

## اثر سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی (*Artemisia sieberi*) بر خصوصیات مورفولوژی روده، جمعیت میکروبی و سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی

شکوفه غضنفری<sup>۱\*</sup> مسعود ادیب مرادی<sup>۲</sup> فرزانه رحیمی نیت<sup>۱</sup>

(۱) گروه علوم دام و طیور، پردیس ابوریحان دانشگاه تهران، تهران-ایران

(۲) گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران-ایران

(دریافت مقاله: ۸ بهمن ماه ۱۳۹۳، پذیرش نهایی: ۲۹ فروردین ماه ۱۳۹۴)

چکیده

**زمینه مطالعه:** اسانس‌ها به عنوان محرک‌های رشد نقش مهمی در بهبود فلور میکروبی و خصوصیات مورفولوژیکی روده و سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی دارند. **هدف:** هدف از تحقیق حاضر، بررسی سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی بر مورفولوژی روده، جمعیت میکروبی سکوم و سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی بود. **روش کار:** از ۲۰۰ قطعه جوجه یک روزه سویه راس (۳۰۸) در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار به مدت ۴۲ روز استفاده شد. تیمارهای آزمایشی شامل شاهد (جیره پایه)، سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ mg/kg آنتی بیوتیک فلووفسفولیپول + جیره پایه بودند. در ۴۲ روزگی، خصوصیات مورفولوژی و جمعیت میکروبی روده و سیستم ایمنی از طریق اندازه‌گیری وزن بورس و طحال و اندازه‌گیری پادتن تولیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. **نتایج:** تیمار اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg و تیمار آنتی بیوتیک بیشترین جمعیت لاکتوباسیل و کمترین جمعیت اشرشیاکلی را در بین تیمارهای آزمایشی داشتند ( $p < 0/001$ ). تیمارهای اسانس درمنه دشتی و آنتی بیوتیک بیشترین ارتفاع پرز را در بخش دئودنوم نسبت به تیمار شاهد داشتند ( $p < 0/01$ ). ضخامت لایه اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت در تیمارهای اسانس درمنه دشتی و آنتی بیوتیک در تمامی بخش‌های روده کوچک کمتر از تیمار شاهد بود ( $p < 0/05$ ). از نظر عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت اختلاف معنی‌داری بین تیمارها مشاهده نشد. تیمار اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg دارای بیشترین مقدار تیترونیوکاسل بود ( $p > 0/01$ ). **نتیجه گیری نهایی:** افزودن اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی می‌تواند در تثبیت میکروفلورای مفید (لاکتوباسیل) و کاهش باکتری‌های مضر (اشرشیاکلی) سکوم مؤثر باشد.

**واژه‌های کلیدی:** تیترونی بادی، درمنه دشتی، جوجه گوشتی، لاکتوباسیل، ارتفاع پرز

### مقدمه

اروپا و آمریکا برده شده است. درمنه یکی از گیاهان با ارزش مناطق بیابانی ایران است که پراکندگی جغرافیایی آن در برگیرنده سراسر ایران به جز نواحی غربی است (۳۴). Lopes-Lutz و همکاران در سال ۲۰۰۸ مهم‌ترین ترکیبات موجود در گیاه درمنه را ساینین، بتاتیوجن، میرسن و کامفور بیان کردند و اسانس این گیاه را به سه گروه شیمیایی اصلی تقسیم کردند؛ اسانس غنی از تیوجن، اسانس غنی از ساینین و اسانس غنی از اپوکسی سیمن (۲۰). Yousefi و همکاران در سال ۲۰۰۵، نشان دادند فعالیت ضد میکروبی اسانس *Artemisia haussknechti* از آنتی بیوتیک‌های مانند نالیدیسیک اسید، جنتامایسین، سفالونین، آموکسی سیلین بیشتر است (۳۳). ترکیبات اصلی اسانس این گیاه سینثول، کامفور، آرتمیزین و بورنئول می‌باشد. Royo و همکاران در سال ۱۹۹۹، با انجام تحقیقات روی اسانس گیاه *Artemisia sieberi* خواص ضد میکروبی آن را به وجود ترکیباتی مانند کامفور، آلفاتیوجن، سینثول، میرسن بورنئول، سیمن نسبت دادند (۲۷). آرتمیزین یک سزکویی ترین لاکتون است که از گیاه درمنه سبیری بدست می‌آید، آرتمیزین در ساختمان شیمیایی خود دارای یک گروه اندوپراکسید تری اکسان است که فعالیت بیولوژیک از جمله فعالیت ضد مالاریایی دارد (۱۲). در پزشکی سنتی ایران، از دم کرده این گیاه برای

نگهداری صنعتی طیور در ابعاد وسیع و به صورت فشرده، امکان بروز بیماریها را افزایش داده که جهت کاهش میزان وقوع این بیماریها و نیز کمک به افزایش رشد و بهبود صفات تولیدی از مواد شیمیایی مختلف از جمله آنتی بیوتیک‌ها در سطح وسیعی در واحدهای پرورش جوجه‌های گوشتی استفاده می‌شود (۱۹). استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به واسطه ایجاد مقاومت دارویی در انسان، پسمان دارو در لاشه و به هم خوردن تعادل میکروفلور طبیعی روده ممنوع شده است. به گونه‌ای که در بسیاری از نقاط جهان توصیه‌های فراوانی در راستای عدم استفاده از آنتی بیوتیک‌های محرک رشد می‌شود، لذا برای جبران این کاهش رشد، یافتن جایگزین‌های مناسب ضروری است. در سال‌های اخیر، گیاهان آروماتیک و عصاره آنها به عنوان محرک‌های بالقوه رشد، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. درمنه دشتی با نام علمی *Artemisia sieberi* Besser از خانواده Compositae تیره Radiae می‌باشد. درمنه گیاهی بوته‌ای به رنگ سبز متمایل به خاکستری و دارای ریشه عمودی ضخیم و ساقه‌های گلدار به ارتفاع ۳۰ تا ۴۰ cm می‌باشد. جنس درمنه دارای بیش از ۴۰۰ گونه در سطح جهان و ۳۴ گونه در ایران می‌باشد. موطن اصلی آن آسیا بوده و از این قاره به



درمان نارسایی کبد، گلودرد، عفونت گوش، اشتها آور، ضد انگل اسکاریس، درمان نفخ و ضد التهاب استفاده می‌شود (۵). فلور میکروبی دستگاه گوارش نقش مهمی در تغذیه، سم‌زدایی، ترکیبات مشخص، رشد و حفاظت در مقابل باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کند. در جوجه‌ها عدم وجود میکروفلور طبیعی یک عامل اصلی برای ایجاد عفونت باکتریایی می‌باشد. از طرفی مشخص شده که فلور میکروبی نرمال دستگاه گوارش دارای آثار مثبتی بر سیستم ایمنی بدن می‌باشد. اسانس‌ها نقش شاخص و عملکردی مهمی در تغییر و اصلاح میکروفلور روده‌ای و موضعی شدن باکتری‌های پاتوژن ایفا می‌کنند. به نظر می‌رسد بیشترین خاصیت ضد میکروبی در کلیه اسانس‌های مورد مطالعه از ترکیب‌های مونوترپنی ناشی می‌شود. ثابت شده است که ترکیب اصلی گیاه درمنه یک مونوترپن بنام تیوجن می‌باشد، مصرف این گیاه موجب افزایش ترشح اسید معده و تولید صفرا می‌شود که در دسترسی بهتر به مواد مغذی و تکامل سیستم ایمنی و حجم آنتی بادی تولیدی تأثیر گذار است (۲۱). Khalaji و همکاران در سال ۲۰۱۱، نشان دادند افزودن پودر برگ درمنه سیبری به میزان ۱٪ در جیره جوجه‌های گوشتی موجب افزایش مونوسیت و فعالیت بیشتر ماکروفاژها در ارتباط با سیستم ایمنی می‌شود، اما در پاسخ ایمنی بر علیه تزریق گلبول قرمز گوسفند تأثیری نداشت. آنها همچنین گزارش کردند پودر برگ درمنه سیبری جمعیت *E. coli* و کلی فرم در سکوم را کاهش می‌دهد، اما تأثیری بر جمعیت لاکتوباسیل ندارد (۱۷). ثابت شده است حضور میکروفلورای مفید سبب افزایش طول پرز، کریپت و تکثیر سلولی می‌گردد، همچنین باکتری‌های بیماری‌زا با تولید ترکیبات سمی مانند آمونیاک، باعث تخریب لایه اپیتلیوم می‌شوند و با افزایش ترن‌آور سلولی برای نوسازی سلول‌های آتروفی شده ارتفاع پرز کاهش و عمق کریپت افزایش می‌یابد. همچنین گزارش شده است که ارتفاع پرز روده جوجه‌های تغذیه شده با مکمل اسیدآلی و گیاهان دارویی در مقایسه با گروه شاهد بالاتر می‌باشد (۱). هدف از این تحقیق بررسی سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی *Artemisia sieberi* بر مورفولوژی روده، جمعیت میکروبی سکوم و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌باشد.

## مواد و روش کار

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۰۰ قطعه جوجه گوشتی رأس سویه ۳۰۸ با ۵ تیمار و ۴ تکرار و تعداد ۱۰ پرنده در هر تکرار انجام شد. جیره‌های آزمایشی بر اساس ذرت کنجاله سویا با توجه به نیازمندی‌های توصیه شده توسط کاتالوگ رأس ۳۰۸ برای دوره‌های مختلف آغازین (۱۰-۱ روزگی)، رشد (۲۴-۱۱ روزگی) و پایانی (۴۲-۲۵ روزگی) با استفاده از نرم افزار جیره نویسی UFFDA تنظیم گردیدند (جدول ۱). تیمارهای آزمایشی شامل: (۱) جیره پایه +۱۰۰ mg/kg اسانس درمنه دشتی، (۲) جیره پایه +۲۰۰ mg/kg اسانس درمنه دشتی، (۳) جیره پایه +۳۰۰ mg/kg اسانس درمنه دشتی، (۴) شاهد (جیره پایه و فاقد اسانس درمنه دشتی)، (۵) جیره پایه

برای بررسی تغییرات مورفولوژیکی در روده کوچک جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی، از هر تکرار ۱ پرنده با وزن نزدیک به میانگین انتخاب، کشتار شده و از هر سه قسمت روده، دئودنوم (قسمت میانی دئودنوم)، ژژنوم (قسمت میانی ژژنوم) و ایلئوم (۵ cm بعد از زائده مکل) هر یک به اندازه ۲ cm نمونه برداری انجام شد. نمونه‌ها پس از شستشو با محلول بافر فسفات سالین (PBS) به داخل ظروف پلاستیکی حاوی ۶-۷ mL فرمالین ۱۰٪ انتقال یافتند. برای تهیه اسلایدهای بافتی با ضخامت کم از روش واکس پرافین استفاده شد. آزمایش‌های مورفولوژی مطابق با روش I و II و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شد (۱۶). برای برش‌گیری از قالب پارافینی از دستگاه میکروتوم استفاده شد. برش‌های انجام شده ضخامت در حدود ۶ μm داشتند. از اتوزین برای رنگ‌آمیزی و از میکروسکوپ نوری متصل به کامپیوتر برای بررسی مورفولوژی روده استفاده شد. پارامترهای ارتفاع پرز، عمق کریپت، ضخامت اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت اندازه‌گیری شد و نسبت بین ارتفاع پرز به عمق کریپت از طریق محاسبه بدست آمد.

برای بررسی غلظت تیتر آنتی بادی، واکسن نیوکاسل-آنفلانزا به صورت ترکیبی در ۸ روزگی به صورت زیر جلدی تزریق شد. همچنین



جدول ۱. ترکیب جیره غذایی پایه دوره‌های مختلف رشدی در جوجه‌های گوشتی<sup>(\*)</sup> ترکیب مکمل معدنی استفاده شده به ازای هر کیلوگرم شامل: ۵۰ مگنیز، ۵۰ g روی، ۲۵ g آهن، ۵ g مس، ۵۰۰ mg ید، ۱۰۰ mg سلنیوم می‌باشد. <sup>(\*\*)</sup> ترکیب مکمل مکمل ویتامینی استفاده شده به ازای هر کیلوگرم شامل: ۲۵۰۰۰۰ IU ویتامین A، ۱۰۰۰۰۰ IU ویتامین D<sub>3</sub>، ۹۰۰۰ IU ویتامین E، ۳۳۰۰ mg B<sub>12</sub>، ۷/۵ mg ریبوفلاوین، ۱۵۰۰۰ mg نیاسین، ۵۰۰۰ mg پانتوتینیک اسید، ۱۰۰۰ mg منادین، ۱۵۰ mg پیریدوکسین، ۵۰۰ mg بیوتین، ۲۵۰۰۰ mg کولین می‌باشد.

اجزای جیره (%)	دوره آغازین (۱-۱۰ روزگی)	دوره رشد (۱۱-۲۴ روزگی)	دوره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی)
ذرت	۵۵/۹۵	۵۷/۷۲	۶۳
کنجاله سویا	۳۶/۶۵	۳۴/۲۶	۲۹/۲۵
روغن سویا	۲/۷۹۵	۴/۱۷	۴
دی کلسیم فسفات	۱/۷۸۵	۱/۴۵	۱/۳۵
سنگ آهک	۱/۳۳	۱/۱۶	۱/۱۴
نمک	۰/۲	۰/۲	۰/۲۹
مکمل ویتامینی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال-متیونین	۰/۳۹	۰/۳۲۵	۰/۲۷
ال-لایزین	۰/۴	۰/۲۱۵	۰/۲
انرژی قابل سوخت و ساز (Kcal/kg)	۲۹۳۸	۳۰۵۵	۳۱۰۰
(%) ماده خشک	۸۶/۱۰	۸۶/۸۶	۸۶/۸۷
(%) پروتئین خام	۲۱/۴۸	۲۰/۳۷	۱۸/۵۷
(%) کلسیم	۱/۰۱	۰/۹۱	۰/۸۲
(%) فسفر قابل دسترس	۰/۵۱	۰/۴۴	۰/۴۱
(%) لایزین	۱/۴۰	۱/۲۹	۱/۰۶
(%) متیونین	۰/۷۲	۰/۶۵	۰/۵۷
(%) سدیم کلراید	۰/۱۱	۰/۱۱	۰/۱۵

جدول ۲. اثر سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی بر جمعیت میکروفلور سکوم در جوجه‌های گوشتی (۴۲ روزگی). تفاوت ارقام در هر ستون با حروف غیر مشابه معنی دار است ( $p < 0.05$ ). <sup>(\*\*)</sup> خطای استاندارد میانگین. \* cfu: واحد کلونی شکل یافته.

تیمار	میکروفلور سکوم (Log *cfu/g)
لاکتوباسیل	لاکتوباسیل
۱۰۰ mg/kg	۴/۸۵ <sup>b</sup>
۲۰۰ mg/kg	۵/۷۳ <sup>b</sup>
۳۰۰ mg/kg	۶/۲۹ <sup>a</sup>
شاهد	۵/۷۴ <sup>a</sup>
آنتی بیوتیک	۳/۳۳ <sup>c</sup>
SEM <sup>(**)</sup>	۰/۱۴۵
p Value	< ۰/۰۰۰۱

علیه ویروس آنفولانزا و نیوکاسل در جدول ۴ گزارش شده است. تیترا آنفولانزا تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ( $p > 0.05$ ). غلظت تیترا نیوکاسل در تیمار ۳۰۰ mg/kg و ۱۰۰ اسانس درمنه دشتی در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین بود ( $p < 0.01$ ). همچنین از نظر وزن بورس و طحال اختلاف معنی داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

واکسن نیوکاسل (لاسوتا) در ۱۸ روزگی از طریق آب آشامیدنی به جوجه‌ها داده شد. سپس جهت تعیین تیترا آنتی‌بادی در سن ۲۸ روزگی از هر تکرار به طور تصادفی ۲ قطعه پرندۀ انتخاب و خونگیری از ورید بال به میزان ۲ mL انجام شد و نمونه‌های خون جهت اندازه‌گیری پارامترهای خونی به آزمایشگاه انتقال یافت. در آزمایشگاه نمونه‌های خون پس از جداسازی سرم بوسیله سانترفیوژ در ۳۰۰۰ rpm دور در دقیقه برای تعیین تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل و آنفولانزا با استفاده از روش ممانعت از هم‌آگلوتیناسیون (HI) مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین در سن ۴۲ روزگی در زمان کشتار دو پرندۀ از هر تکرار انتخاب و وزن نسبی بورس فابریسیوس و طحال اندازه‌گیری شد و به صورتی درصدی نسبت به وزن زنده بیان شد. همه داده‌های درصدی قبل از تجزیه آماری به Arcsin تبدیل شدند. داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۴ تکرار با استفاده از رویه GLM در نرم افزار SAS تجزیه آماری گردید. تفاوت بین میانگین تیمارها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای توکی آزموده شد و معنی داری در سطح ۵٪ مورد بررسی قرار گرفت.

## نتایج

**جمعیت میکروبی سکوم:** اثر تیمارهای آزمایشی بر جمعیت میکروبی سکوم در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان داد که از لحاظ جمعیت باکتریایی و میکروفلور روده‌ای بین گروه‌های مختلف آزمایشی اختلاف معنی داری وجود دارد ( $p < 0.05$ ). بطوریکه تیمار اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg و تیمار آنتی بیوتیک بیشترین جمعیت لاکتوباسیل و کمترین جمعیت اشرشیاکلی را در بین تیمارهای آزمایشی داشتند ( $p < 0.0001$ ). تیمار شاهد کمترین جمعیت لاکتوباسیل و بیشترین جمعیت اشرشیاکلی را در بین تیمارهای آزمایشی داشت ( $p < 0.0001$ ). تیمارهای اسانس درمنه دشتی در سطوح ۱۰۰ mg/kg و ۲۰۰ از نظر جمعیت‌های لاکتوباسیل و اشرشیاکلی در حد متوسط بودند.

**خصوصیات مورفولوژی روده کوچک:** اثر تیمارهای آزمایشی بر خصوصیات مورفولوژیکی در جدول ۳ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اسانس درمنه دشتی بر ارتفاع پرز در دئودنوم و ضخامت لایه اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت در بخش‌های دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم تأثیر معنی داری می‌گذارد. به طوریکه تیمارهای اسانس درمنه دشتی و آنتی بیوتیک بیشترین ارتفاع پرز را در بخش دئودنوم نسبت به تیمار شاهد داشتند ( $p < 0.01$ ). ضخامت لایه اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت در تیمارهای اسانس درمنه دشتی و آنتی بیوتیک در تمامی بخش‌های روده کوچک کمتر از تیمار شاهد بود ( $p < 0.05$ ). عمق کریپت و نسبت ارتفاع پرز به عمق کریپت در بخش‌های دئودنوم، ژژنوم و ایلئوم از لحاظ آماری بین تیمارها تأثیر معنی داری نشان نداد ( $p > 0.05$ ).

**سیستم ایمنی:** نتایج مربوط به اثر تیمارهای آزمایشی بر تیترا آنتی‌بادی



جدول ۳. اثر سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی بر خصوصیات مورفولوژی روده باریک در جوجه‌های گوشتی (۴۲ روزگی).<sup>(۱)</sup> تفاوت ارقام در هر ردیف با حروف غیر مشابه معنی دار است ( $p < 0.05$ ).<sup>(۲)</sup> خطای استاندارد میانگین.

p value	±SEM	آنتی بیوتیک	شاهد	۳۰۰ mg/kg	۲۰۰ mg/kg	۱۰۰ mg/kg	تیمار / پارامترها (µm)
							دفونوم
۰/۰۰۹	۵/۹۵	۱۷۶۰/۵ <sup>a</sup>	۱۷۳۷/۵ <sup>b</sup>	۱۷۶۸/۷ <sup>a</sup>	۱۷۶۹/۵ <sup>a</sup>	۱۷۶۶ <sup>a</sup>	ارتفاع پرز
۰/۲۳۳	۲/۸۱	۱۴۹/۲۵	۱۴۲/۲۵	۱۵۰/۲۵	۱۵۰/۵	۱۵۰/۲۵	عمق کریپت
۰/۵۱۱	-۰/۲۲	۱۱/۷۹	۱۲/۲۴	۱۱/۷۸	۱۱/۷۶	۱۱/۷۷	نسبت ارتفاع/عمق
۰/۰۰۷	۲/۰۱۵	۴۳ <sup>b</sup>	۴۹/۲۵ <sup>a</sup>	۳۸ <sup>b</sup>	۳۸/۵ <sup>b</sup>	۴۰ <sup>b</sup>	ضخامت لایه اپیتلیوم
۰/۰۰۲	-۰/۶۲۵	۷/۲۵ <sup>b</sup>	۱۰/۲۵ <sup>a</sup>	۶ <sup>b</sup>	۶/۲۵ <sup>b</sup>	۷ <sup>b</sup>	تعداد سلول‌های گابلت
							ژژنوم
۰/۱۲	۴/۲۶	۸۶۰	۸۴۴	۸۵۴/۵	۸۵۸/۲۵	۸۵۱/۷۵	ارتفاع پرز
۰/۱۵۸	۲/۹۵	۱۴۸/۵ <sup>ab</sup>	۱۴۴/۷۵ <sup>b</sup>	۱۵۵ <sup>a</sup>	۱۵۳ <sup>ab</sup>	۱۵۲/۵ <sup>ab</sup>	عمق کریپت
۰/۳۳۹	-۰/۱۲	۵/۷۹	۵/۸۳	۵/۵۱	۵/۶۱	۵/۵۹	نسبت ارتفاع/عمق
۰/۰۵	۱/۶۵۵	۳۴ <sup>b</sup>	۴۳ <sup>a</sup>	۳۵/۲۵ <sup>b</sup>	۳۴/۵ <sup>b</sup>	۳۶/۲۵ <sup>ab</sup>	ضخامت لایه اپیتلیوم
۰/۰۰۰۵	-۰/۴۳۷	۶/۵ <sup>b</sup>	۹/۷۵ <sup>a</sup>	۶/۵ <sup>b</sup>	۶/۵ <sup>b</sup>	۷/۷۵ <sup>b</sup>	تعداد سلول‌های گابلت
							ایلنوم
۰/۱۲۶	۶/۱۶	۷۸۹	۷۷۵/۵	۷۹۷/۵	۷۹۷	۷۹۳	ارتفاع پرز
۰/۵۵۷	۴/۱	۱۰۹/۵	۹۹/۵	۱۰۶	۱۰۴	۱۰۴/۵	عمق کریپت
۰/۷۴۷	-۰/۳۱۷	۷/۲۴	۷/۸۴	۷/۵۶	۷/۶۹	۷/۶	نسبت ارتفاع/عمق
۰/۰۰۱	۱/۶۷	۲۵/۷۵ <sup>b</sup>	۳۷/۷۵ <sup>a</sup>	۲۶/۷۵ <sup>b</sup>	۲۸/۵ <sup>b</sup>	۳۱ <sup>b</sup>	ضخامت لایه اپیتلیوم
۰/۰۰۲	-۰/۴۷۸	۵/۷۵ <sup>c</sup>	۹/۵ <sup>a</sup>	۶ <sup>c</sup>	۷ <sup>bc</sup>	۷/۷۵ <sup>b</sup>	تعداد سلول‌های گابلت

دو طریق سیستم ایمنی را تقویت و تحریک نمایند، این میکروارگانیسم‌ها در طول دیواره روده تکثیر و توسعه پیدا می‌کنند و یا این که با کمک آنتی ژن‌های آزاد شده، میکروارگانیسم‌های مرده را جذب و مستقیماً ایمنی را تحریک می‌نمایند (۳۲). مطالعات مختلفی انجام شده که در آن اثرات ضد میکروبی اسانس‌های مختلف علیه باکتری *E. coli* فلور روده پرندگان مورد بررسی قرار گرفته است (۲۶). Farzin و Mahboubi در سال ۲۰۰۹ نشان دادند که اسانس درمنه دشتی جمع آوری شده از منطقه کاشان در برابر میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله باکتری‌های گرم مثبت، باکتری‌های گرم منفی، مخمرها و قارچ‌ها فعالیت ضد میکروبی نشان می‌دهد، که در این میان باکتری‌های گرم مثبت و قارچ‌ها نسبت به باکتری‌های گرم منفی حساسیت بیشتری نشان دادند. آنها همچنین نتیجه گرفتند که خاصیت ضد میکروبی اسانس درمنه دشتی در مقایسه با آنتی‌بیوتیک بی‌سروس و آل-مونوسیتوزنوس بر علیه باکتری گرم مثبت بیشتر می‌باشد (۲۲). طی بررسی که توسط Greathead در سال ۲۰۰۳ انجام شده است، فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی در شرایط درون تنی به خاطر ماهیت چربی دوستی آنها می‌باشد که باعث تخریب یکپارچگی و ساختار غشای باکتریایی از طریق غیرفعال سازی آنزیم‌های خارج سلولی باکتریایی می‌باشد (۱۳). در کل این نتایج نشان دادند که افزودن اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی می‌تواند در تثبیت میکروفلورای مفید سکوم مؤثر باشد و در مقابل می‌تواند متأثر از شرایط تغذیه‌ای و محیطی دستخوش تغییرات اساسی گردد.

جدول ۴. اثر سطوح مختلف اسانس درمنه دشتی بر سیستم ایمنی در جوجه‌های گوشتی.<sup>(a-b-c)</sup> تفاوت ارقام در هر ستون با حروف غیر مشابه معنی دار است ( $p < 0.05$ ).<sup>(\*)</sup> خطای استاندارد میانگین.

تیمار	تیترا آنفولانزا	تیترا نیوکاسل	% یورس	%طحال
۱۰۰ mg/kg	۳/۵	۵/۲۵ <sup>ab</sup>	۰/۲۹۶	۰/۱۲
۲۰۰ mg/kg	۳/۶۲	۴/۲۵ <sup>b</sup>	۰/۳۱	۰/۱۳
۳۰۰ mg/kg	۳/۸۷	۷/۱۲ <sup>a</sup>	۰/۳۰	۰/۱۴
شاهد	۳/۸۷	۴/۲۵ <sup>b</sup>	۰/۳۲	۰/۱۲
آنتی بیوتیک	۴/۱۲	۴/۳۷ <sup>b</sup>	۰/۲۹	۰/۱
SEM*	-۰/۲۹	-۰/۵۵	-۰/۰۱	-۰/۰۱
p Value	-۰/۶۳	-۰/۰۲	-۰/۱۶	-۰/۱۹

## بحث

**جمعیت میکروبی سکوم:** در این تحقیق، تیمار اسانس درمنه دشتی در سطح ۳۰۰ mg/kg و تیمار آنتی بیوتیک بیشترین جمعیت لاکتوباسیل و کمترین جمعیت اشرشیاکلی را در بین تیمارهای آزمایشی داشتند ( $p < 0.0001$ ). این یافته‌ها با نتایج Tiitonen و همکاران در سال ۲۰۱۰ که بیان کردند اسانس باعث بهبود و تثبیت میکروفلورای سکوم به ویژه افزایش لاکتوسیلوس در ۴۲ روزگی می‌شود، مطابقت داشت (۳۰). لاکتوباسیل‌ها به همراه بیفیدوباکترها با تولید اسید استیک و اسید لاکتیک و همچنین کاهش pH می‌توانند مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شوند. لاکتوباسیل‌ها قادرند از



کارواکرول، کورکومین و پیرین بود بیان نمودند که این مواد سبب کاهش تکثیر کلسترییدیوم پرفرنجس در روده و افزایش سطح ایمنی بدن آنها می‌گردد که شاید بتوان بهبود پاسخ ایمنی در ارتباط با تیترا (نیوکاسل یا آنفولانزا) را در استفاده از اسانس درمنه دشتی را به این موارد ربط داد (۲۳). Haq و همکاران در سال ۱۹۹۹، با بررسی اثر گیاه دارویی سیر گزارش کردند که تیترا آنتی بادی بر علیه نیوکاسل در ۸ هفته‌گی در تیمارهایی که در جیره خود سیر مصرف می‌نمودند، نسبت به شاهد بالاتر بود اما این برتری از لحاظ آماری معنی‌دار نبود (۱۴). El-Habbak و همکاران در سال ۱۹۸۹ بیان داشتند که استفاده از سیر در جیره موجب افزایش تیترا آنتی بادی در بلدرچین ژاپنی می‌شود (۷). Cook و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند گیاه Astegalan وزن نسبی بورس را در ۲۸ روزگی نسبت به گروه کنترل افزایش می‌دهد (۴). در مطالعه دیگری Dong و همکاران در سال ۲۰۰۷، افزایش وزن نسبی طحال، بورس و تیموس را در جوجه‌های گوشتی تغذیه شده با عصاره یونجه گزارش کردند (۶). در تحقیقات صورت گرفته توسط Takahashi و همکاران در سال ۲۰۰۰ مشخص شده که گیاهان دارویی رشد اندام‌های ایمنی را تحریک می‌کنند (۲۸).

در کل این نتایج نشان دادند که افزودن اسانس درمنه دشتی به جیره غذایی جوجه‌های گوشتی می‌تواند در تثبیت میکروفلورای مفید (لاکتوباسیل) و کاهش باکتری‌های مضر (شرشیاکلی) سکوم مؤثر باشد. باکتری‌ها می‌توانند باعث تغییرات در ساختار مخاط روده کوچک در جوجه‌های گوشتی شوند به طوری که در این آزمایش مشخص شد که استفاده از اسانس درمنه دشتی ارتفاع پرز را در دئودنوم افزایش و ضخامت لایه اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت را در روده کوچک کاهش داد. همچنین استفاده از اسانس درمنه دشتی در جیره طیور بدلیل مهار میکروب‌های بیماریزا و خنثی کردن سموم حاصله از آنها به واسطه ترکیبات ضد میکروبی موجب بهبود میکروفلور روده به واسطه غالب شدن لاکتوباسیل‌ها می‌شود که این سبب ایجاد ایمنی مؤثر و مطلوب در پرنده می‌شود به طوری که سطح  $300 \text{ mg/kg}$  اسانس درمنه دشتی دارای بیشترین میزان تیترا نیوکاسل در جوجه‌های گوشتی بود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه تهران-پردیس ابوریحان به خاطر حمایت مالی تحت شماره اعتبار پژوهشی ۲۷۳۴۱/۰۷ برای اجرای این طرح کمال سپاس را دارند.

### References

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils. Food. Chem Toxicol. 46: 446–75.
- Bauer, R. (1996) Echinacea drugs, effects and ac-

خصوصیات مورفولوژی روده کوچک: در این آزمایش مشخص شد که استفاده از اسانس درمنه دشتی ارتفاع پرز را در دئودنوم افزایش و ضخامت لایه اپیتلیوم و تعداد سلول‌های گابلت را در روده کوچک کاهش داد. مخاط دستگاه گوارش اولین بافتی است که در تماس با ترکیبات تغذیه‌ای است. وضعیت مخاط و ساختار میکروسکوپی آن شاخص خوبی از پاسخ روده به مواد فعال در خوراک و تغییرات مورفولوژی روده‌ای مانند پرزهای کوتاه‌تر و عمیق شدن کریپت در حضور مواد سمی می‌باشد (۳۱). افزایش ارتفاع ویلی منجر به افزایش سطح تماس و در نتیجه باعث جذب بیشتر مواد مغذی می‌شود (۳). به نظر می‌رسد کاهش تعداد سلول‌های گابلت متعاقب استفاده از اسانس، مربوط به شرایط تنش کمتر در محیط داخلی روده به دلیل کاهش بار میکروبی باشد که منجر به کاهش احتیاج برای محافظت لایه موکوسی می‌شود. از طرفی اسیدهای چرب فرار موجود در اسانس گیاهان موجب افزایش سرعت تولید سلول‌های کریپت می‌گردد، همچنین تحریک فعالیت ترشح آنزیم‌های گوارشی توسط اسانس منجر به افزایش عمق کریپت می‌شود. گزارش شده است که ارتفاع پرز روده جوجه‌های تغذیه شده با مکمل اسیدآلی و گیاهان دارویی در مقایسه با گروه شاهد بالاتر بود. احتمال دارد که ترکیبات مؤثره موجود در اسانس باکتری‌های بیماریزا را در دیواره روده کوچک کاهش دهند و با کاهش تولید ترکیبات سمی توسط باکتری‌ها باعث تغییر در مورفولوژی دیواره روده جوجه‌های گوشتی شده و در نتیجه از تخریب و آسیب سلول‌های مخاطی دیواره روده جلوگیری نمایند (۱۰). بنابراین منطقی است که فرض کنیم که باکتری‌ها می‌توانند باعث تغییرات در ساختار مخاط روده کوچک در جوجه‌های گوشتی شوند.

سیستم ایمنی: در این تحقیق، غلظت تیترا نیوکاسل در تیمار  $300 \text{ mg/kg}$  و  $100 \text{ mg/kg}$  اسانس درمنه دشتی در مقایسه با سایر تیمارها بیشترین بود ( $p < 0/01$ ). همچنین از نظر وزن بورس و طحال اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ). Toghiani و همکاران در سال ۲۰۱۰، با بررسی اثر آویشن بر تیترا آنتی بادی نیوکاسل و آنفولانزا در ۲۴ روزگی و وزن اندام‌های لنی بورس و طحال در ۴۲ روزگی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای آزمایشی و تیمار شاهد مشاهده نکردند (۲۹). Lavinia و همکاران در سال ۲۰۰۹ بیان کردند که استفاده از اسانس‌های روغنی استخراجی از چند گیاه دارویی باعث افزایش سطح ایمنی در طیور می‌شود (۱۸). همچنین Fararh و همکاران در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند اسانس سیاه دانه سرشار از فلاونوئیدها است و موجب تقویت سیستم ایمنی در طیور می‌شود (۹). ترکیبات فعال گیاهان دارویی مانند پلی ساکاریدها، گلیکوپروتئینها و مشتقات اسید کافنیک و آکامیدها توانایی تعدیل و بهبود سیستم ایمنی را دارند (۲). پلی ساکاریدهای گیاهی باعث بهبود ترشح پادتن‌ها می‌شوند (۲۴). همچنین خیلی از این ترکیب‌ها فعالیت ماکروفاژها را تقویت می‌کنند (۱۱). Mitsch و همکاران در سال ۲۰۰۴، با بررسی ترکیبی از روغن‌های مؤثره آن که حاوی تیمول،





- tive ingredients. *Z Aerztl Fortbild.* 90: 111-115.
3. Caspary, W.F. (1992) Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *Am J Clin Nutr.* 55: 299-308.
  4. Cook, N.C., Samman, S. (1999) Flavonoids-chemistry metabolism, cardio protective effects and dietary sources. *J Nutr Biochem.* 7: 66-76.
  5. Dafwang, I. I., Cook, M.E., Sunde, M. L., Bird, H. R. (1985) Bursal, intestinal and spleen weights and antibody response of chicks fed subtherapeutic levels of dietary antibiotics. *Poult Sci.* 64: 634-639.
  6. Dong, X.F., Gao, W.W., Tong, J.M., Lia, H.Q., Sa, R.N., Zhang, Q. (2007) Effect of polysavone (*AlfaAlfa* Extract) on abdominal fat deposition and immunity in broiler chickens. *Poult Sci.* 86: 1955-1959.
  7. El-Habbak, M.M.E., Saleh, K., Arbid, M.S., Hagazi, A.G., Sofy, H. (1989) Influence of Garlic (*Allium sativum* L.) on some biological and biochemical changes in Japanese quails with special reference to its hypocholesterolemic activity. *Archive fur Geflugelkunde.* 53: 73-79.
  8. Engberg, R.M., Hedemann, M.S., Jensen, B.B., Lesser, T.D. (2000) Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poult Sci.* 79: 1311-1319.
  9. Fararh, K.M., Atoji, Y., Shimizu, Y., Shiina, T., Nikami, H., Takewaki, T. (2004) Mechanisms of the hypoglycaemic and immunopotentiating effects of *Nigella sativa* L. oil in streptozotocin-induced diabetic hamsters. *Res Vet Sci.* 77: 123-9.
  10. Gee, J.M., Lee-Finglas, W., Wortley, G.W., Johnson, J.T. (1996) Fermentable carbohydrate elevate plasma entrogucagon but high viscosity is also necessary to stimulate small bowell mucosal cell proliferation in rats. *J Nutr.* 105: 827-838.
  11. Goel, V., Chang, C., Slama, J.V., Barton, R., Bauer, R., Gahler, R., Basu, T.K. (2002) Alkyl-imides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats. *Int J Immunopharmacol.* 2:381-387.
  12. Goudarzi, M., Rahbari, S., Hadadzadeh, H., Yeganeh Parsat, M., Shafiyi, A., Pourmaydani, A. (2005) Study the effect of leaf and extract of *Artemisia annua* on coccidiosis in broiler chickens. *J Vet Res (University of Tehran).* 61: 339-344.
  13. Greathead, H. (2003) Plants and plant extracts for improving animal productivity. *Proc Nutr Soc.* 62: 279-290.
  14. Haq, A.U., Meraj, K.A., Rasool, S. (1999) Effect of supplementing *Allium sativum* (Garlic) and *Azadirachta indica* (Neem) leaves in broiler feeds on their blood cholesterol, triglycerides and antibody titre. *Int J Agric Biol.* 1: 125-127.
  15. Hashemi, S.R., Zulkifli, I., Davoodi, H., Zunita, Z., Ebrahimi, M. (2012) Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (*Euphorbia hirta*) and mix of acidifiers. *Anim Feed Sci Technol.* 178: 167-174.
  16. Iji, P.A., Saki, A.A., Tivey, D.R. (2001) Intestinal development and body growth of broiler chicks on diets supplemented with non-starch polysaccharides. *Anim Feed Sci Technol.* 89: 175-188.
  17. Khalaji, S., Zaghari, M., Hatami, K.H., Lotfi, L., Nazarian, H. (2011) Black Cumin Seeds, *Artemisia leaves (Artemisia Sieberi)*, and *Camellia* L. plant extract as phytogenic products in broiler diets and their effects on performance, blood constituents, immunity and cecal microbial population. *Poult Sci.* 90: 2500-2510.
  18. Lavinia, S., Dumitrescu, G., Drinceanu, D., Stef, D. (2009) The effect of medicinal plants and plant extracted oils on broiler duodenum morphology and immunological profile of broiler. *Rom Biotechnol Lett.* 9: 1906-1914.
  19. Lee, K.W., Everts, H., Beyen, A.C. (2003) Dietary carvacrol lowers body gain but improves feed conversion in female broiler chickens. *J Appl Poult Res.* 12: 394-399.
  20. Lopes-Lutz, D., Alviano, D.S., Alviano, C.S., Kolodziejczyk, P.P. (2008) Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry.* 69: 1732-1738.
  21. Lis-Balchin, M., Deans, S.G., Eaglesham, E. (1998) Relationship between bioactivity and chemical composition of commercial essential oils. *Flavour Fragr J.* 13: 98-104.



22. Mahboubi, M., Farzin, N. (2009) Antimicrobial activity of *Artemisia sieberi* essential oil from central Iran. Iran J Microbiol. 1: 43-48.
23. Mitsch, P., Zitter-Eglseer, K., Kohler, B., Gabler, C., Losa, R., Zimpernik, I. (2004) The effect of two different blends of essential oil components on the proliferation of *Clostridium perfringens* in the intestines of broiler chickens. J Poult Sci. 83: 669-675.
24. Nie, W., Zhang, Y.X. (1999) Progress of the immunomodulating effect of polysaccharides and their mechanism. Chin Pharmacol Bull. 15: 3-5.
25. Nikaido, H., Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol Rev. 49: 1-23.
26. Ouweh, A.C., Tiihonen, K., Kettunen, H., Peuranen, S., Schulze, H., Rautonen, N. (2010) In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. Vet Med. 55: 71-78.
27. Royo, P., Martin-Casabona, N., Martinez, E., Andonegui, M. (1999) In vitro susceptibility of *Mycobacterium Kansasii* to the difluorinated quinolone of spoufloxacin using a broth microdilution and macrodilution MIC system. Int J Tuberc Lung Dis. 3: 349-53.
28. Takahashi, K., Mashiko, T., Akiba, Y. (2000) Effects of dietary concentration of xylitol on growth in male broiler chicks during immunological stress. Poult Sci. 79: 743-747.
29. Toghyani, M., Tohidi, M., Gheisari, A.A., Taheidian, S.A. (2010) Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. Afr J Biotechnol. 9: 6819-6825.
30. Tiihonen, K., Kettunen, H., Bento, M.H.L., Saarinen, M., Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Schulze, H., Rautonena, N. (2010) The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. Br Poult Sci. 51: 381-392.
31. Viveros, A., Chamorro, S., Pizarro, M., Arija, I., Centeno, C., Brenes, A. (2011) Effects of dietary polyphenol-rich grape products on intestinal microflora and gut morphology in broiler chicks. Poult Sci. 90: 566-578.
32. Wang, X., Gibson, G.R. (1993) Effect of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J Appl Bacteriol. 75: 373-388.
33. Yousefi, J., Nasir-Ahmadi, A., Jasbi, A.R. (2005) Biological activity *Artemisia Haussknechtii* essential oil. Pajouhesh Sazandegi (In Persian). 29: 28-30.
34. Zhang, C.Y., Yam, K.L., Chikindas, M.L. (2004) Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. Int J Food Microbiol. 90: 15-22.



## Effects of different levels of *Artemisia sieberi* essential oil on intestinal morphology characteristics, microflora population and immune system in broiler chickens

Ghazanfari, Sh.<sup>1\*</sup>, Adib Moradi, M.<sup>2</sup>, Rahimi Niat, F.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal and Poultry Sciences, College of Aburayhan, University of Tehran, Pakdasht, Tehran-Iran

<sup>2</sup>Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran-Iran

(Received 27 January 2015, Accepted 18 April 2015)

### Abstract:

**BACKGROUND:** Essential oils as growth stimulant play an important role in improving intestinal microflora and morphological properties and immune system in broiler chickens. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to investigate the effects of *Artemisia sieberi* oil on intestinal morphology, secum microflora and immune system in broiler chickens. **METHODS:** Two hundred day-old broiler chickens (Ross 308) were allocated to 5 treatments, 4 replications with a completely randomized design during 42 days of age. Experimental treatments consisted of control (basal diet) or basal diets containing different levels of *Artemisia sieberi* oil (100, 200 and 300 mg/kg) and 600 mg/kg flavophospholipol antibiotic. On day 42 days of age, intestinal morphology and microflora population and immune system were evaluated by measuring the weight of bursa of fabricious and spleen and antibody production. **RESULTS:** The results indicated that the highest lactobacillus count and the lowest *Escherichia coli* count of the caecum was found by inclusion of 300 mg/kg *Artemisia sieberi* oil in the diet ( $p < 0.0001$ ). The antibiotic and *Artemisia sieberi* oil treatments showed higher villus height in the duodenum compared with control group ( $p < 0.01$ ). *Artemisia sieberi* oil and antibiotic supplementations significantly decreased epithelial thickness and goblet cell number of the small intestinal compared with control group ( $p < 0.05$ ). The dietary supplementation did not significantly affect the crypt depth and villus height to crypt depth ratio in small intestine. The level of 300 mg/kg *Artemisia sieberi* oil significantly increased antibody titration against Newcastle disease virus ( $p < 0.01$ ). **CONCLUSIONS:** Adding *Artemisia sieberi* oil at levels of 300 mg/kg to broiler chicken diets can improve gut microflora (as measured by changes in populations of *Escherichia coli* and *lactobacillus*).

**Keyword:** antibody titer, *Artemisia sieberi*, broiler chicken, lactobacillus, villus height

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Composition of basal diet at different growth periods in broiler chickens. (\*)Mineral mix supplied the following per kilogram of diet: Mn, 50 g; Zn, 50 g; Fe, 25 g; Cu, 5 g; I, 500 mg; Se, 100 mg. (\*\*\*)Vitamin mix supplied the following per kilogram of diet: vitamin A, 3500000 IU; D3, 1000000 IU; vitamin E, 9000 mg; vitamin B2, 7.5 mg; riboflavine, 3300 mg; niacin, 15000 mg; pantothenic acid, 5000 mg; menadion, 1000; pirodoxine, 150 mg; biotine, 500 mg; choline, 250000 mg.

**Table 2.** Effects of *Artemisia sieberi* essential oil on cecum microbial population in broiler chickens (42 days).<sup>(a,b,c)</sup> Means within a column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). (\*)SEM: standard error of means, cfu: Colony Forming Unit.

**Table 3.** Effects of *Artemisia sieberi* essential oil on small intestinal morphology in broilers chickens (42 days).<sup>(a,b,c)</sup> Means within a row with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). (\*)SEM: standard error of means.

**Table 4.** Effects of *Artemisia sieberi* essential oil on immune system in broilers chickens.<sup>(a,b,c)</sup> Means within a column with different superscripts are significantly different ( $p < 0.05$ ). (\*)SEM: standard error of means.

\*Corresponding author's email: shghazanfari@ut.ac.ir, Tel: 021-36040907, Fax: 021-36040907

