ارزیابی تاثیر سویه‌های پروبیوتیک لاکتوباسیلی بر مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری پسماند غذایی در طیور

صادق چراغی سرای[1*]، سید عادل مفتخرزاده[2]، محمد فرهادیان[3] و افسون قدرتی[1]

تاریخ دریافت:۱۳۹۳/۰۵/۲۷
تاریخ تصویب:۱۳۹۴/۰۲/۲۳

چکیده

هدف از انجام این آزمایش در وهله اول، فرآوری پسماند غذایی با سویه‌های مختلف پروبیوتیک لاکتوباسیلوس، و سپس تعیین مقادیر انواع انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری بود. تیمارهای آزمایشی شامل یک تیمار شاهد (پسماند غذا بدون عمل‌آوری) و ۴ تیمار فرآوری شده پسماند غذا (به کمک افزودن ۴ سویه لاکتوباسیلوس شامل اسیدوفیلوس، روتری، کازئی و پلانتاروم) بود. برای محاسبه انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری از روش جایگزینی جیره پایه در سطوح صفر و ۱۵ درصد به کمک خروس‌های گوشتی سویه کاب با میانگین وزنی یکسان (۲۰±۲۷۵۰ گرم) استفاده گردید. هر تیمار آزمایشی به تغذیه ۷ قطعه خروس رسید و مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری (AME) و انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری تصحیح شده برای نیتروژن (AME_n) به روش جمع‌آوری کل فضولات تعیین شد. نتایج به دست آمده نشان داد که افزودن هر یک از گونه‌های لاکتوباسیلوس به پسماند سبب افزایش معنی‌داری در میانگین مقادیر AME و AME_n گردید (P<۰/۰۵). تیمار لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و شاهد به ترتیب با ۴۸/۱±۲۹۵۹ و ۶۲/۵±۲۷۷۵ کیلوکالری در کیلوگرم، بیشترین و کم‌ترین مقدار AME را نشان دادند. همچنین این دو تیمار بیشترین و کم‌ترین مقدار AME_n را به ترتیب با ۴۸/۶±۲۹۱۲ و ۶۲/۳±۲۷۳۰ کیلوکالری در کیلوگرم داشتند. از لحاظ بازده انرژی خام در بین نمونه‌های پسماند تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (P<۰/۰۵). ضرایب همبستگی مطالعه شده نشان داد در میان انواع انرژی قابل سوخت و ساز بین AME با AME_n و بین AMEDM با AME_nDM رابطه همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ وجود دارد. همچنین ضریب همبستگی بین انواع انرژی قابل سوخت و ساز با خاکستر، منفی و در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود. نتایج این مطالعه بیانگر این امر بود که ارزش غذایی و سطح انرژی پسماند غذایی فرآوری شده با سویه‌های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری، جهت تأمین نیازهای تغذیه‌ای جوجه‌های گوشتی، مناسب و قابل استفاده بوده و در جهت کاهش هزینه‌های خوراک طیور می‌توان از آن بهره برد.

واژه‌های کلیدی: انرژی قابل سوخت و ساز، لاکتوباسیلوس، پسماند غذایی، فرآوری میکروبی

۱- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم دامی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
۳- باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران
* نویسنده مسئول: صادق چراغی سرای s.cheraghi89@yahoo.com

مقدمه

محدودیت منابع تأمین خوراک طیور یکی از مهم‌ترین مشکلاتی است که در مسیر پیشرفت صنعت طیور در اکثر نقاط جهان وجود دارد. همین امر باعث شده است که توجه محققین به منابع غذایی غیر متداول جلب گردد. از جمله این منابع غیر مرسوم، پسماند غذایی می‌باشد که به صورت غذای باقی‌مانده در ظروف بعد از مصرف در هتل‌ها، رستوران‌ها، زندان‌ها، سازمان‌های نظامی و دولتی تعریف می‌شود (Sadao, 2005). از آنجایی‌که انرژی قابل سوخت و ساز حدود ۷۰ درصد هزینه خوراک و ۴۰ درصد هزینه کل تولید گوشت و تخم مرغ را به خود اختصاص می‌دهد (Sibbald,1982)، از اینرو در درجه اول، تعیین انرژی قابل متابولیسم و سپس ارائه راهکاری مناسب برای استفاده از پسماندهای غذایی مورد نظر در جیره طیور، می‌تواند گزینه مناسبی برای کاهش هزینه خوراک واحدهای پرورش طیور باشد (چراغی سرای، ۱۳۹۱). انرژی قابل متابولیسم نشان دهنده انرژی مصرف شده‌ای است که در فرایندهای متابولیکی به کار می‌رود. اندازه‌گیری این انرژی بر پایه روش تعادلی استوار است که در آن میزان انرژی مصرفی در طی یک دوره زمانی و انرژی دفع شده از طریق فضولات در طی همان مدت اندازه‌گیری می‌شود (پور رضا و همکاران، ۱۳۸۴). در رابطه با انرژی قابل متابولیسم پسماند غذایی، مطالعه‌ای بر روی جوجه‌های گوشتی انجام شد و مقادیر ۱۹۹۱ و ۲۹۰۵ کیلوکالری در کیلوگرم را به ترتیب برای انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری (AME) و انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری تصحیح شده برای نقطه صفر ازت (AME_n) گزارش گردید (Saki et al., 2006).

به دلیل احتمال فسادپذیری پسماندهای غذایی به‌هنگام استفاده در جیره طیور، اولین اقدام انجام یک روش فرآوری مناسب است. فرآوری حرارتی یکی از روش‌های پیشگیری از فساد و یا کاهش جمعیت میکروبی خوراک‌ها می‌باشد. محققین مختلف استفاده از دمای ۶۵ تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد را در مدت زمان حداقل ۲۰ دقیقه توصیه نموده‌اند (Sancho et al., 2004). روش دیگر استفاده از افزایش دهنده جمعیت میکروبی، اسیدهای آلی، پروبیوتیک‌ها، پری‌بیوتیک‌ها، آرومابیوتیک‌هاست که غالباً دارای منشأ بیولوژیک گیاهی و میکروبی می‌باشند (Kosin and Rakshit, 2006).

پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل غذایی متشکل از میکروب‌های زنده که مصرف آن به دلیل تغییر مطلوب در توازن میکروبی روده اثرات مفیدی در بدن حیوان می‌گذارد حائز اهمیت بوده و از متداول‌ترین گونه‌های مورد استفاده در محصولات پروبیوتیک می‌توان به گروه باکتری‌های لاکتوباسیلوس اشاره نمود (De-Angelis and Gobbetti, 2004). نمونه‌های لاکتوباسیل روی محیط‌های کشت انتخابی یا اختصاصی، قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی می‌باشند (Jin et al., 1998). محققین دیگر نیز (Avall and Palva, 2005 ; Parvez et al., 2006) اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیل‌ها را اثبات کرده و نشان دادند ترکیبات تولید شده با جرم مولکولیِ کم (نظیر اسید لاکتیک)، رشد پاتوژن‌های گرم منفی و مثبت را مهار می‌کند که نهایتاً مانع از رشد بسیاری از پاتوژن‌ها بیماری‌زا و میکروارگانیسم‌های مضر مواد

خوراکی می‌شود.

با توجه به اینکه فرآوری میکروبی پسماندهای غذایی علاوه بر ایجاد تغییر در فلور میکروبی روده حیوان مصرف کننده، می‌تواند ترکیبات شیمیایی و انرژی قابل سوخت و ساز آن را نیز تحت تأثیر قرار دهد، از اینرو تحقیق حاضر به منظور ارزیابی تأثیر ۴ گونه مختلف باکتری لاکتوباسیلوس بر مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری (AME) و همچنین انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری تصحیح شده برای ازت (AME_n) پسماند غذایی، جهت بکارگیری صحیح آن در جیره طیور انجام گردید.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های لازم برای این مطالعه از سلف سرویس مرکزی دانشگاه تبریز تهیه گردید. بخش اجرایی آن در سالن تحقیقات طیور، آزمایشگاه پاتوبیولوژی و آزمایشگاه تغذیه دام پیشرفته دانشگاه تبریز انجام گرفت. جهت هر بار نمونه‌گیری، نمونه‌ها طی دو هفته به صورت روزانه جمع‌آوری گردید (با رطوبت ۷۸/۷ درصد). سپس آسیاب شده و در آون خشک شدند و نهایتاً در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد جهت انجام آزمایشات لازم نگهداری شدند. پس از اتمام دوره جمع‌آوری نمونه‌ها، پسماند هر وعده غذایی به نسبت مساوی با دیگر وعده‌های غذایی مخلوط گردید تا اثر هر غذا محفوظ بماند. لازم به ذکر است نمونه‌های مورد آزمایش در طی مراحل تهیه نمونه، فاقد کپک‌زدگی بودند.

به منظور انجام مرحله میکروبیِ فرآوری نمونه‌های پسماند غذایی، چهار سویه باکتری لاکتوباسیل‌ها (لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری) از کلکسیون مرکز قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران به‌صورت آمپول‌های لیوفیلیزه تهیه شد.

Lactobacillus casei subsp 1608 (39392) ATCC

Lactobacillus plantarum 1058 (8014) ATCC

Lactobacillus acidophilus 1643 (20079) DSM

Lactobacillus reuteri 1655 (20016) DSM

سویه‌های مذکور پس از انتقال به آزمایشگاه در بافر PBS حل شده و سپس در داخل محیط آبگوشت MRS براث تلقیح شدند. این باکتری‌ها در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در محیط اختصاصی نوترینت براث نگهداری شده و در زمان آزمایش از کشت تازه ۲۴ ساعته در محیط کشت MRS براث و آگار با تعداد باکتری 10^8 CFU/ml استفاده گردید. از بین ۵ تیمار مورد آزمایش یک تیمار مربوط به نمونه خام (شاهد) و ۴ تیمار مربوط به نمونه‌های فرآوری شده بودند که در راستای تهیه تیمار میکروبی، نمونه‌های پسماند از قبل آسیاب و به‌صورت همگن مخلوط شده و در ۴ قسمت مجزا درون آون در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد تا بار میکروبی

خود غذا را به صفر رسانیده و بدین وسیله اثر باکتری تزریق شده محفوظ بماند. سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول مایع سویه‌های باکتری آماده شده با حفظ شرایط سترون و در محیط عاری از میکروب به یک کیلوگرم نمونه پسماند، اضافه و مخلوط گردید تا تراکم باکتری روی همه قسمت‌های نمونه یکنواخت باشد. در نهایت نمونه‌های مخلوط شده، جهت رشد و تکثیر باکتری‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه گذاری شده و شمارش باکتریایی انجام گرفت.

به منظور اندازه‌گیری انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری از بین ۱۲۰ قطعه خروس گوشتی سویه کاب، ۳۵ قطعه (با سن ۵۶ روزگی و میانگین وزنی ۲۰±۲۷۵۰ گرم) انتخاب و به منظور عادت‌دهی، به مدت ۵ روز به صورت تصادفی در قفس‌های انفرادی ۳ طبقه قرار داده شدند. هر یک از ۵ نمونه پسماند در سطوح صفر و ۱۵ درصد جایگزین جیره پایه، (مشابه جیره استفاده شده توسط (Schang et al., 1982; Farrell,1978) گردیدند (جدول ۱). هر جیره آزمایشی طی ۵ روز برای ۷ قطعه خروس به طور آزاد استفاده شد. پس از اتمام دوره عادت‌دهی، جهت تخلیه دستگاه گوارش، خروس‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرسنه نگاه داشته شدند. سپس به مدت ۴۸ ساعت به طور آزاد تغذیه شده و خوراک مصرفی آنها ثبت گردید. در طی ۴۸ ساعت بعدی با استفاده از سینی‌های مخصوص، کل فضولات جمع‌آوری و در ظروف پلاستیکی سربسته در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری گردید. بعد از اتمام دوره جمع‌آوری، ظروف پلاستیکی حاوی فضولات از فریزر خارج و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند. نمونه‌های فضولات جهت تبادل رطوبتی به مدت ۲۴ ساعت در هوای آزاد آزمایشگاه قرار گرفته و پس از توزین آسیاب گردید. در نهایت نمونه‌های آسیاب شده تا انجام تجزیه شیمیایی مجدداً در ظروف پلاستیکی سر بسته نگهداری شدند.

ماده خشک مطابق روش AOAC (۱۹۹۰)، نیتروژن به‌وسیله دستگاه کلدال مدل Foss 2300 Kjeltec و انرژی خام نمونه‌ها و فضولات با استفاده از بمب کالری‌متر آدیاباتیک مدل Labisco محاسبه گردید. از فرمول‌های زیر برای محاسبه انواع انرژی قابل سوخت و ساز استفاده گردید.

$$AME = [(F_i \times GE_f) - (E \times GE_e)] / F_i$$

$$AME_n = [(F_i \times GE_f) - (E \times GE_e) - (NR \times K)] / F_i$$

$$(NR = (F_i \times N_f) - (E \times N_e$$

F_i: میزان خوراک مصرفی بر حسب گرم

GE_f: میزان انرژی خام یک گرم خوراک (کیلوکالری)

E: کل فضولات دفعی در خروس‌های تغذیه شده (گرم)

GE_e: میزان انرژی خام یک گرم فضولات (کیلوکالری)

NR: میزان ابقاء نیتروژن

K: ۸/۲۲ کیلوکالری به ازای هر گرم نیتروژن

N_f: درصد نیتروژن خوراک

N_e: درصد نیتروژن فضولات

جدول ۱- ترکیب جیره غذایی پایه

اجزاء جیره	درصد
ذرت	۸۷/۸۴
کنجاله سویا	۴/۹۳
سنگ آهک	۱/۱۵
دی کلسیم فسفات	۱/۲۳
پودر ماهی	۳/۹۵
دی - ال متیونین	۰/۰۵
مکمل ویتامینی و مواد معدنی[1]	۰/۵
نمک طعام	۰/۳۵
ترکیبات مغذی	
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری در کیلوگرم)	۳۲۰۰
پروتئین (درصد)	۱۲

۱- هر کیلوگرم مکمل ویتامینه شامل: ۳۰۸۰۰۰۰ (IU) ویتامین A، ۱۳۲۰۰۰۰ (IU) ویتامین D_3، ۲۶۴۰ میلی‌گرم ویتامین E، ۲۲۰ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۸۸۰ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۱۷۶۰ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۱۷۶۰ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۲۲۰۰ میلی‌گرم کلسیم واحد آزمایش یتوتنات، ۸۸۰ میلی‌گرم نیاسین، ۴۴ میلی‌گرم اسیدفولیک، ۱۱۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید، ۵۰ میلی‌گرم آنتی اکسیدان، ۲۲۰۰۰ میکروگرم بیوتین و ۳۵۲۰ میکروگرم B_{12} بود.

- هر کیلوگرم مکمل معدنی شامل: ۱۳۲۰۰ میلی‌گرم آهن، ۲۶۴۰۰ میلی‌گرم روی، ۳۵۲۰ میلی‌گرم مس، ۲۶۴۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۶۰ میلی‌گرم ید، ۱۲۰ میلی‌گرم سلنیوم بود.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS ۹/۱ (۲۰۰۳) با رویه GLM در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۷ تکرار مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد و از رویه Corr برای محاسبه ضرایب همبستگی استفاده گردید.

نتایج و بحث

میانگین ترکیبات شیمیایی پسماند غذایی در جدول ۲ ارائه شده است. طبق نتایج به‌دست آمده، در بین سویه‌های لاکتوباسیلی بالاترین مقدار ماده خشک با ۴۱/۰۲ درصد مربوط به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و پایین‌ترین مقدار با ۳۸/۶۷ درصد مربوط به لاکتوباسیلوس کازئی بود. از لحاظ درصد پروتئین خام تفاوت معنی‌داری بین همه تیمارهای لاکتوباسیلی نسبت به تیمار شاهد مشاهده گردید ($P<۰/۰۵$)؛ لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با ۲۱/۴۰ درصد بیشترین مقدار را از این نظر داشت. همچنین این سویه بالاترین مقدار انرژی خام (۴۸۷۲/۶۱ کیلوکالری در کیلوگرم)، چربی خام (۱۹/۹۱ درصد)، و پایین‌ترین مقدار خاکستر (۳/۶۷ درصد) را در بین تیمارهای آزمایشی داشت که ارتباط این مقادیر با انرژی قابل متابولیسم در ادامه به تفصیل بحث خواهد شد.

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی پسماند غذایی به حالت خام و فرآوری شده با سویه‌های منتخب لاکتوباسیلی

تیمار[1]	انرژی خام (کیلوکالری در کیلوگرم)	پروتئین خام (درصد)	ماده خشک (درصد)	چربی خام (درصد)	خاکستر (درصد)
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۴۸۷۲/۶۱[a]	۲۱/۴۰[a]	۴۱/۰۲[a]	۱۹/۹۱[a]	۳/۶۷[d]
لاکتوباسیلوس کازئی	۴۶۲۵/۴۷[c]	۱۹/۵۱[b]	۳۸/۶۷[c]	۱۹/۲۰[b]	۳/۹۰[c]
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۴۵۷۷/۲۹[c]	۱۹/۹۵[b]	۳۸/۸۷[c]	۱۹/۰۱[bc]	۴/۰۲[b]
لاکتوباسیلوس روتری	۴۷۸۴/۵۷[b]	۲۱/۱۳[a]	۴۰/۰۲[b]	۱۹/۷۲[a]	۳/۷۱[d]
شاهد	۴۵۰۷/۳۳[d]	۱۸/۸۷[c]	۳۸/۷۸[c]	۱۸/۸۴[c]	۴/۱۲[a]
میانگین	۴۶۷۳	۲۰/۱۷	۳۹/۴۷	۱۹/۳۴	۳/۸۸
SEM	۱۹/۵۲	۰/۱۸	۰/۱۶	۰/۰۷	۰/۰۳

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین هاست ($P<۰/۰۵$).
۱. تعداد تکرار برای هر نمونه برابر ۵ بود.

باکتری‌های لاکتوباسیلوس پس از افزوده شدن به مواد خوراکی با افزایش توده سلولی خود، ترکیبات خوراک را مورد متابولیسم قرار داده و با تولید بیشتر باکتریوسین‌ها که ماهیت پروتئینی دارد باعث افزایش پروتئین خام می‌شوند (Angel et al., 2005). از طرفی بسیاری از سویه‌های لاکتوباسیلوس دارای S-layer می‌باشند که از واحدهای پروتئینی و گلیکوپروتئینی تشکیل شده‌اند. S-layer به عنوان لایه‌ای محافظ، همچنین برای حفظ شکل سلولی، به دام انداختن یون‌ها و مولکول‌ها، در خارجی‌ترین ساختار پوشش سلولی باکتری‌ها شناخته شده است. با رشد لاکتوباسیل‌ها در محیط فرآوری شده، بر جمعیت S-layerها افزوده شده و درصد پروتئین مواد فرآوری شده را ارتقا می‌دهد (Frece et al., 2005). لذا به نظر می‌رسد افزایش محتوای پروتئین در تیمارهای فرآوری شده در مقایسه با گروه شاهد ناشی از افزایش توده میکروبی و ساختارهای ویژه این باکتری‌ها باشد (جدول ۲).

با توجه به اینکه غشای اندامک‌های یاخته‌ای و کلیه سیستم‌های غشایی که در سلول وجود دارند از جنس لیپوپروتئین (دو لایه فسفولیپید و یک لایه پروتئین) می‌باشند (Drucker et al., 1995)، احتمالاً با افزایش توده سلولی باکتری‌های لاکتوباسیلی در حین فرآوری، مقدار فسفولیپید موجود نیز افزایش می‌یابد. از اینرو هر سویه‌ای که رشد توده سلولی باکتریایی بیشتری داشته باشد به همان نسبت مقدار فسفولیپید (فسفوگلیسرید و اسفنگولیپید) موجود در غشای سلول را افزایش داده و از این طریق می‌توان افزایش چربی خام ماده غذایی فرآوری شده را تا حدی پیش‌بینی کرد.

جدول ۳- تاثیر سویه‌های منتخب لاکتوباسیلی بر مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری و تصحیح شده نمونه‌های پسماند غذایی

تیمار	AME[1]	AME_n[2]
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۲۹۵۹^{a} ±۴۸/۱	۲۹۱۲^{a} ±۴۸/۶
لاکتوباسیلوس کازئی	۲۸۵۸^{bc} ±۴۳/۱	۲۸۰۷^{b} ±۴۳/۶
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۲۸۲۳^{cd} ±۵۱/۷	۲۷۷۶^{bc} ±۵۲/۲
لاکتوباسیلوس روتری	۲۹۱۱^{ab} ±۵۲/۱	۲۸۶۴^{a} ±۵۲/۸
شاهد	۲۷۷۵^{d} ±۶۲/۵	۲۷۳۰^{c} ±۶۲/۳

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین هاست (P<۰/۰۵).

میانگین مقادیر انرژی قابل متابولیسم ظاهری نمونه‌های خام و فرآوری شده در جدول ۳ ارائه شده است. در بین تیمارهای آزمایشی تیمار مربوط به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با ۴۸/۱±۲۹۵۹ کیلوکالری در کیلوگرم و تیمار شاهد با ۶۲/۵±۲۷۷۵ کیلوکالری در کیلوگرم به ترتیب بیشترین و کم‌ترین مقدار را برای AME نشان دادند. تمامی سویه‌های مورد استفاده تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد داشتند (P<۰/۰۵). در بین تیمارهای لاکتوباسیلی کم‌ترین مقدار با ۵۱/۷±۲۸۲۳ کیلوکالری در کیلوگرم مربوط به تیمار لاکتوباسیلوس پلانتاروم بود. در مورد مقادیر n_{AME}، تیمار مربوط به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری به ترتیب با ۴۸/۶±۲۹۱۲ و ۵۲/۸±۲۸۶۴ کیلوکالری در کیلوگرم بالاترین میانگین را در بین سویه‌های لاکتوباسیلی نسبت به تیمار شاهد (با ۶۲/۳±۲۷۳۰) داشتند (P<۰/۰۵).

بالا بودن انواع انرژی قابل سوخت و ساز در تیمارهای حاوی چربی بالای پسماند غذایی را می‌توان اینگونه تفسیر کرد که بازده انرژی قابل متابولیسم در چربی‌ها به دلیل کم بودن حرارت افزایشی بیشتر است، بنابراین انتظار می‌رود عملکرد نهایی طیوری که از تیمارهای حاوی چربی بالا استفاده کرده‌اند، بیشتر باشد (Latshaw and Moritz, 2009). از آنجایی که چربی خام و پروتئین خام تیمارهای لاکتوباسیلی بیشتر از تیمار شاهد بوده، و با توجه به رابطه مثبت انرژی قابل متابولیسم با درصد پروتئین و چربی خوراک، لذا بیشتر بودن مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز تیمارهای فرآوری شده نسبت به تیمار شاهد (بدون فرآوری) قابل پیش‌بینی است. متاسفانه جداول استاندارد غذایی فاقد اطلاعاتی درباره مقادیر انرژی قابل متابولیسم پسماند غذایی بوده و لذا نمی‌توان نتایج بدست آمده در این آزمایش را با آن مقایسه کرد. در پژوهشی مشابه (Saki et al., 2006)، در گزارش خود مقدار AME پسماند غذایی را ۱۹۹۱ و مقدار AME_n آن را ۲۹۰۵ کیلوکالری در کیلوگرم بیان کردند. علت تفاضل بیشتر مقدار این دو انرژی در تحقیق آنها نسبت به تحقیق حاضر، می‌تواند به دلیل وجود ترکیبات متنوع مثل استخوان، سبزیجات، میوه، گوشت، برنج، چاشنی‌ها و غیره در نمونه‌های آنها باشد ولی در مطالعه حاضر نمونه‌ها از پسماندهای غذایی باقی‌مانده در بشقاب‌های رستوران جمع‌آوری شده بودند.

نمونه‌های پسماند جمع‌آوری شده همچنین حاوی حبوباتی مثل نخود، لپه و لوبیا بودند. به‌طور کلی دیواره

سلولی حبوبات و الیاف سبزیجات، سد فیزیکی در برابر تماس آنزیم‌های هضمی و مواد مغذی موجود در سلول‌ها محسوب می‌شوند و می‌توانند باعث توقف و یا تأخیر هضم مواد مغذی در قسمت انتهایی دوازدهه شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها و سایر افزودنی‌ها با کاهش ویسکوزیته محتویات دستگاه گوارش می‌تواند هضم و جذب مواد مغذی این خوراک را بهبود بخشد (Cavit, 2004). با توجه به این مسئله، پایین بودن مقادیر انرژی قابل سوخت و ساز تیمار شاهد نسبت به تیمارهای فرآوری شده که در آن از هیچ‌گونه افزودنی استفاده نشده بود منطقی می‌باشد.

علت اختلاف در مقادیر بدست آمده بین انرژی قابل متابولیسم سویه‌های لاکتوباسیلی تحقیق حاضر را می‌توان به توانایی متفاوت آنها در تولید متابولیت‌های مختلف نسبت داد که قادر به ارتقاء ارزش تغذیه‌ای خوراک می‌باشند. با توجه به اینکه ثابت گردیده مقدار پروتئین جیره نقش عمده‌ای در سرعت تخلیه معده ایفا می‌نماید، سطح پایین پروتئین در جیره سبب حرکت سریع غذا از معده شده، در حالی‌که خوراکی با میزان پروتئین بالا سبب تحریک فرآیندهای پس‌نورد شده و تخلیه معده کندتر انجام می‌گیرد. در حالت دوم زمان بیشتری برای دناتوراسیون و افزایش حلالیت پروتئین‌های خام مصرف شده وجود خواهد داشت (Huang et al., 2005). از آنجائی‌که تیمار لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری مقدار پروتئین خام پسماند غذایی را بیشتر از سویه‌های دیگر بهبود داده‌اند، با افزایش میزان هضم و جذب پسماند فرآوری شده، مقدار بالای AME و AME_n این دو تیمار قابل پیش‌بینی می‌باشد. علاوه بر این عملکرد ثابت شده لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری مبنی بر اثر تحریک کنندگی بالای آنزیم‌های گوارشی و افزایش هضم خوراک فرآوری شده توجیهی بر نتایج بدست آمده می‌باشد (Soccol et al., 2010).

جدول ۴- ضرایب همبستگی بین AME و AMEn با ترکیبات شیمیایی نمونه پسماند غذا

	DM	Ash	CP	EE
AME	۰/۵۹	-۰/۸۵	۰/۷۵	۰/۷۴
P-value	۰/۰۰۱*	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱
AME_n	۰/۶۰	-۰/۸۴	۰/۷۵	۰/۷۳
P-value	۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱

* علامت ستاره نشان دهنده سطوح احتمال است (در محاسبه ضرایب همبستگی تعداد تکرار برای هر نمونه برابر ۵ بود.).

ضرایب همبستگی بین AME و AME_n با ترکیبات شیمیایی پسماند غذایی در جدول شماره ۴ نشان داده شده است. ضریب همبستگی بین هر دو نوع انرژی قابل متابولیسم ظاهری با خاکستر منفی و در سطح ۰/۰۰۱ معنی‌دار بود، چرا که با افزایش سهم بخش خاکستر، قابلیت هضم سایر بخش‌های ماده خوراکی از جمله چربی خام، نشاسته و پروتئین خام کاهش می‌یابد (Latshaw & Moritz., 2009).

به عبارت دیگر رابطه منفی همبستگی بین خاکستر با انرژی قابل سوخت و ساز از این امر منشاء می‌گیرد که با افزایش سهم مواد معدنی در خوراک، بخش مواد آلی که قابل متابولیسم می‌باشد تنزل یافته و سبب کاهش انرژی

قابل سوخت و ساز می‌گردد. همچنین بین پروتئین خام، چربی خام و ماده خشک تیمارهای آزمایشی با انواع انرژی قابل سوخت وساز رابطه مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ وجود داشت.

در جدول ۵ تاثیر سویه‌های منتخب لاکتوباسیلوس بر صور مختلف انرژی بر حسب ماده خشک برای نمونه‌های پسماند غذایی گزارش شده است. بر اساس نتایج بدست آمده، تفاوت معنی‌داری از این نظر بین سویه‌های لاکتوباسیلی با تیمار شاهد مشاهده گردید (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری بر حسب ماده خشک (AMEDM[1]) و انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری تصحیح شده بر حسب ماده خشک (AME_nDM[2]) به ترتیب با ۱۲۱۳/۹±۴۸/۱ و ۱۱۹۴/۸±۴۸/۶ کیلوکالری در کیلوگرم مربوط به تیمار لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود. با علم به اینکه خوراک طیور اکثراً به‌صورت ماده خشک بیان می‌شود (Sadao, 2005)، اهمیت و کاربرد استفاده از AMEDM یا AME_nDM به این دلیل است که بیان نکردن انرژی قابل متابولیسم ظاهری به‌صورت ماده خشک برای خوراک‌هایی مثل پسماند غذایی با نمونه گیری‌های متفاوت (که می‌تواند درصد رطوبت بالایی داشته باشد)، نمی‌تواند معیار دقیقی برای استفاده از انرژی آن‌ها به هنگام تنظیم جیره غذایی باشد. قابل ذکر است میانگین درصد رطوبت نمونه‌های مطالعه حاضر ۷۸/۷ درصد بود.

بالاترین مقدار قابلیت متابولیسم ظاهری ماده خشک (ADMM)[3] مربوط به تیمار لاکتوباسیلوس کازئی با ۵۲/۴±۱/۱ درصد بود. همچنین بازده انرژی خام در بین تیمارهای آزمایشی تفاوت آماری معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵)، Dale (1992)، بازده انرژی خام را به صورت تقسیم نمودن انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری تصحیح شده بر انرژی خام (AME_n/GE[4]) تعریف نمود که به نوعی نشانگر قابلیت متابولیسمی خوراک می‌باشد. به عبارت دیگر قابلیت متابولیسمی معیار مناسبی از انرژی خام قابل دسترس برای تولید می‌باشد. Latshaw and Moritz (۲۰۰۹) نیز قابلیت متابولیسم بالاتر یک خوراک را نشانه داشتن محتوای بالاتری از ترکیبات آلی که قابل سوخت و ساز در بدن طیور می‌باشد، بیان کردند.

جدول ۵- تاثیر سویه‌های منتخب لاکتوباسیلی بر میانگین مقادیر ADMM، AMEnDM، AMEDM و AMEn/GE نمونه پسماند

تیمار	AMEDM	AME_nDM	ADMM	AME_n/GE
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	۱۲۱۳/۹^{a} ±۴۸/۱	۱۱۹۴/۸^{a} ±۴۸/۶	۴۹/۱^{b}±۱/۳	۰/۶۰۳ ±۰/۰۰۵
لاکتوباسیلوس کازئی	۱۱۰۳/۲^{c} ±۴۳/۱	۱۰۸۵/۳^{c} ±۴۳/۶	۵۲/۴^{a} ±۱/۱	۰/۶۱۵ ±۰/۰۰۸
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	۱۰۹۷/۱^{cd} ±۵۱/۶	۱۰۷۸/۹^{cd} ±۵۲/۲	۵۲/۱^{a} ±۰/۱	۰/۶۱۱ ±۰/۰۱۳
لاکتوباسیلوس روتری	۱۱۶۵/۲^{b} ±۵۲/۱	۱۱۴۶/۵^{b} ±۵۲/۸	۵۱/۷^{a} ±۰/۵	۰/۶۰۷ ±۰/۰۱۱
شاهد	۱۰۷۶/۴^{d} ±۶۲/۵	۱۰۵۸/۵^{d} ±۶۲/۳	۵۲/۱^{a} ±۱/۱	۰/۶۱۴ ±۰/۰۰۹

حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین هاست (P<۰/۰۵).

1- Apparent Metabolizable Eenergy dry matter

2- Nitrogen corrected Apparent Metabolizable Energy dry matter

3- Apparent Metabolizable dry matter

4- Nitrogen corrected Apparent Metabolizable Energy dry matter / Gross Energy

در ارتباط با تأثیر فرآوری میکروبی بر صور مختلف انرژی، (Schneitz et al, 1998) بیان کردند ابقای نیتروژن و انرژی قابل متابولیسم ظاهری در جوجه‌هایی که از کشت‌های میکروبی استفاده کرده بودند، بیشتر بود. آن‌ها اظهار نمودند کشت‌های میکروبی از طریق پدیده حذف رقابتی و کاهش در ویسکوزیته روده‌ای سبب کاهش جمعیت میکروبی مضر در روده شده که نتیجه آن افزایش دسترسی مواد مغذی جیره برای حیوان میزبان خواهد بود. همچنین باکتری‌های لاکتوباسیلوس از طریق افزایش اسید لاکتیک و تولید بوتیرات و تحریک تقسیم میتوز، موجب افزایش طول و پهنای روده شده، لذا میزان جذب مواد غذایی افزایش می‌یابد.

به عقیده Anil and Harjinder (۲۰۰۷)، گونه‌های لاکتوباسیل‌ها با تشکیل لایه محافظ هیدروژل بر روی خود سرعت نفوذ شیره معده به درون سلول‌های خود را کاهش داده و در نتیجه طول عمر بیشتر و مدت زمان اثربخشی بیشتری روی هضم و جذب خوراک خواهند داشت. با توجه به مطالب مذکور، نتایج سایر مطالعات یاد شده می‌تواند تأییدی بر یافته‌های بدست آمده در پژوهش حاضر، مبنی بر تأثیر مثبت فرآوری میکروبی بر مقادیر انرژی قابل متابولیسم باشد.

ضرایب همبستگی بین ADMM، AME_nDM،AMEDM، AME_n، AME و AME_n/GE در جدول ۶ نشان داده شده است که طبق نتایج بدست آمده در میان انواع انرژی قابل سوخت و ساز ظاهری بین AME با AME_n و بین AMEDM با AME_nDM رابطه همبستگی مثبت و معنی‌داری در سطح ۰/۰۰۱ وجود دارد.

جدول ۶- ضرایب همبستگی بین AMEn/GE، ADMM، AMEnDM، AMEDM، AMEn، AME

	AME	AME_n	AMEDM	AME_nDM	ADMM	AME_n/GE
AME	۱/۰۰					
P-value	–					
AME_n	۰/۹۸	۱/۰۰				
P-value	<۰/۰۰۱*	–				
AMEDM	۰/۸۹	۰/۹۰	۱/۰۰			
P-value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	–			
AME_nDM	۰/۸۹	۰/۹۱	۰/۹۸	۱/۰۰		
P-value	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	–		
ADMM	−۰/۵۴	−۰/۵۲	−۰/۶۲	−۰/۶۱	۱/۰۰	
P-value	۰/۰۰۸	۰/۰۰۲	<۰/۰۰۱	<۰/۰۰۱	–	
AME_n/GE	۰/۰۹	۰/۱۰	−۰/۱۹	−۰/۱۹	۰/۱۶	۱/۰۰
P-value	۰/۵۷	۰/۵۶	۰/۲۵	۰/۲۶	۰/۳۳	–

* علامت ستاره نشان دهنده سطوح احتمال است.

Xiccato et al. (2003)، بیان کردند عدم معنی‌دار شدن همبستگی بین انرژی قابل سوخت وساز ظاهری خوراک با محتوای نشاسته و کربوهیدرات، بیانگر آن است که انرژی‌زایی آن بیشتر تحت تأثیر سایر ترکیبات قرار می‌گیرد. به‌طوری‌که اثر و نقش آن قسمت‌ها در تولید انرژی مهم‌تر و بیشتر از تأثیر محتوای نشاسته و یا قندهای محلول

است. از نتایج آن‌ها می‌توان این‌گونه استدلال کرد که همبستگی بین بخش کربوهیدرات با انرژی قابل متابولیسم در سطح پایینی بوده و بخش پروتئینی و چربی اقلام خوراکی با داشتن همبستگی مثبت و بخش خاکستر با داشتن همبستگی منفی، نقش بالایی را در تعیین انرژی خام و صور مختلف انرژی قابل سوخت و ساز دارند. با توجه به موارد یاد شده، وجود همبستگی بالا بین چربی و پروتئین خوراک با انواع انرژی قابل سوخت و ساز، قابل پیش‌بینی می‌باشد. قابل ذکر است که همبستگی بالا بین مقادیر انرژی قابل متابولیسم و ترکیبات شیمیایی خوراک، صحت و امکان ارائه معادلات و طراحی شبکه‌های عصبی را به منظور برآورد انرژی قابل سوخت و ساز از روی ترکیبات شیمیایی افزایش می‌دهد (Roush et al., 2006).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که با انجام فرآوری میکروبی پسماند غذایی، مقادیر انواع انرژی قابل متابولیسم ظاهری افزایش قابل ملاحظه‌ای نسبت به تیمار خام (شاهد) داشت و در بین سویه‌های استفاده شده، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری غنی بیشترین تأثیر را از این نظر داشتند. با توجه به اینکه مقدار انرژی نمونه‌های پسماند غذایی در حدی است که قابل جایگزین در خوراک طیور می‌باشد، استفاده از آن در جیره غذایی دارای ارزش اقتصادی بالایی بوده و هزینه‌های تغذیه‌ای واحدهای طیور را به‌طور قابل ملاحظه‌ای کاهش می‌دهد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از زحمات آقای دکتر محمود صحرایی و همچنین مسئولین محترم آزمایشگاه تغذیه دام پیشرفته و آزمایشگاه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱. پور رضا ج.، صادقی ق. و مهری م. ۱۳۸۴ . تغذیه طیور اسکات (ترجمه). انتشارات ارکان دانش.

۲. چراغی سرای ص. ۱۳۹۱. اثر شیوه‌های مختلف فرآوری بر انرژی قابل سوخت و ساز حقیقی پسماندهای رستوران در جوجه‌های گوشتی. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

3. Angel R., Dalloul R.A. and Doerr J. 2005. Performance of broiler chickens fed diets supplemented with a direct-fed microbial. Poultry Science. 84: 1222–1231.

4. Anil K.A. and Harjinder S. 2007. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. Trends in Food Science & Technology. 18: 240-251.

5. AOAC. 1990. Official Methods of Analysis, 15th Edition. Association of Official Analytical Chemists.

6. Avall-Jaaskelainen S. and Palva A. 2005. Lactobacillus surface layers and their applications. FEMS Microbiology Reviews. 29: 511– 529.

7. Cavit A. 2004. Effect of dietary probiotic supplementation on growth performance in the rock partridge. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 28: 887-891.

8. Dale N.M. 1992. True metabolizable energy of feather meal. Journal of Applied Poultry Research. 1:331–334.

9. De-Angelis M. and Gobbetti M. 2004. Environmental stress responses in Lactobacillus: a review. Proteomics journal. 4: 106-122.

10. Drucker D.B., Megson G., Harty D.W.S., Riba I. and Gaskell S.J. 1995. Phospholipids of Lactobacillus spp. Journal of Bacteriology. 77: 6304-6308.

11. Farrell D.J. 1978. Rapid determination of ME of feeds using cockerels. British Poultry Science. 19: 303-308.

12. Frece J., Kos B., Svetec I.K., Zgaga Z., Mrsa V. and Suskovic J. 2005. Importance of S-layer proteins in probiotic activity of Lactobacillus acidophilus M92. Journal of Applied Microbiology. 98: 285-292.

13. Huang R.L., Yin Y.L., Wu G.Y., Zhang Y.G., Li T.J., Li L.L., Li M.X., Thang Z.R., Zhang J., Wang B., He J.H. and Nie X.Z. 2005. Effects of dietary oligochitosan supplementation on ileal digestibility of nutrients and performance in broilers. Poultry Science. 84: 1383-1388.

14. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah N. and Jalaludin S. 1998. Growth performance, intestinal microbial populations, and serum cholesterol of broilers fed diets containing Lactobacillus cultures. Poultry Science. 77: 1259-1265.

15. Kosin B. and Rakshit S.K. 2006. Microbial and processing criteria for production of probiotics: a review. Food Technology and Biotechnology. 44: 371-379.

16. Latshaw J.D. and Moritz J.S. 2009. The partitioning of metabolizable energy by broiler chickens. Poultry science. 88: 98-105.

17. Parvez S. Malik K.A. Ahkang S. and Kim H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology. 100: 1171–1185.

18. Roush W.B., Dozier W.A. and Branton S.L. 2006. Comparision of Gompertz and neural networks models of broiler growth. Poultry Science. 85: 794–797.

19. Sadao K. 2005. Dehydrated kitchen waste as a feedstuff for laying hens. International Journal of Poultry Sciences. 4: 689-694.

20. Saki A.A., Tabatabie M.M., Ahmadi A., Hossenin Sayer S.A., Mirzayi S. and Kiani N. 2006. Nutritive value, metabolizable energy and viscosity of kitchen waste on broiler chicken performance. Journal of Biological Sciences. 9: 1970-1974.

21. Sancho P., Pinacho A., Ramos P. and Tejedor C. 2004. Microbiological characterization of food residues for animal feeding. Waste Management. 24: 919-926.

22. SAS. 2003. Statistical analysis system: A User's Guide. Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC.

23. Schang M.J. Hamilton R.M.G. 1982. Comparison of two bioassays using adult cocks and four indirect methods for estimating the ME content of different feeding stuffs. Poultry Science. 61: 1344-1353.

24. Schneitz C., Kiskinen T., Toivonen V. and Nasi M. 1998. Effect of BROILAC on the physiochemical conditions and nutrient digestibility in the gastrointestinal tract of broilers. Poultry Science. 77: 426–432.

25. Sibbald I.R. 1982. Metabolizable energy evaluation of poultry diets. Recent Advances in Animal Nutrition. Ed. Haresign and Lewis. Publ. Butterworths, London.

26. Soccol C.R., Souza V.L.P., Spier M.R, Medeiros A.B.P., Yamaguishi C.T., Dea Lindner J., Pandey A and Thomaz-Soccol V. 2010. The potential of probiotics - a review. Food Technology and Biotechnology. 48: 413–434.

27. Xiccato G., Trocino A., De Boever J.L., Maertens L., Carabano R., Pascual J.J. 2003. Prediction of chemical composition, nutritive value and ingredient composition of European compound feeds for rabbits by near infrared reflectance spectroscopy. Animal Feed Science Technology. 104: 153–168.

Evaluation of the effect of Lactobacillus probiotic strains on the apparent metabolizable energy content of food waste in poultry

S. Cheraghi Saray[1]*, S.A. Moftakharzadeh[2], M. Farhadian[3] and A. Ghodrati[1]

Received Date: 18/08/2014

Accepted Date: 13/05/2015

Abstract

The aim of this study was primarily to use Lactobacillus strains for processing of food waste and then was to determine apparent metabolizable energy (AME) of food waste. Five experimental treatments included: control (raw food waste without any processing) and four processed treatments (by adding 4 Lactobacillus strains included: L.acidophilus, L.reuteri, L.casei and L.plantarum). A basal diet was formulated and substituted with 0 and 15 percent level of each five samples of food waste to evaluate their AME. Each treatment was fed to 7 broilers roosters (with average weight of 2750g±20). AME and nitrogen corrected apparent metabolizable energy (AMEn) content were determined with total excreta collection method. The results showed that Lactobacillus addition to the waste significantly increased AME and AMEn of the food waste ($P<0.05$). Lactobacillus acidophilus and control treatment showed the highest and the lowest amount of AME respectively with 2959±48.1 and 2775±62.5 kcal/kg. Also these two treatments had the highest and the lowest content of AMEn respectively with 2912±48.6 and 2730±62.3 kcal/kg. Gross energy efficiency among waste samples didn't show any significant differences ($P>0.05$). There was a significant positive correlation in 0.001 percent substitution level between AME and AMEn and between AMEDM and AMEnDM. Also there was a significant negative correlation in 0.001 percent substitution level between kinds of metabolizable energy and ash. The results showed that restaurant waste processed by Lactobacillus acidophilus strain and Lactobacillus reuteri was rich of available energy and it is suggested that could be used in order to decrease the poultry feed expenditure.

Keywords: Metabolizable energy, Lactobacillus, Food waste, Microbial processing

1. Young Researchers and Elite Club, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Animal Science, Agriculture and Natural Resources Pardis, University of Tehran, Karaj, Iran
3. Young Researchers and Elite Club, Khoy Branch, Islamic Azad University, Khoy, Iran
*Corresponding Author: E-mail address: s.cheraghi89@yahoo.com