مجله علوم دامی ایران
دوره ۴۳، شماره ۴، ۱۳۹۱ (۴۵۶-۴۴۹)

تاثیر پروبیوتیک و اسید فرمیک بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی

نیلوفر میربابایی لنگرودی[1]، مهرداد محمدی[2]* و محمد روستایی علیمهر[3]
۱، ۲،۳، دانش آموخته، دانشیار و استادیار دانشکده علوم کشاورزی دانشگاه گیلان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۱۰/۱٤ – تاریخ تصویب: ۹۱/۸/۱٤)

چکیده

دراین تحقیق تاثیر پروبیوتیک پروتکسین و اسید فرمیک بر سیستم ایمنی هومورال و سلولی ۲۰۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی نژاد کاب ۵۰۰ در قالب طرح کاملا تصادفی با ٤ تیمار و ۵ تکرار و تعداد ۱۰ مشاهده در هر تکرار مورد بررسی قرار گرفت. جوجه‌های گروه اول به عنوان شاهد (C) در نظر گرفته شد و از جیره پایه استفاده نمودند. جوجه‌های گروه دوم (P) از جیره حاوی ۰/۱g/kg پروبیوتیک پروتکسین، جوجه‌های گروه سوم (F) از جیره حاوی ۰/۸٪ اسید فرمیک و جوجه‌های گروه چهارم (P+F) از جیره حاوی ۰/۱g/kgپروتکسین و ۰/۸٪ اسید فرمیک بصورت مخلوط در دان استفاده کردند. جهت ارزیابی عملکرد، مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی محاسبه شد. جهت ارزیابی ایمنی هومورال به جوجه‌ها در روز ۸ و ۲۲ دوره پرورش گلبول قرمز گوسفند (SRBC) تزریق شد و در روزهای ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ٤۲ سطوح مختلف آنتی بادی بر علیه SRBC با روش هماگلوتیناسیون اندازه‌گیری شد. جهت ارزیابی ایمنی سلولی در روز ۱٦ دوره پرورش فیتوهماگلوتینین (PHA-P) زیر پوست بال تزریق شد و ۲٤ و ٤۸ ساعت بعد از تزریق پاسخ پوست مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشتار وزن تیموس و بورس فابرسیوس اندازه گیری شد. نتایج نشان داد مصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل غذایی در گروههای آزمایشی کاهش یافت (P<۰/۰۵). تیتر Anti-SRBC تام درگروههای P و P+F مقادیر بالاتری داشت و تفاوت آن با گروههای شاهد و F معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). تیتر IgG و IgM تحت تاثیر گروههای آزمایشی قرار نگرفت. ۲٤ و ٤۸ ساعت پس از تزریق PHA-P در همه گروهها بهبود پاسخ ایمنی سلولی مشاهده شد (P<۰/۰۵). مصرف پروتکسین و اسید فرمیک به تنهایی و با هم باعث افزایش وزن تیموس و بورس فابرسیوس شد (P<۰/۰۵). نتایج این تحقیق نشان داد پروتکسین باعث بهبود سیتم ایمنی هومورال و سلولی شد، اسید فرمیک تاثیری بر ایمنی هومورال نداشت اما باعث بهبود سیستم ایمنی سلولی شد. مصرف همزمان پروتکسین و اسید فرمیک تاثیر سینرژیستی بر سیستم ایمنی طیور نداشت.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک پروتکسین، اسیدفرمیک، ایمنی سلولی، ایمنی هومورال، جوجه گوشتی

مقدمه

امروزه به دلیل احساس خطری که در مصرف کنندگان محصولات دامی در ارتباط با میکروب‌های مقاوم شده به آنتی‌بیوتیک دیده شده، پژوهش‌های زیادی به منظور یافتن جایگزین‌هـای مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌ها صورت گرفته است (Denli et al., 2003). در این میان پروبیوتیک‌ها بیش از بقیه مورد توجه قرار گرفته و از جمله افزودنی‌های جیره غذایی هستند که توسط کشورهای اروپایی به رسمیت شناخته شده‌اند (Gill et al., 2001). پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌هایی هستند که از طریق بهبود شرایط روده برای رشد باکتری‌های مفید و ایجاد اثرات آنتاگونیستی در برابر باکتری‌های

* نویسنده مسئول: مهرداد محمدی تلفن: ۰۹۱۱۳۳۱۵۵۲۸ E-mail: mohammadi@guilan.ac.ir

مضر اثر خود را اعمال می‌کنند. این اثر آنتاگونیستی به صورت کاهش pH محیط دستگاه گوارش، تولید اسید لاکتیک، اسید استیک و دیگر ترکیبات بازدارنده رشد باکتری‌های مضر و ترشحات سمی آنهاست (Green & Sainsbury, 2001). یکی از این پروبیوتیک‌ها پروتکسین است که مخلوطی از هفت سویه باکتریایی با سویه غالب لاکتوباسیلوس و دو سویه قارچی و مخمری است (Vali, 2009). با توجه به استفاده بعضی منابع دامی در غذای طیور و احتمال آلودگی قارچی و باکتریایی و تاثیر آن بر سلامت و عملکرد جوجه‌های گوشتی، کنترل آلودگی دان و مهار میکروارگانیسم‌های مضر آن از اهمیت زیادی برخوردار است (Denli et al., 2003). در اروپا از اسید فرمیک در مواد غذایی خام و در خوراک-های آماده به منظور ممانعت از رشد میکروب‌های بیماری‌زا مانند سالمونلا استفاده می‌شوند (Denli et al., 2003). اسید فرمیک در وهله اول بر بعضی باکتری‌ها مانند اشریشیاکلی و سالمونلا موثر است، در حالیکه باکتری‌های مفید و قارچ‌ها دارای مقاومت نسبی در مقابل آن هستند (Dhawale, 2005). اگر این توازن به نفع باکتری‌های مفید و مطلوب باشد، منجر به حفظ سلامت و جلوگیری از عفونت‌های روده‌ای می‌شود. کاهش کلونیزه شدن عوامل بیماری‌زا در روده با استفاده از اسید فرمیک در خوراک سبب ممانعت از آسیب سلول‌های اپیتلیال، کاهش تولید ترکیبات سمی باکتریایی و حذف رقابتی باکتری‌های مضر می‌شود (Denli et al., 2003; Gunal et al., 2006). مشخص شده که فلور میکروبی طبیعی می‌تواند مانع کلونیزه شدن عوامل بیماری‌زا در دستگاه گوارش شود (Dhawale, 2005). با توجه به کاهش جمعیت باکتری‌های مضر چینه‌دان و روده در اثر افزایش اسیدیته دستگاه گوارش به دنبال مصرف پروبیوتیک‌ها و از سوی دیگر کاهش جمعیت میکروبی خوراک مصرفی و افزایش اسیدیته بخش‌های ابتدایی دستگاه گوارش در نتیجه مصرف اسیدهای آلی (Green & Sainsbury, 2001; Gunal et al., 2006) همچنین با توجه به عدم تاثیر سوء ۰/۸٪ اسید فرمیک بر لاکتوباسیلوس و قارچها (Dhawale, 2005; Panda, 2009)، می‌توان این فرضیه را مطرح ساخت که پروبیوتیک‌ها و اسید فرمیک بر سیستم ایمنی طیور میزبان می‌توانند اثر سینرژیستی داشته باشند. لذا برای بررسی این موضوع، تحقیق حاضر انجام شد.

مواد و روش‌ها

۲۰۰ قطعه جوجه یکروزه گوشتی مخلوط دو جنس از سویه تجاری کاب ۵۰۰ به مدت ۴۲ روز داخل جایگاه بستری (پن) پرورش داده شدند. جوجه‌های گروه اول (C) از جیره پایه استفاده نمودند (گروه شاهد). جوجه‌های گروه دوم (P) از جیره حاوی ۰/۱g/kg پروبیوتیک پروتکسین (Probiotics International Ltd, UK)، جوجه‌های گروه سوم (F) از جیره حاوی ۰/۸٪ اسید فرمیک (Merck, Germany) و جوجه‌های گروه چهارم (P+F) از جیره حاوی ۰/۱g/kg پروتکسین و ۰/۸٪ اسید فرمیک بصورت مخلوط در دان استفاده کردند. این مقدار اسید فرمیک در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و هیچ تاثیر سویی بر میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک پروتکسین نداشت. جوجه‌ها در طول دوره آزمایش دسترسی آزاد به آب و خوراک داشتند. جیره‌های غذایی مورد استفاده در آزمایش برای ۳ دوره آغازین، رشد و پایانی تنظیم شد. به طوری‌که احتیاجات غذایی بر اساس توصیه‌های انجمن ملی تحقیقات (NRC, 1994) تامین شد (جدول۱). جوجه‌ها در کلیه مراحل پرورش هیچ نوع آنتی‌بیوتیک و داروی ضدکوکسیدیوز مصرف نکردند. جهت ارزیابی عملکرد، مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل غذایی محاسبه شد. برای بررسی پاسخهای سیستم ایمنی هومورال در روزهای ۸ و ۲۲ دوره پرورش سوسپانسیون ۵ درصد گلبول قرمز گوسفند (SRBC) در بافر فسفات (PBS) در شرایط استریل تهیه و ۰/۱ میلی-لیتر سوسپانسیون SRBC در ماهیچه سینه تمام جوجه-ها تزریق شد (Grasman, 2010). در روزهای ۲۱ ، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ دوره پرورش از طریق ورید بال خونگیری انجام شد. نمونه‌های خون به مدت ۳-۱ ساعت روی یخ قرار گرفت و پس از سانتریفیوژ، سرم‌های مربوط جمع آوری و تا تعیین تیتر Anti-SRBC تام، IgG و IgM در ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. اندازه‌گیری Anti-SRBCتام، IgG و IgM علیه SRBC، با روش

هماگلوتیناسیون بصورت زیر انجام شد. پس از یخ گشایی جهت غیر فعال کردن عوامل کمپلمان نمونه‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس نمونه ها به دو بخش تقسیم شدند. بخش اول جهت تعیین تیتر آنتی بادی کل و بخش دوم جهت تعیین تیتر IgG مورد استفاده قرار گرفت. بمنظور غیر فعال کردن IgM و تعیین تیتر IgG در بخش دوم نمونه‌ها، محلول۱/۴ درصد ۲-مرکاپتواتانول (Sigma, St, Louis Mo, USA) در بافر فسفات بصورت ۱:۱ (حجمی) با سرم مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس ذخیره گردید و بر اساس روش Grasman (2010) آزمایش هماگلوتیناسیون انجام شد. تیتر آنتی بادی‌های بدست آمده علیه گلبول قرمز بر اساس لگاریتم بر پایه ۲ گزارش شد. در روز ۱۶ دوره پرورش به منظور بررسی سیستم ایمنی سلولی نخست محلول ۱ میلی‌گرم PHA-P (Sigma, L8754 St, Louis Mo, USA) در ۱ میلی‌لیتر بافر فسفات سالین تهیه و از این محلول به میزان۰/۱ میلی لیتر به چین پوستی بال راست تزریق شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر محلول بافر فسفات سالین به عنوان شاهد به چین پوستی بال چپ تزریق شد. در زمانهای ۲۴و۴۸ ساعت پس از تزریق، ضخامت پوست بال با کولیس دیجیتال اندازه گیری شده و سپس شاخص تحریک بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Grasman, 2010):

ضخامت محل تزریقPBS - ضخامت محل تزریق PHA-P =شاخص تحریک میتوژن

در ۴۲ روزگی ۲ جوجه از هر پن کشتار و پس از خارج کردن دقیق همه لبهای تیموس از ناحیه دو طرف گردن و در طول ورید وداج و بورس فابرسیوس با ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۱ گرم توزین شده و نسبت وزن آنها به وزن بدن محاسبه شد.

جدول۱- مشخصات اجزای جیره و ترکیبات مواد غذایی

موادمتشکله (کیلوگرم/تن)	آغازین (۱۹-۵)	رشد (۳۳-۱۹)	پایانی (۴۲-۳۳)
ذرت	۵۸۷/۷	۶۴۴/۵	۷۲۲/۸
کنجاله سویا	۳۵۶/۳	۲۹۸/۷	۲۴۱/۹
دی کلسیم فسفات	۱۴/۸	۱۰/۹	۸/۶
کربنات کلسیم	۱۴/۲	۱۵/۱	۱۴/۴
مکمل ویتامین	۲/۵	۳/۵	۳/۵
مکمل معدنی	۲/۵	۲/۵	۲/۵
نمک طعام	۴/۲	۳/۱	۲/۳
روغن	۱۶/۴	۲۱	۳/۹
D-L-متیونین	۱/۵	۰/۶	۰
مقدار مواد مغذی			
انرژی	۲۹۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰
متابولیسمی(Kcal/Kg)	۲۰/۸۴	۱۸/۷۵	۱۶/۸۸
پروتئین خام (٪)	۰/۹۱	۰/۸۴	۰/۷۵
کلسیم(٪)	۰/۴۱	۰/۳۳	۰/۲۸
فسفر(٪)	۱/۳۵	۱/۱۹	۱/۰۵
آرژنین (٪)	۱/۱۲	۰/۹۷	۰/۸۴
لیزین(٪)	۰/۸۲	۰/۶۸	۰/۵۷
متیونین+سیستین(٪)	۰/۱۸	۰/۱۴	۰/۱۱
سدیم(٪)			

نتایج بدست آمده با استفاده از رویه GLM نرم افزار SAS (SAS, 2006)، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. به منظور بررسی اثر گروهها بر عملکرد و ارزیابی حساسیت پوستی به فیتوهماگلوتینین از طرح کاملا تصادفی و با نمونه‌گیری در داخل تکرار و جهت ارزیابی تیتر آنتی‌بادی در زمانهای مختلف از آزمون‌های تکرار شونده بر پایه طرح کاملا تصادفی با ۴ تیمار و ۵ تکرار در هر تیمار استفاده شد. میانگین‌ها از طریق آزمون چند دامنه‌ای دانکن مقایسه شدند.

نتایج و بحث

میانگین مصرف خوراک روزانه، میانگین افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک مصرفی در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد مصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل غذایی در گروههای آزمایشی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، میانگین افزایش وزن روزانه تحت تاثیر گروههای آزمایشی قرار نگرفت (P>۰/۰۵). گزارش شده استفاده از پروبیوتیک‌ها باعث کاهش مصرف خوراک روزانه شده است (Green & Sainsbury, 2001; Gunal et al., 2006; Zakeri & Kashefi, 2011). دلیل این امر توسط پروبیوتیک‌ها، بهبود استفاده از پروتئین، چربی، ویتامین و مواد معدنی از طریق محلول سازی و جذب بهتر آنها و سنتز بعضی ویتامین‌ها ذکر شده است (Green & Sainsbury, 2001). گزارش شده که پروبیوتیک پروتکسین هیچ تاثیر معنی‌داری بر افزایش وزن روزانه نداشت (Gunal et al., 2006). همچنین مشخص شده استفاده از اسید بوتریک و سطوح مختلف اسید فرمیک جیره‌ای هیچ تاثیری بر افزایش وزن روزانه جوجه‌ها نداشت (Lesson et al., 2005; Ghahri et al., 2006). تحقیقات نشان داده است استفاده از سطوح مختلف پروبیوتیک‌ها باعث بهبود ضریب تبدیل غذایی جوجه‌ها شد (Khaksefidi & Ghoorchi, 2006). محققین دلیل احتمالی آن را افزایش باکتری‌های مطلوب در مجرای گوارشی ذکر می‌کنند که از توسعه باکتریهای بیماریزا جلوگیری کرده و سموم حاصل از آن را خنثی می‌کنند. وجود این سموم در مجرای گوارشی باعث کاهش هضم پروتئین و شکستن آن به ازت می‌شود (Green & Sainsbury, 2001; Khaksefidi & Ghoorchi, 2006). مطالعات نشان داده است که ضریب تبدیل غذایی با مصرف اسیدهای آلی بهبود می‌یابد (Khaksefidi & Ghoorchi, 2006; Ghahri et al., 2006). افزودن اسیدهای آلی به خوراک باعث مهار میکروارگانیسم‌های موجود در آن شده و باعث بهبود عملکرد از طریق بهبود هضم و جذب مواد غذایی، کاهش تولید مواد سمی و کاهش تجزیه مواد مغذی در روده می‌شود (Dhawale, 2005). تیتر Anti-SRBC تام، IgG و IgM علیهSRBC در روزهای ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ دوره پرورش در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد تیتر Anti-SRBC تام در گروههای P و P+F مقادیر بالاتری داشت و تفاوت آن با گروههای شاهد و F معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). تیتر Anti-SRBC تام بین گروههای P و P+F معنی‌دار نبود. تیترIgG و IgM تحت تاثیر گروههای آزمایشی قرار نگرفت. میزان آنتی‌بادی‌های بوجود آمده بر علیه SRBC نشان دهنده وضعیت سیستم ایمنی هومورال است (Grasman, 2010).

جدول۲- اثر گروههای آزمایشی بر مصرف خوراک روزانه، افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک مصرفی

گروهها	مصرف خوراک روزانه (گرم)	افزایش وزن روزانه (گرم)	ضریب تبدیل خوراک مصرفی
C	۱۲۲/۲۳[a]	۵۵/۰۱[a]	۲/۲۲[a]
P	۱۰۳/۷۶[b]	۵۹/۰۹[a]	۱/۷۵[b]
F	۱۱۲/۹۰[b]	۵۸/۸۷[a]	۱/۹۱[b]
P+F	۱۱۰/۲۱[b]	۶۱/۱۰[a]	۱/۸۰[b]
SEM	۳/۰۰۸	۱/۷۴	۰/۰۹۸

C: شاهد، P: جیره حاوی g/kg ۰/۱پروتکسین، F: جیره حاوی ۰/۸٪ اسیدفرمیک، P+F: جیره حاوی g/kg۰/۱پروتکسین+ ۰/۸٪ اسیدفرمیک

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

با مصرف پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های مفید تکثیر یافته و باعث حذف رقابتی و تخریب میکروارگانیسم‌های مهاجم شده و یا از طریق جذب آنتی ژن آزاد شده از باکتری‌های مرده بیماری‌زا باعث تحریک سیستم ایمنی می‌شوند (Jin et al., 1998). گزارش شده افزودن مکمل لاکتوباسیلوس به جیره مرغان تخم‌گذار، سبب تحریک سیستم ایمنی مخاطی شد (Nahashon & Akaue, 1992). پروبیوتیک‌ها می‌توانند سبب افزایش جمعیت باکتری‌های مفید روده شده و با باکتری‌های مضر اثرات آنتاگونیستی داشته باشند. پروبیوتیک‌ها همچنین قادر

به آزاد کردن ویتامین‌های گروه B هستند که سیستم ایمنی را تحریک کرده و با تولید آنزیم‌های هضمی تولید اسیدهای چرب فرار را افزایش می‌دهند (Green & Sainsbury, 2001). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس می‌تواند در تولید آنتی‌بادی‌های روده‌ای نقش موثری داشته باشد و از نظر خاصیت ایمنی‌زایی، لاکتوباسیلوس کازئی بهترین میکروارگانیسم شناخته شده است (Fuller, 2001).

جدول ۳- تیتر Anti-SRBC تام، IgG,IgM (Log_2) در روزهای ۲۱، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ دوره پرورش

گروهها/آنتی‌بادی	Total Anti-SRBC	IgG	IgM
C	۴/۰۰[b]	۱/۹۵[a]	۲/۰۵[a]
P	۵/۵۰[a]	۲/۹۵[a]	۲/۵۵[a]
F	۴/۲۰[b]	۲/۰۰[a]	۲/۲[a]
P+F	۵/۸۰[a]	۳/۱۰[a]	۲/۷[a]
SEM	۰/۴۵	۰/۳۰	۰/۱۵

C: شاهد، P: جیره حاوی g/kg ۰/۱پروتکسین، F: جیره حاوی ۰/۸٪ اسیدفرمیک، P+F: جیره حاوی g/kg۰/۱پروتکسین+ ۰/۸٪ اسیدفرمیک
*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

همچنین مشخص شده که لاکتوباسیلوس کازئی به طور معنی‌داری مقادیر آنتی‌بادی را در پاسخ به سالمونلا تیفی موریوم افزایش داده است (Perdigon & Alvarez, 1991). گزارش شده تغذیه پرندگان با پروتکسین باعث افزایش تیتر آنتی‌بادی در برابر واکسن نیوکاسل شد(Zakeri & Kashefi, 2011). همچنین جوجه‌های تیمار شده با پروتکسین تیتر آنتی‌بادی بالاتری را در برابر ویروس آنفلوآنزای پرندگان نشان دادند (Ghafoor et al., 2005). بر اساس گزارش Kabir et al. (2004) مصرف پروتکسین تاثیر مثبتی بر واکنش سیستم ایمنی طیور به آنتی‌ژن SRBC داشت. آنها عنوان نمودند به طور کلی بهبود سیستم ایمنی تحت تاثیر پروبیوتیک‌ها از سه طریق افزایش آنتی‌بادی‌های عمومی، افزایش فعالیت ماکروفاژی و افزایش تولید آنتی‌بادی‌های موضعی در سطح مخاطی بافت‌هایی مثل دیواره روده انجام می‌شود.

اسید فرمیک در این آزمایش بر تیتر آنتی‌بادی‌ها تاثیر معنی‌داری نداشت. پژوهش‌ها نشان داده که اسیدهای آلی بیشترین تاثیر ضد باکتریایی را بر علیه کامپیلوباکترها در pH حدود۴ دارند. به دلیل بالاتر بودن pH چینه‌دان طیور نسبت به PK_a بعضی از اسیدهای آلی، مقداری از اسید پس از ورود به چینه‌دان به سرعت به پروتون و آنیون تفکیک می‌شود. این شکل یونیزه به دلیل داشتن بار الکتریکی قادر به عبور از غشای سلولی نبوده و بنابراین نمی‌تواند اثر باکتری‌کشی خود را اعمال کند. علت نتایج ضعیف استفاده از بعضی از اسیدهای آلی در تغذیه طیور را می‌توان به این موضوع نسبت داد (Chaveerach et al., 2004). گزارش شده که اسید فرمیک جیره‌ای در سطح ۰/۶٪ سبب کاهش محتویات اشریشیاکلی در چینه‌دان طیور شده، در حالی‌که بر شمار آنها در روده کوچک و سکوم بی تاثیر بود. گزارش شده مقادیر بیشتری اسید فرمیک (۱٪) در کاهش محتویات اشریشیاکلی در روده کوچک و سکوم، موثر و مشابه با آنتی‌بیوتیک عمل می‌کند (Panda, 2009). نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که اسید فرمیک جیره‌ای در سطح ۰/۸٪ برای تاثیرگذاری بر سیستم ایمنی هومورال جوجه‌ها کافی نبود.

تاثیر گروههای آزمایشی بر پاسخهای ایمنی سلولی به تزریق PHA-P در چین پوستی بال در جدول ۴ نشان داده شده است. ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تزریق PHA-P گروههای P و P+F نسبت به گروههای شاهد و F افزایش معنی‌داری در شاخص تحریک نشان دادند ($P<0/05$). همچنین گروه F نسبت به گروه شاهد افزایش معنی‌داری داشت ($P<0/05$). اختلاف بین

گروههای P و P+F معنی‌دار نبود (P>۰/۰۵). پاسخ پوست به تزریق PHA-P یک روش *in vivo* برای اندازه‌گیری فعالیت T-cell در ایمنی سلولی است. مقدار تورم پوستی بوجود آمده، ناشی از حضور لوکوسیت و فیلتراسیون مایع بعد از تزریق PHA-P است. PHA-P میتوژنی است که از لکتین مشتق می‌شود و جزء پروتئین‌های دانه لوبیای قرمز بوده که با گلیکوپروتئین‌ها پیوند برقرار می‌کند و به سطح سلولهای T می‌چسبد. در این آزمایش PHA-P لنفوسیت T را تحریک می‌کند و لنفوکائین تولید می‌شود، در نتیجه نفوذپذیری عروق بیشتر شده و لوکوسیتها به محل هجوم می‌آورند. لذا این روش نشان‌دهنده فعالیت T-cell است (Schrank et al., 1990; Grasman, 2010). در این تحقیق افزایش معنی‌دار ضخامت پوست نشان‌دهنده افزایش فعالیت سیستم ایمنی سلولی بود.

جدول۴- اثر گروههای آزمایشی بر واکنش چین پوستی بال به تزریق PHA-P

گروهها	شاخص تحریک بعد از ۲۴ ساعت (mm)	شاخص تحریک بعد از ۴۸ ساعت (mm)
C	۰/۱۶۶[c]	۰/۱۷۶[c]
P	۰/۴۹۲[a]	۰/۴۵۲[a]
F	۰/۳۲۴[b]	۰/۳۲۳[b]
P+F	۰/۴۱۶[a]	۰/۴۲[a]
SEM	۰/۰۷۰	۰/۰۶۲۰

C: شاهد، P: جیره حاوی ۰/۱g/kg پروتکسین، F: جیره حاوی ۰/۸٪ اسیدفرمیک، P+F: جیره حاوی ۰/۱g/kg پروتکسین+ ۰/۸٪ اسیدفرمیک

*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

مشخص شده که جیره‌های حاوی لاکتوباسیلوس باعث بهبود عملکرد لنفوسیت T در جوجه‌های تازه هچ شده و پولت‌ها می‌شود (Dunham et al., 1992). باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک در پروبیوتیک‌ها بر فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (NK) و بهبود وظایف سیستم ایمنی سلولی آنها می‌تواند موثر باشد (Gill et al., 2001). همچنین گزارش شده که تلقیح درون صفاقی لاکتوباسیلوس باعث تحریک ماکروفاژهای درون صفاقی و افزایش قابلیت فاگوسیتوز می‌شود (Dunham et al., 1992). ثابت شده باکتری‌های تولید کننده اسیدلاکتیک قادرند واکنش ایمنی غیر اختصاصی را با افزایش فعالیت ماکروفاژها بهبود ببخشند. همچنین مصرف ماست که منبعی از لاکتوباسیل‌هاست می‌تواند موجب تولید اینترفرون‌ها توسط لنفوسیت‌های تحریک شده با کونکاناوالین A شود (Gill et al., 2001).

بعضی گزارشها نشان داده افزودن اسیدهای آلی به جیره طیور می‌تواند به بهبود سیستم ایمنی کمک نماید که بستگی به مقدار آن در جیره دارد (Abdel-Fattah et al., 2008). نتایج این تحقیق نشان داد که اسید فرمیک جیره‌ای در سطح ۸/. ٪ بر سیستم ایمنی سلولی موثر بود. استفاده از اسیدهای آلی باعث فعال‌سازی آنزیم‌های پروتئولیتیک، کاهش تولید آمونیاک و متابولیت‌های میکروبی کاهنده رشد، جذب مطلوب مواد معدنی و کاهش عفونت‌های تحت بالینی می‌شود و به بهبود سیستم ایمنی کمک می‌کند (Dhawale, 2005). به این ترتیب اسیدهای آلی می‌توانند به عنوان ابزاری جهت کنترل باکتری‌های بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا بکار روند (Wolfenden et al., 2007). افزودن اسید فرمیک به جیره مرغان مادر توانست وقوع عفونت در جوجه-های تازه هچ شده را به طور معنی‌داری کاهش دهد (Humphrey & Lanning, 1988). تحقیقات نشان داد که اسیدی کردن جیره با اسیدهای ضعیفی چون فرمیک، فوماریک، پروپیونیک، لاکتیک و سوربیک سبب کاهش کلونیزه شدن باکتری‌های مضر و تولید کمتر متابولیت‌های سمی می‌شود. این اسیدها می‌توانند به عنوان سوبسترایی در متابولیسم عمل نموده و هضم

پروتئین، کلسیم، فسفر، منیزیم و روی را بهبود بخشند، به این ترتیب سبب کاهش بیماری‌ها و مدیریت بهتر بر آنها می‌شوند (Wolfenden et al., 2007). گزارش شده جوجه‌ها در سنین اولیه با مصرف اسید فرمیک در جیره می‌توانند در برابر عفونت‌های سالمونلایی محافظت شوند. در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد اسیدهای آلی محدودیت بیشتر و یکنواختی اثر کمتری بر جمعیت‌های باکتریایی دستگاه گوارش طیور دارند (Wolfenden et al., 2007). همچنین گزارش شده که اسیدهای آلی می‌توانند علاوه بر کاهش عوامل بیماری-زای خوراک، با ایجاد شرایط اسیدی در دستگاه گوارش، میکروارگانیسم‌های مضر را کاهش و میکروارگانیسم‌های مفید را افزایش دهند و به عبارتی باعث حذف رقابتی باکتری‌های بیماری‌زا از طریق کاهش حساسیت به بیماری‌ها و تاثیر مثبت در تحریک سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی شوند (Abdel-Fattah et al., 2008).

جدول۵- نسبت وزن اعضای لنفوئیدی به وزن بدن

گروهها	وزن بورس به وزن بدن	وزن تیموس به وزن بدن
C	۰/۱۲۴ c	۰/۶۰۲ b
P	۰/۲۰۱ b	۰/۸۲۴ a
F	۰/۲۶۳ a	۰/۹۲۹ a
P+F	۰/۲۱۴ ab	۰/۸۹۳ a
SEM	۰/۰۲۸	۰/۰۷۳

C: شاهد، P: جیره حاوی ۰/۱g/kg پروتکسین، F: جیره حاوی ۰/۸٪ اسیدفرمیک،
P+F: جیره حاوی ۰/۱g/kg پروتکسین+ ۰/۸٪ اسیدفرمیک
*حروف غیر مشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

نتایج این تحقیق نشان داد نسبت وزن تیموس و وزن بورس فابرسیوس به وزن لاشه قابل مصرف، تحت تاثیر گروههای آزمایش قرار گرفت (جدول ۵)، بطوریکه مصرف پروتکسین و اسید فرمیک به تنهایی و با هم باعث افزایش وزن تیموس و بورس شد ($P<0/05$). گزارش شده پروبیوتیک‌ها می‌توانند باعث افزایش سلول-ها در اندام‌های لنفوئیدی شوند (Shoeib & Sayed, 1997). همچنین گزارش شده که پروبیوتیک پروتکسین باعث افزایش وزن بورس فابرسیویس شد (Kabir et al., 2004). تحقیقات نشان داده که افزودن اسیدهای آلی از جمله اسید سیتریک منجر به افزایش تعداد سلول‌های مشارکت کننده در ایمنی در فولیکول‌های بورس در جوجه‌های گوشتی شد و وزن بورس را افزایش داد (Haque et al., 2010). Abdel-Fattah et al. (2008) گزارش کردند که استفاده از اسیدهای آلی در جوجه‌های گوشتی وزن بورس را افزایش داد. افزایش در وزن اندامهای مرتبط با سیستم ایمنی یک شاخص عملکرد مطلوب برای سیستم ایمنی محسوب می‌شود (Abdel-Fattah et al., 2008).

بطور کلی از نتایج این تحقیق استنتاج می‌شود، پروبیوتیک پروتکسین باعث بهبود عملکرد، سیستم ایمنی هومورال و سلولی شد. اسید فرمیک تاثیری بر ایمنی هومورال نشان نداد، اما باعث بهبود عملکرد و سیستم ایمنی سلولی شد. مصرف همزمان پروبیوتیک و اسید فرمیک تاثیر سینرژیستی بر عملکرد و سیستم ایمنی طیور نداشت.

REFERENCES

1. Abdel-Fattah, S., Sanhoury, A., Mednay, N. & Abdel-Azim, F. (2008). Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *Poultry Science*, 7, 215-222.
2. Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Lipman, A. & Van Knapen, F. (2004). Effect of organic acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid production, gut microflora and histological cell change. *Poultry Science*, 83, 330-334.

3. Denli, M., Okan, F. & Celik, k. (2003). Effect of dietary probiotic, organic acid and antibiotic supplementation to diets on broiler performance and carcass yield. *Journal of Nutrition*, 2, 89-91.
4. Dhawale, A. (2005). Better eggshell quality with a gut acidifier. *Poultry International*, 44(4), 18-21.
5. Dunham, H. & Wiliams, C. (1993). *Lactobacillus reuteri* immunomodulation of stressor associated diseases in newly hatched chickens and turkeys. *Poultry Science*, 72, 103.
6. Fuller, R. (2001). The chicken gut microflora and probiotic supplements. *Poultry Science*, 38:189-196.
7. Ghafoor, A., Naseem, S., Younus, M. & Nazir, J. (2005). Immunomodulatory effects of multistrain probiotics on broiler chickens vaccinated against avian influenza virus. *Poultry Science*, 4, 777-780.
8. Ghahri, H., Shivazad, M., Farhoomand, P., Eghbal, G. & Najafzadeh, M. (2006). Effect of organic acids in diet on performance of broiler. *Journal of Pajoohesh and Sazandegi*, 77, 26-33. (In Farsi)
9. Gill, H., Rutherfurd, G. & Cross, M. (2001). Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly. *Journal of Clinical Immunology*, 21(4):264- 271.
10. Grasman, K. A. (2010). *In vivo* functional test for assessing immunotoxicity in birds (Ed.), *Immunotoxicity testing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (pp. 387-397) Humana Press, Product.
11. Green, A. & Sainsbury, D. W. B. (2001). The role of probiotic in producing quality poultry products. In: proceeding of *XV European Symposium on the quality poultry meat*, 9-12 September, Antalya, Turkey, pp. 245-251.
12. Gunal, M., Yayli, G., Kaya, O., Karahan, N. & Sulak, O. (2006). The effects of antibiotic gowth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *Poultry Science*, 5(2), 149-155.
13. Haque, M., Islam, S,. Akbar, M. A., Chowdhury, R., Khatum, Karim, M. R. & Kemppainen, B. W. (2010). Effect of dietary citric acid, flavomycin and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broiler. *Animal Science*, 90, 57-63.
14. Humphrey, T. J. & Lanning, T. G. (1988). The vertical transmission of *salmonella* and formic acid treatment of chicken feed. *Epidemiology Infection*, 100, 43-49.
15. Jin, L. Z., Abdullah, N. & Jalaleldin, S. (1998). Growth performance, intestinal microbial population and serum cholesterol of broilers diets containing *Lactobacillus* cultures. *Poultry Science*, 77, 1259-1265.
16. Kabir, S. L. M., Rahman, M. M. & Ahmed, S. U. (2004). The dynamic of probiotic on gowth performance and immune response in broilers. *Poultry Science*, 3(5), 361-364.
17. Khaksefidi, A. & Ghoorchi, T. (2006). Effect of probiotic on performance and immunocompetence in broiler chicks. *Journal of Poultry Science*, 43, 296-300.
18. Lesson, S. H., Namkung, M., Antongiovanni, E. & Lee, H. (2005). Effect of butyric acid on the performance and carcass yield on broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 84, 1418-1422.
19. Nahashon, S. N. & Akaue, H. S. N. (1992). Effect of direct-fed microbial on nutrient retention and production parameters of laying pullets. *Poultry Science*, 71, 111.
20. NRC, (1994). *Nutrient requirements of poultry* (9 th ed), National Academy Press. Washington. D.C.
21. Panda. A. K., Raju, M., Rama, V., Shyam Sunder, G. & Reddy, M. R. (2009). Effects of gaded levels of formic acid on gut microflora count, serum biochemical parameters, performance and carcass yield of broiler chickens. *Indian Journal of Animal Science*, 79, 1165-1168.
22. Perdigon, G. & Alvarez, S. (1991). Immunoadjuvant activity of oral *Lactobacillus casei*, influence dose on the secretory immune response and protective capacity in intestinal infections. *Dairy Research*, 58, 485-496.
23. SAS Institute. (2006). *SAS/STAT user's guide.* Version 9.1. SAS Inst. Cary, N.C.
24. Schrank, C. S., Cook, M. E. & Hansen. W. R. (1990). Immune response of mallard ducks treated with immunosuppressive agent: antibody response to erythrocytes and *in vivo* response to phytohemagglutinin-p. *Wildlife Diseases*, 26, 307-315.
25. Shoeib, H. K. & Sayed, A. N. (1997). Response of broiler chicks to probiotic supplementation. *Veterinary Medical*, 36:103-116.
26. Vali, N. (2009). Probiotic in quail nutrition: A Review. *International Journal of Poultry Science*, 8 (12), 1218-1222.
27. Wolfenden, A., Vicente, L., Higgins, J. P., Andreatti Filho, R. L., Higgins, S. E., Hargis, B. M. & Tellez, G. (2007). Effect of organic acids and probiotics on *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Poultry Science*, 6, 403-405.
28. Zakeri, A. & Kashefi, P. (2011). The comparative effects of five growth promoters on broiler chickens humoral immunity and performance. *Animal and Veterinary Advances*, 10(9), 1097-1101.