشتاین تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک‌ها نشان داده شد [۲۷]. آنها در این باره بیان کرده اند که پروبیوتیک‌ها از طریق تولید اسید بوتریک و هیدروژن می‌توانند نقش تحریک کننده‌ای

در تولید آنتی‌اکسیدن‌ها و تخریب رادیکال‌های آزاد داشته باشند [۲۷].

در نتایج تحقیق حاضر بیان ژن اینترلوکین-۶ گوساله‌ها در روزهای ۳۰ و ۶۰ آزمایش که از مخلوط مخمر ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی استفاده کرده بودند نسبت به شاهد و سایر تیمارهای آزمایشی بطور معنی‌داری بیشتر بود.

تحریك سیستم ایمنی با پروبیوتیك‌ها احتمال می‌رود به واسطه افزایش لنفوسیتهای نوع T و فاگوسیت ها باشد [۲۸]. اینترلوکین-۶ توسط سلول‌های T و ماکروفاژها برای تحریک پاسخ ایمنی ترشح می‌شود [۲۹].

یکی از مکانیسم‌های عمل احتمالی و اثرات تمایزی پروبیوتیک‌ها بر لنفوسیت‌ها و سایتوکاین‌ها این است که دیواره سلولی پروبیوتیک‌ها دارای ترکیبات محرك بر سیستم ایمنی بدن مانند پپتیدوگلیکان‌ها می‌باشد که باعث افزایش فعالیت سلول‌های مرتبط با سیستم ایمنی در دیواره روده می‌شوند. سلول‌های دندریتی بیان کننده آنتی‌ژن، یکی از سلول‌های مهم در جدار روده هستند که به حضور پروبیوتیک‌ها جواب داده و با افزایش بیان سایتوکاین‌ها در نهایت باعث افزایش تعداد انواع سلول‌های T در بدن می‌شود [۳۰]. مطالعات همچنین آشکار ساخته اند که پروبیوتیکها میتوانند آپوپتوزیس را در لنفوسیت‌ها به تأخیر بیاندازند و از این طریق نیز باعث افزایش سطح لنفوسیت‌ها در خون شوند [۳۱].

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان داد که آنتی بیوتیک فسفومایسین و پروبیوتیک‌های مخمری اثری بر عملکرد گوساله-های شیرخوار هلشتاین نداشتند. باتوجه به اثر معنی‌دار مخلوط ساکارومایسس سرویزیه و ساکارومایسس بولاردی در این تحقیق بر روی آنزیم های آنتی‌اکسیدانی سوپر اکسید دیسموتاز و گلوتاتیون پراکسیداز و همچنین بیان ژن اینترلوکین-۶، می‌توان گفت که پروبیوتیک ها مخمری با تاثیر مثبت بر روی سیستم انتی اکسیدانی و سیستم ایمنی گوساله‌ها می‌توانند اهمیت این افزودنی‌ها را در برابر آنتی بیوتیک‌ها تقویت نمایند که کمک بزرگی به صنعت پرورش گاو خواهد بود.

منابع

[1] Slozhenkina M.I., Gorlov I.F., Shakhbazova O.P., Radjabov R.G., Ivanova N.V., Mosolova D.A., Knyazhechenko O.A., Poorghasemi M., Seidavi A. Productivity of steers of different genotypes: forecast based on interior indicators. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2020; 72 (6): 2279-2287.

[2] Muya M. C., Erasmus L. J., Miller K., Aperce C., Nherera F. V., Moshidi P.M. Performance of Holstein calves having free access to milk and dosed with Megasphaera elsdenii. *Sci. Agric*. 2017; 74: 189–194.

[3] Kolling G. J., Stivanin S. C. B., Gabbi A. M., Machado F. S., Ferreira A.L., Campos M.M., Tomich T.R., Cunha C.S., Dill S.W., Pereira L.G.R., Fischer V. Performance and methane emissions in dairy cows fed oregano and green tea extracts as feed additives. *J. Dairy Sci*. 2018; 101: 4221–4234.

[4] Furness J. B., Rivera L. R., Cho H. J., Bravo D.M., Callaghan B. The gut as a sensory organ. Natl. Rev. Gastroenterol. Hepatol. 2013; 10: 729-740.

[5] Klieve A. V., Hennessy D., Ouwerkerk D., Forster R. J., Mackie R. I., Attwood G. T. Establishing populations of *Megasphaera elsdenii* YE 34 and *Butyrivibrio fibrosolvens* YE 44 in the rumen of cattle fed high grain diets. J. Appl. Microbiol. 2003; 95: 621–630.

[6] Vakili A. R., Khorrami B., Mesgaran M. D., Parand E. The effects of thyme and cinnamon essential oils on performance, rumen fermentation, and blood metabolites in Holstein calves consuming high concentrate diet. *Asian-Australas. J. Anim. Sci*. 2013; 26: 935–944.

[7] Kertz A. F., Hill T. M., Quigley III J. D., Heinrichs A. J., Linn J. G., Drackley J. K. A 100-year review: Calf nutrition and management. *J. Dairy Sci*. 2017; 100:10151–10172.

[8] Gilling D. H., Ravishankar S., Bright K. R. Antimicrobial efficacy of plant essential oils and extracts against Escherichia coli. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng*. 2019; 54: 608–616.

[9] Cho H., Uehara T., Bernhardt, T. G. Beta-lactam antibiotics induce a lethal malfunctioning of the bacterial cell wall synthesis machinery. *Cell*. 2014; 159: 1300–1311.

[10] Simon O. Micro-Organisms as Feed Additives–Probiotics. *Adv. Pork Prod*. 2005; 16: 161-167.

[11] Moslemipur F., Moslemipur F., AND Mostafaloo Y. Effects of using probiotic and synbiotic in colostrum and milk on passive immunoglobulin transfer rate, growth and health parameters of calf. *J. Rumin. Res*. 2014; 4: 56-62.

[12] Salarmoini M., Salajegheh A., Salajegheh M. H., Afsharmanesh M. The effect of lavender

(*Lavandula angustifolia*) extract in comparison to antibiotic on growth performance, intestinal morphology, ileal microflora, antioxidant status and meat quality of broilers. *Iranian J. Appl. Anim. Sci*. 2019; 9 (4): 717-725.

[13] Donovan D. C., Franklin S. T., Chase C. C. L., Hippen A. R. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or enteroguard. *J. Dairy Sci*. 2002; 85: 947-950.

[14] Francois A. C. Mode of action of antibiotics on growth. *World Rev. Nutr. Diet*. 1962; 3: 21-27.

[15] Royan M. A review on the lactic acid bacteria probiotic in the control of coccidiosis, campylobacteriosis, and salmonellosis in broiler chickens. *Iranian J. Appl. Anim. Sci*. 2019; 9 (1): 1-8.

[16] Rajkowska K., Kunicka-Styczynska A., Rygala A. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* against human pathogens. *Food Technol. Biotechnol*. 2014; 50 (2): 230-236.

[17] Tovar-Ramirez D., Mazurais D., Gatesoupe J. F., Quazuguel P., Cahu C. L., Zambonino-Infante J. L. Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (Dicentrarchus labrax) larvae. *J. Aqua*. 2010; 300 (1): 142-147.

[18] Poorghasemi M., Chamani M., Mirhosseini S. Z., Sadeghi A. A., Seidavi A. Effect of probiotic and different sources of fat on performance, carcass characteristics, intestinal morphology and ghrelin gene expression on broiler chickens. *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg*. 2017; 24 (2): 169-178.

[19] SAS Institute. (2004). SAS®/STAT Software, Release 9.4. SAS Institute, Inc., Cary, NC. USA.

[20] Alugongo G. M., Xiao J. X., Chung, Y. H., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Wu, Z. H., Cao, Z. J. Effects of Saccharomyces cerevisiae fermentation products on dairy calves: Performance and health. *J. Dairy Sci*. 2017; 100: 1189-1199.

[21] Magalhaes V. J. A., Susca F., Lima F. S., Branco A. F., Yoon I., Santos J. E. P. Effect of Feeding Yeast Culture on Performance, Health, and Immunocompetence of Dairy Calves. *J. Dairy Sci*. 2008; 91 (4): 1497-1509.

[22] Morrison S. J., Dawson S., Carson A. F. The effects of mannan oligosaccharide and *Streptococcus faecium* addition to milk replacer on calf health and performance. *Livest. Sci*. 2020; 131: 292–296.

[23] Dolezal P., Dolezal J., Szwedziak K., Dvoracek J., Zeman L., Tukiendorf M., Havlicek Z. Use of Yeast Culture in the TMR of Dairy Holstein Cows. *Iranian J. Appl. Anim. Sci*. 2012; 2 (1): 51-56.

[24] Dehghan Banadaky M., Rajaei-Sharifabadi H., Vazirigohar M. A meta-analysis of the effect of probiotics administration on growth performance of suckling calves in Iran. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.* 2000; 10 (2): 213-219.

[25] Cruywagen C., Ina Jordaan W., Venter L. Effect of Lactobacillus acidophilus supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J. Dairy Sci*. 1996; 79: 483-486.

[26] Wang Y., Wu Y., Wang Y., Fu A., Gong L., Li W., Li Y. Bacillus amyloliquefaciens SC06 alleviates the oxidative stress of IPEC-1 via modulating Nrf2/Keap1 signaling pathway and decreasing ROS production. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016; 101: 1–12.

[27] Martarelli D., Verdenelli M. C., Scuri S., Cocchioni M., Silvi S., Cecchini C., Pompei P. Effect of a probiotic intake on oxidant and antioxidant parameters in plasma of athletes during intense exercise training. *Curr. Microbiol*. 2011; 62: 1689-1696.

[28] Liang Y., Hudson R. E., Ballou M. A. Supplementing neonatal Jersey calves with a blend of probiotic bacteria improves the pathophysiological response to an oral *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* challenge. *J. Dairy Sci*. 2020; 103 (8): 7351-7363.

[29] Poorghasemi M., Seidavi A.R., Qotbi A.A.A., Chambers J.R., Laudadio V., Tufarelli V. Effect of dietary fat source on humoral immunity response of broiler chickens. *European Poult. Sci*. 2015; 79: 1-8.

[30] Smits H., Engering A., Van der Kleij D., de Jong E., Schipper K., van Capel T., Zaat B. A. J., Yazdanbakhsh M., Wierenga E. A., van Kooyk Y., Kapsenberg M. L. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *Allergy J. Clin. Immunol*. 2005; 115 (6): 1260-1267.

[31] Scharek L., Guth J., Reiter K., Weyrauch K., Taras D. Influence of a probiotic *Enterococcus faecium* strain on development of the immune system of sows and piglets. *Vet. Immun. Immunopathol*. 2005; 105 (1): 151-161.

Journal of Developmental Biology
Vol. 14, No. 1, Winter 2022

The effect of fosfomycin, *Saccharomyces bulardii* and *Saccharomyces cerevisiae* on performance, antioxidant activity and expression of interleukin-6 gene in Holstein calves

Saber Sabooni, Mohammad Chamani*, Ali Asghar Sadeghi, Mehdi Amin-Afshar, Nasser Emam Jomeh Kashan

Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

* (Corresponding author): m.chamani@srbiau.ac.ir

Received: November 2021 Accepted: December 2021

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of fosfomycin antibiotic as well as yeast probiotics of *S. bulardii* and *S. cerevisiae* on performance, antioxidant activity and expression of interleukin-6 gene in Holstein calves. In order to test, 20 newborn Holstein calves were distributed in 5 treatments and 4 replications (each replication including 1 calf) for 60 days after feeding with colostrum in a completely randomized design from the age of 3 days. Experimental treatment diets include 1: control (without antibiotics and probiotics), 2: fosfomycin (0.165 g/kg BW), 3: milk-soluble *S. boulardii* (1 g/kg BW), 4: milk-soluble *S. cerevisiae* (1 g/kg BW) and 5: A mixture of *S. boulardii and S. cerevisiae* were dissolved in milk (1 g/kg BW each). The amount of feed intake, weight gain and feed conversion ratio of none of the treatments were not significantly different from the control ($P>0.05$). The amount of serum glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzymes as well as the amount of interleukin-6 gene expression in the whole period in calves that used a mixture of *S. boulardii and S. cerevisiae* had the highest significant difference with the control ($P<0.05$). In general, the use of a mixture of yeast probiotics had a greater effect on the antioxidant system and immune system of calves than their separate use and also compared to antibiotics in calves nutrition.

Keywords: fosfomycin, probiotics, interleukin-6, Holstein, performance.