دوره شانزدهم ـ شماره ۱ ـ بهار ۱۳۹۹
DOI: 10.22055/ivj.2019.161346.2101

بررسی تأثیر پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* بر میزان تولید شیر و شاخص‌های مهم اقتصادی و بهداشتی شیر خام در گاو هولشتاین

بهاره ایزدی[۱]، مهدی محبی‌فانی[۲]، سعید حسین‌زاده[۳*]، سیدشهرام شکرفروش[۴]، آریا رسولی[۵] و سعید نظیفی[۶]

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۲/۲

چکیده

باکتری *باسیلوس کوآگولانس* به عنوان یک پروبیوتیک اسپوردار مقاوم به شرایط محیطی و دستگاه گوارش معرفی شده است. توانایی تشکیل اسپور این پروبیوتیک را در برابر استرس‌های تکنولوژیکی در فرآیند تولید و نگهداری مقاوم می‌سازد. هدف از مطالعه‌ی حاضر بررسی اثر باکتری *باسیلوس کواگولانس* (باسیلاک®) به صورت افزودنی جیره‌ی غذایی گاو بر روی سطح تولید، ماده‌ی خشک، درصد چربی، پروتئین خام، کازئین، پروتئین سرم و نیز بار میکروبی و تعداد سلول‌های سوماتیک شیر به عنوان شاخص‌های اقتصادی و بهداشتی شیر بوده است. این مطالعه بر روی ۳۳ رأس گاو شیری نژاد هلشتاین در دو گروه شاهد (۱۶ رأس) و آزمایش (۱۷ رأس) صورت گرفت. پروبیوتیک، روزانه به مدت ۶۳ روز به میزان ۲ گرم به ازاء هر گاو به غذا اضافه شد و هر ۲۱ روز، در سه نوبت از شیرگاوها نمونه‌گیری به عمل آمد. افزودن پروبیوتیک *باسیلوس کواگولانس* بر میزان تولید، ماده‌ی خشک، چربی، لاکتوز، پروتئین سرم شیر، تعداد سلول‌های سوماتیک و بار میکروبی شیر تأثیری نداشت، اما سطح پروتئین و کازئین شیر در گروه آزمایش با مصرف این پروبیوتیک روندی افزایشی نشان داد. در روزهای ۴۲ و ۶۳ مطالعه سطح پروتئین در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود. سطح کازئین نیز در گروه آزمایش در روزهای ۴۲ و ۶۳ بیش‌تر بود. استفاده از پروبیوتیک *باسیلوس کوآگوانس* می‌تواند به عنوان یک عامل افزایش دهنده‌ی فاکتورهای کیفی شیر و بهبود کیفیت فرآورده‌های لبنی سودمند باشد.

کلمات کلیدی: شیر، پروبیوتیک، *باسیلوس کواگوانس*، پروتئین و کازئین، گاو

مقدمه

شاخص‌های اقتصادی و بهداشتی شیر شامل حجم و درصد پروتئین و چربی، بار میکروبی و تعداد سلول‌های سوماتیک، از نظر تأثیر بر قیمت محصول خام و بهداشت عمومی جامعه، همواره مورد نظر تولیدکنندگان و مراکز فرآوری شیر هستند (Harding 2007, Le Roux et al. 2003). هرچند مراحل دوشش، نگهداری و حمل شیر در کیفیت آن از نظر آلودگی میکروبی تأثیر به سزایی دارد، بخش مهمی از کیفیت شیر به مراحل قبل از دوشش یعنی مراحل تولید آن در بدن گاو باز می‌گردد که تحت تأثیر سلامت عمومی حیوان، ورم پستان، تغذیه و محیط است. بدین روی، شاخص‌های اقتصادی و بهداشتی شیر، در صورت تفسیر مناسب، نشان دهنده‌ی وضعیت سلامت حیوان و مدیریت بهداشت گله در مراحل تولید شیر نیز هستند. برای بهبود کیفیت شیر خام روش‌های گوناگونی

[۱] دانش آموخته دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۲] استاد گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۳*] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران hosseinzadeh@shiarazu.ac.ir (نویسنده‌ی مسئول)
[۴] استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۵] دانشیار گروه مدیریت بهداشت دام، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
[۶] استاد گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

معرفی شده است. برای مثال افزودنی‌هایی مثل بافرها و آنالوگ‌های متیونین هیدروکسی برای افزایش درصد چربی شیر به غذای گاوها اضافه شده است (Lundquist et al. 1983, Chaiupa and Schneider 1985). در مطالعه‌ای با افزودن مونسین به جیره‌ی گاوهای شیری در دوره‌ی انتقال به این نتیجه رسیدند که این ماده می‌تواند موجب بهبود متابولیسم انرژی دام شود و روند کاهشی پروتئین و چربی شیر را پس از زایمان کند سازد یا روند افزایشی آن‌ها را تسریع کند (Shekarforoush et al. 2007). استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان افزودنی غذا برای ایجاد تغییر در شرایط دستگاه گوارش یکی از این روش‌ها است که خطراتی مانند مقاومت دارویی یا باقی‌مانده‌ی دارویی در گوشت و شیر را همراه ندارد.

پروبیوتیک‌ها بر اساس تعریف سازمان خوار و بار جهانی و سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۰۲ میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به میزان مناسب تجویز شوند می‌توانند بر میزبان اثرات مثبت داشته باشند (FAO/WHO, 2002) و در دو دسته‌ی قارچی (مانند *ساکارومایسس سرویزیه*، *آسپرژیلوس اُریزی*) و باکتریایی (مانند گونه‌های مختلف *بیفیدوباکتریوم*، *لاکتوباسیلوس‌ها*، *باسیلوس‌ها*، *استرپتوکوکوس*، *پدیوکوکوس* و *انتروکوکوس*) قرار می‌گیرند (Fuller 2012). پروبیوتیک-های باکتریایی با تولید انواعی از مواد ضدمیکروبی مانند اسیدهای ارگانیک، باکتریوسین‌ها، دی‌استیل‌ها، آنتی-بیوتیک‌ها و پراکسید هیدروژن (Vandenbergh 1993, Holzapfel et al. 1995, Rolfe 2000) از رشد عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند. رقابت با عوامل بیماری‌زا برای اتصال به گیرنده‌ها در دستگاه گوارش (Lee et al. 2003)، مصرف منابع غذایی مورد نیاز عوامل بیماری‌زا (Guillot 2003)، تولید مواد مغذی از جمله اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها یا سایر عوامل رشد میکروارگانیسم‌های مفید در دستگاه گوارش میزبان، تولید و تحریک تولید آنزیم‌ها، سم زدایی از ترکیبات نامطلوب (Retta 2016) و متعادل کردن شرایط دستگاه ایمنی (Isolauri et al. 2001) و تحریک پاسخ ایمنی (Dicks and Botes 2010) از راه‌های عمل این پروبیوتیک‌ها است. باکتری‌های اسپوردار تولید کننده لاکتیک اسید (SFLAB) نظیر *باسیلوس کواگولانس*، *اسپورولاکتوباسیلوس* دسته‌ای از پروبیوتیک‌های باکتریایی هستند که مانند باسیلوس‌ها، اسپوردار و متحرک و مانند لاکتوباسیل‌ها میکروآئروفیل و مولد اسید لاکتیک هستند. راحتی کشت، تولید اسیدهای ارگانیک، خروج راحت از حالت اسپور، مقاومت به اسید معده، لیزوزیم، اسیدهای صفراوی و آنزیم‌های پانکراتیک و همچنین مقاومت به حرارت (حفظ تعداد در فرآیند تهیه‌ی غذای دام) ویژگی‌هایی هستند که این باکتری‌ها را به عنوان گزینه‌ای مناسب برای تولید پروبیوتیک برجسته می‌سازد (Suzuki and Yamasato 1994).

باکتری *باسیلوس کوآگولانس* به عنوان یک پروبیوتیک اسپور دار مقاوم به شرایط محیطی و دستگاه گوارش معرفی شده است. توانایی تشکیل اسپور این پروبیوتیک را در برابر استرس‌های تکنولوژیکی در فرآیند تولید و نگهداری مقاوم می‌سازد (Hyronimus et al. 2000). این باکتری به حرارت، اسید معده و اسیدهای صفراوی مقاوم بوده و امکان عبور آن از این موانع بیش‌تر است (Hong et al. 2005, Cutting 2011). *باسیلوس کوآگولانس* از راه اتصال به بافت لنفوئیدی روده توانایی تحریک سیستم ایمنی (Duc et al. 2004) و ارتقاء سلامت عمومی بدن حیوان را دارد. بنابراین استفاده از این باکتری در جیره‌ی غذایی به طور بالقوه می‌تواند با بهبود سیستم ایمنی و در نتیجه کاهش ابتلا به ورم پستان و سایر بیماری‌هایی که کیفیت شیر را تحت تأثیر قرار می‌دهند، به طور غیر مستقیم کیفیت شیر را بهبود بخشد. مطالعات صورت گرفته در خصوص پروبیوتیک‌های اسپور دار مخصوصاً *باسیلوس کواگولانس* بسیار محدود است. در مطالعه‌ی حاضر، اثر اسپور باکتری *باسیلوس کواگولانس* به صورت افزودنی جیره‌ی غذایی گاو بر روی سطح تولید، درصد چربی، درصد پروتئین خام، پروتئین سرم شیر، بار میکروبی و شمار سلول‌های

سوماتیک به عنوان شاخص‌های اقتصادی و بهداشتی شیر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش کار

در یک گاوداری شیری با نژاد هولشتاین با مدیریت با ثبات و علمی واقع در شهرستان آباده استان فارس، تعداد ۴۰ رأس گاو دوشا در مراحل مختلف شیردهی انتخاب و به دو گروه (۲۰ رأسی) شاهد و آزمایش تقسیم‌بندی شدند. مدت مطالعه ۶۳ روز بود و در این مدت در هر یک از گروه‌ها تعداد ۷ رأس از گاوها به دلیل بیماری یا حذف از گله از مطالعه خارج شدند به گونه‌ای که در پایان کار در گروه شاهد ۱۶ رأس و در گروه آزمایش ۱۷ رأس گاو باقی ماندند. در این دو گروه از نظر میانگین شکم زایش، روزهای شیردهی، سطح تولید، درصد چربی و پروتئین شیر و وضعیت بدنی (BCS) تفاوتی وجود نداشت. از حداقل ۱۰ روز پیش از شروع مطالعه و برای طی دوره‌ی تطابق، جیره‌ی پایه (بر اساس برنامه‌ی گاوداری) شامل یونجه‌ی خشک، کاه گندم، سیلوی ذرت، تفاله‌ی چغندر و مخلوط کنسانتره به صورت کاملاً مخلوط (TMR) روزانه در سه وعده در اختیار گاوها قرار گرفت. از شروع دوره‌ی تطابق، افزودنی مونسین که از قبل در جیره وجود داشت به دلیل اثر مهاری آن بر باکتری‌های گرم مثبت ازجیره حذف شد. از روز شروع مطالعه به مدت ۶۳ روز، در گروه آزمایش پروبیوتیک *باسیلوس‌کوآگولانس* (باسیلاک®، شرکت بیواکسیر، شیراز، ایران) طبق دستور مصرف به میزان ۲ گرم به ازای هر گاو (۲×۱۰^{۱۱}CFU/Head) یا ۱۵۰ گرم در هر تن کنسانتره به غذا اضافه شد. در دوره‌ی تطابق (قبل از شروع مطالعه) و روزهای ۲۱، ۴۲ و ۶۳ مطالعه، در هر یک از وعده‌های شیردوشی (سه وعده) هر گاو به صورت انفرادی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها در ظروف استریل اخذ و در یخچال نگهداری شدند. به منظور انجام آزمایش‌های میکروبیولوژی بخشی از نمونه‌ها در ظروف استریل تفکیک شد و همه‌ی نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه فرستاده شدند. در طول دوره مطالعه، میزان تولید هر گاو توسط دستگاه میلکومتر ثبت شد.

جهت ارزیابی زنده‌مانی اسپور در شرایط شکمبه وتایید عملکرد پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* در روده، قبل از انجام مطالعه در سطح مزرعه، از دستگاه شبیه‌ساز شکمبه (گل‌پونه صفاهان®، ایران) استفاده شد که شامل ۴ مخزن دوار و قابلیت تنظیم دما است و شرایطی مشابه شکمبه‌ی دام از نظر حرکت مداوم و دمای ثابت ایجاد می‌کند. محتویات شکمبه یک گاو سالم از کشتارگاه تهیه شد و در فلاسک‌های در بسته در شرایط بی‌هوازی ضمن حفظ دمای اولیه به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه محتویات شکمبه صاف شد و مایع آن تهیه گردید. بر اساس دستورالعمل مربوطه، مایع شکمبه و بافرهای لازم به هر مخزن اضافه شد. سپس پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* در غلظت‌های متفاوت به این چهار مخزن اضافه شد و همه‌ی مخازن به مدت ۴۸ ساعت در دستگاه قرار گرفتند. دمای دستگاه روی ۳۹ درجه‌ی سانتی‌گراد تنظیم شد. هر دو ساعت یک بار از مخازن نمونه‌گیری جهت کشت پروبیوتیک انجام شد. سپس نمونه‌ها مورد شمارش اسپور قرار گرفتند. به این منظور ابتدا نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند تا فرم رویان باکتری از بین برود سپس نمونه‌ها سرد شدند و پس از رقیق‌سازی متوالی در محیط کشت اختصاصی *باسیلوس کواگولانس* (NYSM آگار) به صورت سطحی کشت شدند (Rusell et al.1989). این آزمایش نشان‌گر فعالیت *باسیلوس کواگولانس* در محیط روده بود. جهت اطمینان از این نتیجه، مقدار ۲ گرم پروبیوتیک با غلظت $۱۰^{۱۱}$(CFU) با لوله معده‌ای به یک رأس گاو سالم خورانده شد و یک ساعت پس از خوراندن پروبیوتیک و ۲۴ ساعت بعد نیز نمونه‌گیری ازمایع شکمبه با استفاده از لوله‌ی معده‌ای صورت گرفت. پس از حرارت دهی نمونه و از بین بردن فرم فعال باکتری پروبیوتیک کشت اسپور در محیط NYSM از هر دو نمونه انجام شد.

در همه‌ی نمونه‌های شیر ماده‌ی خشک به روش تبخیر در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، پروتئین خام به روش کلدال، کازئین به روش رسوب‌دهی، تعیین درصد کازئین به روش کلدال، چربی به روش ژربر و لاکتوز به روش پلاریمتری اندازه‌گیری شد. درصد پروتئین سرم شیر با تفریق درصد کازئین از درصد پروتئین خام محاسبه شد (Karim et al. 2012). تعداد سلول‌های سوماتیک در نمونه‌های شیر با استفاده از دستگاه خودکار (Fossomatic ، دانمارک) اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری بار میکروبی شیر به روش شمارش کلی باکتری‌ها و کشت در محیط plate count agar انجام شد.

روند تغییرات شاخص‌های اقتصادی و بهداشتی شامل درصد پروتئین خام، کازئین، چربی، لاکتوز و ماده‌ی خشک و همچنین تعداد سلول‌های سوماتیک و بار میکروبی) به روش آنالیز واریانس برای اندازه‌گیری‌های مکرر بین دو گروه شاهد وآزمایش مقایسه شد. تغییرات درون هر گروه با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و تفاوت‌های بین دو گروه در هر مرحله نمونه‌گیری (روزهای ۲۱، ۴۲ و ۶۳) به روش آزمون *t* غیر وابسته انجام شد. مطالعات آماری در سطح معنی‌داری P≤۰/۰۵ صورت پذیرفتند.

نتایج

نتایج حاصل از کشت سطحی نمونه‌های اخذ شده از شکمبه مصنوعی و شکمبه گاو $۱۰^{۱۱}$(CFU) باکتری بود. با توجه به این که میزان باکتری اسپور دار باسیلوس کوآگولانس در نمونه‌ی پروبیوتیک تلقیح شده به شکمبه‌ی مصنوعی و حیوان زنده $۱۰^{۱۱}$(CFU) است، میتوان نتیجه‌گیری کرد که پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* تحت شرایط شکمبه از حالت اسپور خارج نشده و بدون تغییر از شکمبه عبور می‌کنند یا این که تبدیل آن به فرم رویان ناچیز است.

در دوره‌ی تطابق بین دو گروه از نظر وزن شیر، شاخص‌های شیمیایی مورد مطالعه و تعداد سلول‌های سوماتیک تفاوت معنی‌داری نبود (P>۰/۰۵؛ Table 1)، لکن بار میکروبی شیر از ابتدا بین دو گروه متفاوت (P=۰/۰۷۸) و در گروه شاهد بیش‌تر بود. در طول مدت مطالعه وزن شیر در هر دو گروه روندی کاهشی داشت (P≤۰/۰۵) و از این نظر تفاوتی بین دو گروه شاهد و آزمایش نبود (P=۰/۵۹). سطح ماده‌ی خشک (P=۱)، درصد چربی (P=۰/۱۸)، درصد لاکتوز (P=۰/۳۴) و درصد پروتئین سرم شیر (P=۰/۶۱ ؛جدول ۱؛ نمودار۳) در طول مدت مطالعه در هر دو گروه کمابیش ثابت بود، اما روند تغییرات پروتئین خام (P=۰/۰۶) و کازئین (P=۰/۰۵) بین دو گروه شاهد و آزمایش متفاوت بود. در گروه آزمایش، سطح پروتئین و کازئین شیر روندی افزایشی نشان داد به گونه‌ای که در روزهای ۴۲ و ۶۳ مطالعه سطح پروتئین در گروه آزمایش نسبت به گروه شاهد بیش‌تر بود (P<۰/۰۵ ؛ Table 1؛ نمودار ۱ و ۲). سطح کازئین نیز در گروه آزمایش در روزهای ۴۲ (P=۰/۰۷) و ۶۳ (P=۰/۰۵) بیش‌تر بود. تغییرات بار میکروبی شیر در خلال مدت مطالعه در دو گروه بدون افزایش یا کاهش معنی‌دار کمابیش ثابت بود (Table 1). تفاوتی که در بار میکروبی در دوره‌ی تطابق بین دو گروه دیده شد تا روز ۴۲ مطالعه نیز وجود داشت (P<۰/۰۵). تعداد سلول‌های سماتیک در خلال مدت مطالعه روندی افزایشی یا کاهشی و یا تفاوتی بین دو گروه نشان نداد (P≥۰/۰۵).

Table 1. Comparison between economic and health indices in milk (Mean±SD) in the control (n=16) and experimental (n=17) groups

		Days of sampling				Statistical difference
		Matching period	21	42	63	
Weight (kg)	Control	29.20±4.96	31.10±5.5	31.80±4.9	33.44±5.63	P=0.59
	Test	29.70±4.42[b]	33.64±5.62[a]	33.44±4.81[a]	34.44±6.75	
Dry matter (%)	Control	11.69±0.70	11.69±0.70	11.69±0.70	11.69±0.70	P=1
	Test	12.06±0.04	12.06±0.04	12.06±0.04	12.02±1.02	
Fat (%)	Control	3.37±0.33	3.37±0.3	3.39±0.3	3.50±0.47	P=0.18
	Test	3.38±0.35	3.34±0.32	3.31±0.33	3.37±0.38	
Lactose (%)	Control	4.69±0.24	4.69±0.24	4.69±0.24	4.67±0.24	P=0.34
	Test	4.78±0.20	4.78±0.20	4.78±0.20	4.78±0.20	
Total count (CFU)	Control	7052±9234	8550±6157*	10362±8599*	8735±9946[2]	P=0.21
	Test	3984±5474	2770±3920*	3258±4504*	3017±6545[2]	
No of somatic cells (x 10^3)	Control	88.70±81.57	51.06±50.30	65.50±95.08	83±143.03	P=0.32
	Test	1057±119.77[b]	38.00±21.57*	40.43±31.63[a]	44±55.19	

*Significant difference (p≤0.05) between two groups at the day of sampling
[2] Significant difference (p≤0. 05) between two groups at the day of sampling
a & b: Significant difference (p≤0.05) within the groups during the study

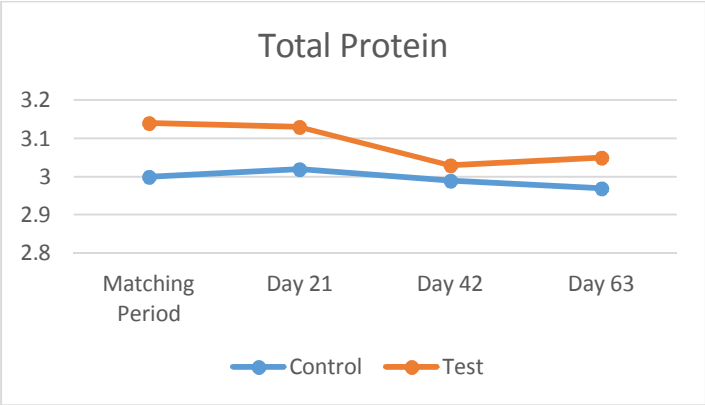

Figure 1: Changes of Total protein in the control (n=16) and experimental (n=17) groups

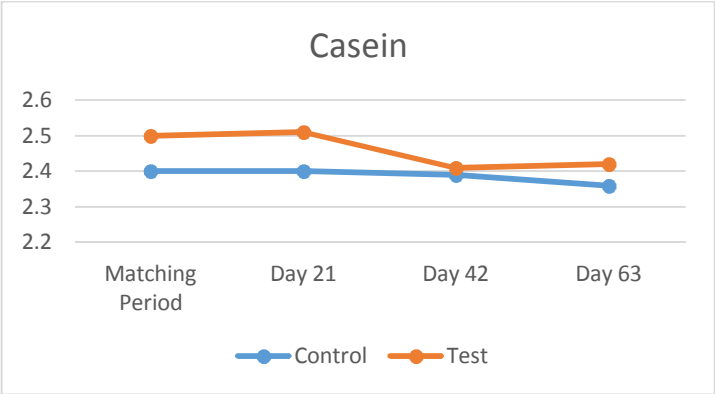

Figure 2: Changes of casein in the control (n=16) and experimental (n=17) groups

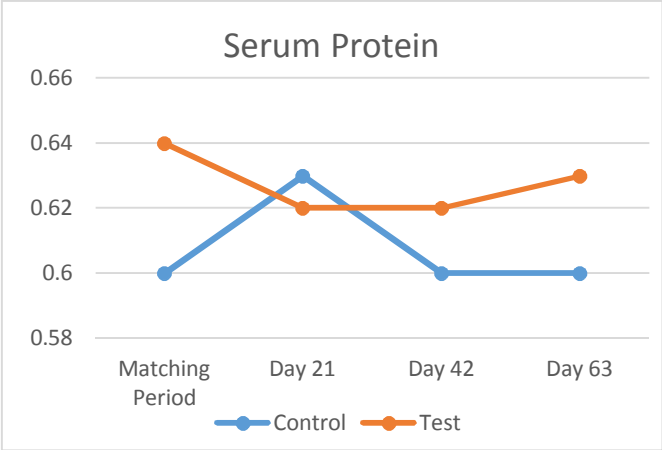

Figure 3: Changes of Serum protein in the control (n=16) and experimental (n=17) groups

بحث

برجسته‌ترین یافته‌های پژوهش حاضر بهبود سطح پروتئین خام و کازئین شیر در گروه دریافت کننده‌ی پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* بود. سایر موارد بررسی شده بین گروه آزمایش و شاهد تفاوتی نشان ندادند. در گاوهای شیری، پروبیوتیک‌ها به طور کلی به منظور بهبود جمعیت میکروبی شکمبه و یا روده، افزایش تولید پروتئین و ویتامین، افزایش تولید شیر و همچنین ارتقاء کیفیت آن استفاده شده‌اند (Yasuda et al. 2007, Vibhute et al.2011, Shreedher et al. 2016, Retta, 2016). افزودن پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* به نسبت مساوی و به میزان ۵۰ گرم (CFU/g ۱/۳×۱۰^۹) روزانه به هر گاو به مدت ۳۰ روز، موجب افزایش تولید شیر، افزایش سطح ایمونوگلوبولین، لاکتوفرین و کاهش تعداد سلول‌های سوماتیک شیر شده است، اما بر میزان چربی، پروتئین و لاکتوز اثر مشهودی نداشته است (Xu et al. 2017). استفاده روزانه ۲۰ گرم از یک ترکیب پروبیوتیکی شامل قارچ‌های *ساکارومایسس سرویزیه* و *ساکارومایسس بولاردی* و باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *پروپیونی باکتریوم فرندنریچی*، میزان، چربی، پروتئین و ماده‌ی خشک بدون چربی شیر را افزایش داده است (Vibhute et al. 2011). در مطالعه‌ی Shreedher و همکاران در سال ۲۰۱۶ پروبیوتیک تجاری بیوبلوم (Biobloom®) حاوی *ساکارومایسس سرویزیه* و *لاکتوباسیلوس اسپروژنز* روزانه به میزان ۱۰، ۱۵ و ۲۰ گرم به سه گروه گاو به مدت ۶۰ روز خورانده شد. تولید شیر در هر سه گروه دریافت کننده‌ی پروبیوتیک نسبت به گروه شاهد افزایش داشت. همچنین نقطه‌ی انجماد شیر در هر سه گروه کاهش نشان داد که نشان دهنده‌ی افزایش ماده‌ی خشک در هر سه گروه نسبت به گروه کنترل می‌باشد. در مجموع میزان ۱۵ گرم از این پروبیوتیک نسبت به سایر میزان‌ها اثر بخشی مناسب‌تر و صرفه‌ی اقتصادی بیش‌تری داشته است. در مطالعه‌ای دیگر که در بازه‌ی زمانی دو هفته قبل از زایش تا ۳۰ هفته پس از آن صورت گرفت، با افزودن پروپیونی-باکترسویه p169 با دُز (۶×۱۰^۱۰cfu) مقدار چربی شیر افزایش قابل توجهی داشته است (Lehloenya et al. 2008). در مطالعه‌ای با افزودن پروبیوتیک قارچی *ساکارومیسس سرویزیه* در چهار سطح صفر، ۳، ۶ و ۱۲ گرمی ، تولید شیر خام، درصد چربی، درصد ماده‌ی خشک بدون چربی و درصد کل مواد جامد شیر افزایش یافت. در این مطالعه پروتئین خام در گروه‌های مورد آزمایش افزایش داشت اما تغییرات آن معنی‌دار نبود(Nikkhah et al. 2004).

با وجود اثرات مثبتی که پروبیوتیک‌ها در برخی مطالعات نشان داده‌اند، در برخی مطالعات دیگر اثر خاصی نداشته‌اند. برای مثال خوراندن روزانه یک گرم مخمر زنده *ساکارومایسس سرویزیه* به هر گاو درصد پروتئین و چربی

شیر را تغییر مشخصی نداده ولی چربی تصحیح شده شیر را افزایش داده است (Moallem et al. 2009). همچنین در مطالعه‌ای توسط Spaniol و همکاران در سال ۲۰۱۵ به دنبال استفاده از *ساکارومیسس سرویزیه* به میزان روزانه ۲ گرم به ازاء هر رأس گاو تأثیری روی تولید شیر و ترکیبات آن (چربی، پروتئین، لاکتوز و ماده‌ی خشک) مشاهده نگردید. در مطالعه‌ای توسط Mostafa و همکاران در سال ۲۰۱۴ با استفاده از پروبیوتیک تجاری حاوی *ساکارومایسس سرویزیه*، چربی، پروتئین، لاکتوز، ماده‌ی خشک بدون چربی و خاکستر شیر تغییر محسوسی نکردند. خوراندن باکتری *انتروکوکوس فاسیوم* و مخمر*ساکارومیسس سرویزیه* به میزان ۲گرم به ازاء هر گاو تأثیری بر ترکیبات شیر نداشته است (Raeth 2007, Oetzel et al. 2007).

در مطالعه‌ی حاضر به دنبال افزودن پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* با دوز پیشنهادی شرکت سازنده (روزانه ۲ گرم به ازاء هر گاو؛ ۲×۱۰^{۱۱}CFU/Head)، در روز ۴۲ و ۶۳ مطالعه درصد پروتئین خام و کازئین شیر نسبت به روزهای قبل در گروه آزمایش افزایش نشان داد، اما سطح پروتئین سرم شیر (شامل آلبومین، گلوبولین و مواد NPN) در طول مدت مطالعه در هیچ یک از گروه‌ها تغییری نکرد. بر خلاف ایمنوگلوبولین‌ها و آلبومین شیر که از خون منشاء می‌گیرند، ساخت کازئین در آلوئول‌های پستانی صورت می‌گیرد (Larson 1985) و برای سنتز آن باید اسیدهای آمینه‌ی بیش‌تری در دسترس باشند. با توجه به مکانیسم‌های عمل پروبیوتیک‌های باکتریایی (ادامه‌ی بحث) می‌توان نتیجه‌گیری کرد که باکتری *باسیلوس کوآگولانس* مدتی پس از شروع استفاده، وضعیت سلامت دام را بهبود می‌بخشد که باعث می‌شود اسیدهای آمینه‌ی کم‌تر برای واکنش‌های التهابی مصرف شوند (Eckersall et al. 2001) و به مصارف مفید دیگر از جمله سنتز کازئین شیر برسند. در تحقیق حاضر، افزایش پروتئین خام شیر تحت تأثیر افزایش کازئین، افزون بر این که می‌تواند نتیجه‌ی سلامت عمومی بدن در نتیجه‌ی مصرف پروبیوتیک باشد، نشان از سلامت بافت پستان نیز دارد. تعداد سلول‌های سوماتیک در این تحقیق پایین بود و علیرغم افزایش معنی‌دار در آخرین روز نمونه‌گیری، نشانی از ورم پستان به همراه نداشت. بیماری ورم پستان بر میزان پروتئین شیر تأثیر کمی دارد، هرچند موجب کاهش کازئین و افزایش پروتئین‌های سرم شیر می‌شود (Kitchen 1981). بار میکروبی شیر پایین بود (در حد شیر ممتاز- استاندارد ملی ایران، شماره‌ی ۲۴۰۶).

تغییرات چربی شیر در این تحقیق بین دو گروه تفاوت معنی‌داری نداشت. در پژوهش‌هایی که با استفاده از پروبیوتیک سطح چربی شیر افزایش یافته است، از پروبیوتیک‌هایی استفاده شده است که در شکمبه فعال بوده‌اند (Vibhute et al. 2011). سنتز اسیدهای چرب شیر تحت تأثیر فعالیت‌های تخمیری شکمبه است و تغییر در شرایط شکمبه به گونه‌ای که جمعیت میکروبی را تغییر دهد، می‌تواند فرآیند تخمیر، ساخت اسیدهای چرب و به دنبال آن میزان چربی شیر را تغییر دهد (Christie 1981). به طور کلی پروبیوتیک‌های قارچی تأثیرات مثبت خود را از طریق افزایش هضم فیبر (Dawson 1990, Callaway and Martin 1997, Chaucheyra et al. 2010)، کاهش غلظت اسید لاکتیک و تعدیل pH شکمبه (Vibhute et al. 2011) اعمال می‌کنند. همچنین باکتری‌های مولد اسید لاکتیک با تولید اسید لاکتیک موجب تحریک رشد و تکثیر باکتری‌های مصرف کننده‌ی اسید لاکتیک و تثبیت pH شکمبه می‌شوند (Seo et al. 2010, Yoon and Stern 1995). هضم فیبر به صورت بالقوه می‌توانند چربی شیر را افزایش دهد و تثبیت pH شکمبه نیز سبب افزایش هضم فیبر می‌شود (AhmadiRouzbehani et al. 2014). از آن جا که پروبیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* در محیط شکمبه فعال نمی‌شود عدم تغییر چربی شیر در تحقیق حاضر قابل توجیه است.

سطح لاکتوز شیر در تحقیق حاضر بین دو گروه تفاوتی نشان نداد. لاکتوز عامل تنظیم فشار اسمزی در غده‌ی پستان است و از آن جایی که به واسطه‌ی غلظت این ماده آب به غده‌ی پستان انتشار می‌یابد، غلظت لاکتوز کمابیش

ثابت و دامنه‌ی تغییرات آن حدود ۵ درصد کل لاکتوز شیر است (Welch 1997). به بیانی دیگر، با افزایش یا کاهش تولید لاکتوز در پستان‌ها حجم شیر افزایش یا کاهش می‌یابد و درصد لاکتوز در شیر تغییر چندانی نخواهد کرد. با مصرف مخلوط پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلنتاروم* (Xu 2017) و ساکارومایسس سرویزیه (Nikkhah et al. 2004)، سطح تولید شیر افزایش یافت و غلظت لاکتوز تحت تأثیر قرار نگرفت.

مطالعات صورت گرفته در استفاده از پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس بسیار محدود هستند (Abhari et al. 2016). در مطالعه‌ی حاضر مقدار مورد استفاده پروبیوتیک بر اساس دستور شرکت سازنده $۲×۱۰^{۱۱}$ در روز به ازای هر گاو بود. میزان باکتری در این دز نسبت به سایر مطالعاتی که در آن از پروبیوتیک‌های باکتریایی استفاده شده است بیش‌تر بوده است (Xu et al. 2017, Lehloenya et al. 2008). اثرات مثبت افزودن این پروبیوتیک بر پروتئین و کازئین شیر پس از گذشت زمان ۴۲ روز دیده شد که همچون دیگر مطالعات (Lehloenya et al. 2008, Shreedher et al. 2016, Xu et al. 2017). ضرورت استفاده بلند مدت از پروبیوتیک را نشان می‌دهد. با توجه به مکانیسم اثر پروبیوتیک‌های باکتریایی در تحریک سیستم ایمنی بدن، مقایسه‌ی اثر این پروبیوتیک در گاوداری‌هایی با شرایط بهداشتی متفاوت توصیه می‌شود.

تشکر و قدردانی

از اعضای محترم بخش بهداشت به خصوص سرکار خانم آغازی و خانم یونسیان که همکاری را با مجریان تحقیق داشته‌اند، تشکر و قدرانی می‌گردد. از شرکت محترم کوهپایه و شرکت محترم بیواکسیر و جناب آقای دکتر شفیعی و جناب آقای مهندس نعمت‌الهی بابت همکاری در اجرای این پایان نامه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

منابع مالی

این تحقیق در قالب پایان‌نامه‌ی دکتری در دانشگاه شیراز انجام گردید. از دانشگاه شیراز به سبب حمایت مالی تقدیر می‌شود.

منابع

Abhari, K.; Shekarforoush, S.S.; Hosseinzadeh, S.; Nazifi, S.; Sajedianfard, J. and Eskandari, M.H. (2016). The effects of orally administered *Bacillus coagulans* and inulin on prevention and progression of rheumatoid arthritis in rats. Food and Nutrition Research, 60(1): 30876.

Ahmadi Rouzbehani, M.; Nadalian, M. and Badiee, A. (2014). Study of changes in milk fat and protein in relation to rumen pH in dairy cows. Clinical Research of Large Animals (Veterinary) 7(1): 1-9.

Callaway, E.S. and Martin, S.A. (1997). Effects of a *Saccharomyces cerevisiae* culture on ruminal bacteria that utilize lactate and digest cellulose. Journal of Dairy Science, 80(9): 2035-2044.

Chaucheyras-Durand, F.; Ameilbonne, A.; Walker, N.D.; Mosoni, P. and Forano, E. (2010). Effect of a live yeast, *Saccharomyces cerevisiae* I-1077 on in situ ruminal degradation of alfalfa hay and fiber-associated microorganisms. Journal of Animal Science, 88, 145.

Christie, W.W. (1981). The Effects of Diet and Other Factors on the Lipid Composition of Ruminant Tissues and Milk. In: Christie, W.W., Ed., Lipid Metabolism of Ruminant Animals, Pergamon Press, Oxford, Pp: 193-226.

Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. Food Microbiology, 28(2): 214-220.

Dawson, K. A.; Newman, K. E. and Boling, J. A. (1990). Effects of microbial supplements containing yeast and *lactobacilli* on roughage-fed ruminal microbial activities. Journal of Animal Science, 68(10): 3392-3398.

Dicks, L.M.T. and Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: Health benefits, safety and mode of action Beneficial Microbes, 1 (1), 11–29. dx. doi. org/10.3920/BM2009, 12.

Duc, L.H.; Hong, H.A.; Barbosa, T.M.; Henriques, A.O. and Cutting, S.M. (2004). Characterization of Bacillus probiotics available for human use. Applied and Environmental Microbiology, 70(4), 2161-2171.

Eckersall, P.D.; Young, F.J.; McComb, C.; Hogarth, C.J.; Safi, S.; Fitzpatrick, J.L. and McDonald, T. (2001). Acute phase proteins in serum and milk from dairy cows with clinical mastitis. The Veterinary Record, 148(2): 35.

FAO/WHO (2002). Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London, Ontario, Canada.

Fuller, R. (Ed.). (2012). Probiotics: the Scientific Basis. Chapman and Hall. London, Pp: 1-8.

Guillot, J.F. (2003). Probiotic feed additives. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 26: 52-55.

Harding, F. (2007). Milk Quality. 2th ed. Tehran, University of Tehran Press, Pp: 65-76. (In Persian)

Holzapfel, W.H.; Geisen, R. and Schillinger, U. (1995). Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. International Journal of Food Microbiology, 24(3): 343-362.

Hong, H.A.; Duc, L.H. and Cutting, S.M. (2005). The use of bacterial spore formers as probiotics. FEMS Microbiology Reviews, 29(4): 813-835.

Hyronimus, B.; Le Marrec, C.; Sassi, A.H. and Deschamps, A. (2000). Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 61(2-3), 193-197.

Institute of Standards and Industrial Researches of Iran ISIRI. Microbiology of milk and milk products-Specifications. 2nd Rev, Standard No. 2406, Tehran: ISIRI Publisher; 2008. Available from: http://www. isiri. org.

Isolauri, E.; Sütas, Y.; Kankaanpää, P.; Arvilommi, H. and Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. The American Journal of Clinical Nutrition, 73(2):444-450.

Karim, G.; Mohammadi, K.; Khandaghi, J. and Karimi, H. (2012). Analysis of Milk and Products. 2th ed. Tehran, University of Tehran Press, Pp: 18-22. (In Persian)

Kitchen, B.J. (1981). Bovine mastitis: milk compositional changes and related diagnostic tests. Journal of Dairy Research, 48(1): 167-188.

Lundquist, R.L.; Linn, J.G. and Otterby, D.E. (1983). Influence of dietary, energy and protein on yield and composition of milk from cows fed methionine hydroxy analog. Journal of Dairy Science, 66: 475.

Larson, B.L. (1985). Effect of somatotropin and insulin-like growth factor-I on milk lipid and protein synthesis *in vitro*. Lactation. Ames: Iowa State University Press. Biosynthesis and cellular secretion of milk. p: 260.

Le Roux, Y.; Laurent, F. and Moussaoui, F. (2003). Polymorphonuclear proteolytic activity and milk composition change. Veterinary Research, 34(5): 629-645.

Lee, Y.K.; Puong, K.Y.; Ouwehand, A.C. and Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. Journal of Medical Microbiology, 52(10): 925-930.

Lehloenya, K.V.; Stein, D.R.; Allen, D.T.; Selk, G.E.; Jones, D.A.; Aleman, M.M. and Spicer, L.J. (2008). Effects of feeding yeast and propionibacteria to dairy cows on milk yield and components, and reproduction. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition, 92(2): 190-202.

Moallem, U.; Lehrer, H.; Livshitz, L.; Zachut, M. and Yakoby, S. (2009). The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency, and digestibility. Journal of Dairy Science, 92(1): 343-351.

Mostafa, T.H.; Elsayed, F.A.; Ahmed, M.A. and Elkholany, M.A. (2014). Effect of using some feed additives (tw-probiotics) in dairy cow rations on production and reproductive performance. Egyptian Journal Animal Production, 51(1): 1-11.

Nikkhah, A.; Bonadaki, M.D. and Zali, A. (2004). Effects of feeding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on productive performance of lactating Holstein dairy cow. Iranian Journal of Agriculture Science, 35(1): 53-60. (In Persian)

Oetzel, G.R.; Emery, K.M.; Kautz, W.P. and Nocek, J.E. (2007). Direct-fed microbial supplementation and health and performance of pre-and postpartum dairy cattle: A field trial. Journal of Dairy Science, 90(4): 2058-2068.

Raeth-Knight, M.L.; Linn, J.G. and Jung, H.G. (2007). Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of Holstein dairy cows1. Journal of Dairy Science, 90(4): 1802-1809.

Retta, K.S. (2016). Role of probiotics in rumen fermentation and animal performance: a review. International Journal of Livestock Production, 7(5): 24-32.

Rolfe, R.D. (2000). The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. The Journal of Nutrition, 130(2): 396S-402S.

Russell, B.L.; Jelley, S.A.A.; Yousten, A.A. (1989). Selective medium for mosquito pathogenic strains of *Bacillus sphaericus* 2362. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 55: 294-297.

Seo, J.K.; Kim, S.W.; Kim, M.H.; Upadhaya, S.D.; Kam, D.K. and Ha, J.K. (2010). Direct-fed microbials for ruminant animals. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23(12): 1657-1667.

Shekarforoush. S.S.; Mohebbi Fani, M.; Nazifi, S.; Nikbakht, M. and Moghimi, N. (2007). Effects of oral administration of monensin on milk yield, milk economic components and iodine value of milk fat in holstein-friesian cows in early lactation. Journal of Veterinary Research, 62(3): 191-195.

Shreedhar, J.N.; Patil, M. and Kumar, P. (2016). Effect of probiotics supplementation on milk yield and its composition in lactating Holstein Fresien and Deoni cross bred cows. Journal of Medical and Bioengineering, 5(1): 19-23.

Spaniol, J.S.; Oltramari, C.E.; Locatelli, M.; Volpato, A.; Campigotto, G.; Stefani, L.M. and Da Silva, A.S. (2015). Influence of probiotic on somatic cell count in milk and immune system of dairy cows. Comparative Clinical Pathology, 24(3): 677-681.

Suzuki, T. and Yamasato, K. (1994). Phylogeny of spore-forming lactic acid bacteria based on 16S rRNA gene sequences. FEMS Microbiology Letters, 115(1): 13-17.

Vandenbergh, P.A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiology Reviews, 12(1-3): 221-237.

Vibhute, V.M.; Shelke, R.R.; Chavan, S.D. and Nage, S.P. (2011). Effect of probiotics supplementation on the performance of lactating crossbred cows. Veterinary World, 4(12): 557.

Welch, R.A.S.J.W.; Burns, S.R.; Davis, A. I. Popay and C. G. Prosser (1997). Milk composition, production and Biotechnology. Ed. CAB International New Zealand.

Xu, H.; Huang, W.; Hou, Q.; Kwok, L.Y.; Sun, Z.; Ma, H. and Zhang, H. (2017). The effects of probiotics administration on the milk production, milk components and fecal bacteria microbiota of dairy cows. Science Bulletin, 62(11): 767-774.

Yasuda, K.; Hashikawa, S.; Sakamoto, H.; Tomita, Y.; Shibata, S. and Fukata, T. (2007). A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. Journal of Veterinary Medical Science, 69(2): 205-208.

Yoon, I.K. and Stern, M.D. (1995). Influence of direct-fed microbials on ruminal microbial fermentation and performance of ruminants: A review. Asian-Australian Journal of Animal Science, 8(6): 533-555.

Received: 16.12.2018
Accepted: 22.04.2019

© 2020 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Vol. 16, No. 1, Spring, 2020
DOI: 10.22055/ivj.2019.161346.2101

Effect of *Bacillus coagulans* probiotic on milk production and important economic and health indicators of raw milk of Holstein cows

Izadi, B.[1]; Mohebbi Fani, M.[2]; Hosseinzadeh, S.[3]; Shekarforoush, S.S.[3]; Rasooli, A.[4] and Nazifi, S.[5]

Received: 16.12.2018 Accepted: 22.04.2019

Abstract

Bacillus coagulans is a spore-based probiotic, resistant to environmental and gastrointestinal conditions. The ability to form spores makes this probiotic resistant to technological stresses. The purpose of this study was to investigate the effects of *Bacillus coagulants* (Bacilact®) as a food additive on the production level, dry matter, fat percentage, crude protein, casein, serum protein, and microbial load, and the number of the somatic cell as important economic and health indicators of raw milk of cattle. This study was performed on 33 Holstein breeders divided into two groups; control (16 heads) and experimental (17 heads). Probiotics were added daily for 63 days at a rate of 2 grams per each cow. Sampling was completed every 21 days from starting the study. The addition of probiotic *Bacillus coagulans* did not affect the levels of milk production, dry matter, fat, lactose, milk serum, somatic cell count, and microbial load, but the level of protein and casein in the experimental group were increased. At days 42 and 63, protein levels were higher in the experimental group. The level of casein was higher in the experimental group on the days 42 and 63. Using probiotic *Bacillus coagulans* can be considered as an improving factor to increase the quality of milk and the quality of dairy products.

Key words: Milk, Probiotic, *Bacillus coagulans*, Casein, Cow

1- PhD Graduated of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2- Professor, Department of Animal Health Management, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3- Professor, Department of Food Hygiene and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4- Associated Professor, Department of Animal Health Management, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
5- Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
Corresponding Author: Hosseinzadeh, S., E-mail: hosseinzadeh@shiarazu.ac.ir