فصلنامه علمی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۶۱، دوره ۱۶، شماره ۱، زمستان۱۴۰۱، صفحه ۱۱۱ تا ۱۲۸
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

اثرات افزودن روغن‌های اسانسی (آویشن و پونه‌ی کوهی) و فیتاز میکروبی بر میکروفلور روده و سطح ایمنی (ایمنی هومورال (HI) و سلول‌های خونی) در جوجه‌های گوشتی

اسلام قلندری[۱]، علیرضا صفامهر[۲]، **علی نوبخت**[۳]، یوسف مهمان‌نواز[۴]،سامان مهدوی[۵]

۱- دانشجوی دکتری تغذیه دام، گروه علوم دامی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.
۲- استاد گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.
۳- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران. نویسنده مسئول: anobakht20@yahoo.com
۴- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.
۵- استادیار گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه، مراغه، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۱/۰۶/۰۹ **تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۷/۲۵**

چکیده

زمینه و هدف: با اینکه در تغذیه‌ی طیور از جمله جوجه‌های گوشتی از گیاهان دارویی به طرق مختلف استفاده شده است، اما استفاده‌ی همزمان از اسانس‌ها و آنزیم‌ها، بخصوص آنزیم فیتاز میکروبی کمتر استفاده شده است. آویشن و پونه گیاهی هستند که بر سیستم ایمنی موثر می‌باشند. اثرات مثبت فیتاز در طیور مستند شده است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثرات متقابل روغن‌های اسانسی و آنزیم فیتاز بر میکروفلور روده و سطح ایمنی جوجه‌های گوشتی می‌باشد.

مواد و روش ها: این آزمایش به بررسی میکروفلور روده و سطح ایمنی (ایمنی هومورال (تست HI) و سلول‌های خونی) با استفاده از سه سطح اسانس آویشن، اسانس پونه و فیتاز میکروبی با ۸ تیمار و ۴ تکرار و مجموعاً با ۳۲ واحد آزمایشی به مدت ۴۲ روز، روی جوجه‌های گوشتی انجام گرفت. برای بررسی میکروفلور روده و سطح ایمنی به ترتیب از روش‌های کشت (MRS-Agar و EMB) و روش الایزا و استفاده از کیت‌های تجاری زیست شیمی استفاده شد.

نتایج: بررسی اثرات اصلی، نشان داد تیمارهایی که اسانس آویشن مصرف کرده بودند، در مقایسه با سایر تیمارها جمعیت کلی‌فرم و کل باکتری‌های هوازی (TAB) کمتری داشتند ($p<۰/۰۵$). سطح ایمنی هومورال تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد ($p<۰/۰۵$). تیمارهایی که اسانس‌های آویشن و پونه را دریافت نکرده بودند، کمترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت‌ها را داشتند ($p<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد استفاده از آنزیم فیتاز میکروبی و اسانس آویشن، جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم روده را کاهش می‌دهد و استفاده از اسانس آویشن، باعث بهبود ایمنی هومورال می‌گردد.

کلمات کلیدی: اسانس، ایمنی، فیتاز میکروبی، میکروفلور روده، جوجه گوشتی

مقدمه

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 آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح وسیعی در واحدهای پرورش جوجه گوشتی استفاده می‌شد(۱). افزودنی‌های خوراک دام و طیور که از گیاهان مشتق می‌شوند شامل، مواد معطر و روغن‌های اسانسی از سال ۲۰۰۶، یعنی زمانی که قوانین اتحادیه‌ی اروپا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها را به عنوان مواد افزودنی در تغذیه‌ی طیور ممنوع کرد، عمومیت پیدا کردند(۲). روغن‌های اسانسی خصوصیات سودمند بالقوه‌ای را می‌توانند نشان دهند؛ که شامل: اثرات ضد ویروسی (۳)، ضد میکروبی(۴،۵،۶)آنتی‌اکسیدانی(۷،۸)، آنتی‌اکسی‌ژنیک(۹)، محرک گوارشی (۱۰،۱۱)و ضد انگلی[۱۲،۱۳]می‌باشند.

آویشن (*Tymus vulgaris* L.) یکی از گیاهان دارویی معطر بوده و متعلق به خانواده‌ی نعناعیان (*Lamiaceae*) است که به صورت بوته‌های پرپشت خود رو و وحشی در دامنه‌های خشک و بین تخته‌سنگ‌های نواحی مدیترانه، شمال افریقا و قسمت‌هایی از آسیا می‌روید. به علت داشتن خصوصیات ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد اسپاسم، خلط‌آور، گندزدا(۱۴)، اشتهاآور، ضدسرفه، ضدنفخ، و ضد کرم در طب سنتی مورد استفاده قرار می‌گیرد(۱۵). آویشن به صورت پودر در بعضی ادویه‌جات و ترشی‌ها بسیار رایج است، همچنین به طور مستقیم و یا همراه با دیگر گیاهان، به عنوان بو، مزه و ضد نفخ در صنایع غذایی مصرف زیادی دارد. در طب سنتی ایرانی-اسلامی، بیشتر به دلیل اثرات مسکن، ضد اسپاسم و ضد نفخ، از این گیاه استفاده می‌کنند(۱۶). تانن‌ها، ساپونین‌ها، گلیکوزیدها و اسانس‌ها مهم‌ترین اجزای تشکیل دهنده‌ی عصاره‌ی آویشن هستند. همچنین تیمول، کارواکرول، پاراسیمول، لینالول و سینئول اجزای اصلی تشکیل دهنده‌ی اسانس آویشن هستند(۱۷). اسانس آویشن با داشتن ترکیباتی نظیر کارواکرول و منتول، نه تنها دارای خاصیت ضد میکروبی بوده و با ضدعفونی کردن دستگاه گوارش، از تجزیه‌ی اسیدهای آمینه توسط میکروب‌های مضر ممانعت می‌کنند، بلکه با افزایش سطح و تعداد سلول‌های انگشتی روده، زمینه‌ی جذب بیشتر مواد مغذی را فراهم می‌کنند(۱۸).

پونه (*Mentha pulegium* L.) از گیاهان خانواده‌ی لابیتا است. این خانواده شامل ۲۰ گونه است که در سراسر دنیا پراکنده‌اند (۱۹). قسمت‌های هوایی گیاه پونه به صورت معمول به عنوان دارو در درمان سرماخوردگی، ورم سینوس‌ها، وبا، مسمومیت غذایی، آماس نایژه‌ها و نیز درمان سل استفاده شده است. این گیاه همچنین خلط آور، ضدنفخ، ادارآور، ضد سرفه و ضدقاعدگی می‌باشد(۲۰). خاصیت ضد میکروبی روغن و پودر گیاه دارویی پونه نیز مشخص شده است(۲۱). این گیاه علاوه بر دارا بودن خاصیّت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالا، دارای خواص ضد قارچی، تحریک کننده‌ی اشتهاء، افزایش دهنده‌ی قابلیّت هضم مواد مغذّی و خوراک مصرفی، بهبود دهنده‌ی وضعیت محیط دستگاه گوارش نیز می‌باشند(۲۲). عصاره این گیاه خاصیت ضد باکتریایی دارد و در کنترل انواع باکتری‌ها نقش دارد، علاوه بر این، عصاره این گیاه باعث خوش طعم شدن گوشت جوجه‌ها و نیز اثرات مثبتی بر عملکرد جوجه‌های گوشتی و مرغ‌های تخم‌گذار می‌گذارد(۱۹). مصرف مقادیر زیاد پونه (در جیره غذایی طیور، به ویژه در اوایل دوره رشد آنها)، از رشد و نمو میکروب‌ها و باکتری‌ها و در نتیجه مرگ و میر

جوجه‌ها جلوگیری می‌کند(۲۳). ممنوعیت استفاده از مکمل‌های پروتئینی حیوانی که منبع مناسب فسفر بوده است، روند پذیرش فیتازهای میکروبی را در برخی از کشورها تسریع کرد(۲۴). متداول‌ترین آنزیمی که به جیره‌ی طیور اضافه می‌شود، فیتاز است که برای افزایش هیدرولیز فیتات و آزاد شدن فسفر به کار می‌رود. فیتازها (میو اینوزیتول هگزاکیس فسفات فسفوهیدرولازها) زیر گروه فسفاتازها هستند که هیدرولیز اسید فیتیک به فسفات غیرآلی و مشتقات میواینوزیتول فسفات را کاتالیز می‌کنند(۲۵). اثرات مثبت فیتاز در طیور مستند شده است(۲۶). این استفاده از فیتاز نیاز به افزودن منابع گران‌قیمت فسفر غیرآلی به جیره را کاهش می‌دهد(۲۷). فراهمی ناچیز فسفر فیتاتی، هزینه‌ی تولید را افزایش می‌دهد، زیرا منابع اضافی فسفر قابل دسترس برای تهیه‌ی جیره‌های غذایی مورد نیاز است، تا احتیاجات طیور به فسفر تأمین گردد مشخص شده است که قابلیت دسترسی مواد معدنی، توسط اسید فیتیک غیرقابل‌هضم کاهش می‌یابد(۲۸). دستگاه گوارش طیور آنزیم فیتاز کافی برای هضم فیتات ندارد و بنابراین، مقدار زیادی فسفر از طریق فضولات دفع می‌شود (۲۹). این امر افزودن فسفر غیرآلی به جیره‌ی حیوانات تک‌معده‌ای را جهت تأمین احتیاجات تغذیه‌ای آنها ضروری می‌سازد. یکی از معضلات صنعت طیور در دنیای امروز عفونت‌های ناشی از باکتری‌های گرم منفی بیماری‌زای روده‌ای (Enteropathogenes) می‌باشد(۳۰). آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در گله‌های تولیدی موجب ایجاد مقاومت باکتریایی می‌شود، که برخی از این باکتری‌ها در دسته پاتوژن‌های انسانی هستند(۳۱). به علت محدودیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها و با توجه به ویژگی‌های اسانس‌های پونه و آویشن و اثرات مفید فیتاز میکروبی در کنترل عفونت‌ها و بهبود سیستم ایمنی و جمعیت میکروبی روده‌ی جوجه‌های گوشتی، به نظر می‌رسد که میان اسانس‌های آویشن و پونه و آنزیم فیتاز میکروبی اثر همکوشی وجود داشته باشد. توجه به منابع غذایی دام و طیور می‌تواند ضمن جلوگیری از بروز بیماری‌ها و مشکلات محیط‌زیستی و کاهش هزینه‌ها، باعث استفاده‌ی بهینه از منابع گیاهی و افزودنی‌های مجاز فیتاتی در صنعت پرورش طیور شود. همچنین با توجه به نتایج متناقض در استفاده از این منابع، ضروری است که اثرات متقابل بین اسانس گیاهان دارویی و فیتاز میکروبی و سایر اجزاء خوراک و افزودنی‌ها مورد بررسی قرار گیرند. در این پژوهش اثرات اسانس‌های روغنی مستخرج از گیاهان دارویی (آویشن و پونه‌ی کوهی) و فیتاز میکروبی بر میکروفلور روده و سطح ایمنی هومورال (HI) و سلول‌های خونی در جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه قرارگرفت.

مواد و روش‌ها

این آزمایش در فروردین ماه سال ۱۳۹۸ در مرغداری گوشتی مزرعه تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه (واقع در روستای گل تپه) به مدت ۴۲ روز انجام گرفت. در این مطالعه تعداد ۳۸۴ قطعه جوجه‌ی گوشتی یک‌روزه‌ی سویه‌ی تجاری راس – ۳۰۸، به صورت آزمایش فاکتوریل ۲×۲×۲ {دو سطح از آنزیم فیتاز میکروبی (صفر و ۵۰۰ واحد فعال آنزیم فیتاز میکروبی)؛ دو سطح روغن اسانسی آویشن (صفر و ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره) و دو سطح روغن اسانسی پونه (صفر و ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره)}، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و ۴ تکرار در هر تیمار، مجموعاً در ۳۲ واحد آزمایشی مورد بررسی قرار گرفت.

تیمارهای آزمایشی مورد استفاده در این طرح به صورت زیر بود:

تیمار ۱، شاهد (بدون استفاده از روغن اسانسی آویشن و پونه و فیتاز میکروبی)

تیمار ۲ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی آویشن)

تیمار ۳ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی پونه)

تیمار ۴ (استفاده از ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی)

تیمار ۵ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی آویشن + ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی پونه)

تیمار ۶ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی آویشن + ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی)

تیمار ۷ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی پونه + ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی)

تیمار ۸ (استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی آویشن + استفاده از ۲۰۰میلی‌گرم در کیلوگرم جیره از روغن اسانسی پونه + ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی)

جیره‌های آزمایشی بر اساس ذرت و کنجاله‌ی سویا با توجه به نیازمندی‌های مواد مغذی برای گروه‌های مختلف آزمایشی بر اساس توصیه‌های مواد مغذی NRC(۳۲). برای دوره‌های مختلف آغازین (۱۰-۱ روزگی)، رشد (۲۴ - ۱۱ روزگی) و پایانی (۴۲ - ۲۵ روزگی) با استفاده از نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA (User friendly feed formulation done again) تنظیم گردیدند (جدول ۱). روغن‌های اسانسی آویشن و پونه، پس از تهیه، ابتدا با روغن سویای مورد استفاده در جیره مخلوط شده و پس از آن، مخلوط همگن حاصل به جیره اضافه گردید. فیتاز میکروبی با نام تجاری Meri-Phyze 5000، تهیه گردید که هر گرم از Meri-Phyze 5000 حاوی حداقل ۵۰۰۰ واحد (FTU) از آنزیم فیتاز بود. یک FTU میزان آنزیمی است که ۱ میکرومول اورتوفسفات غیرآلی را در دقیقه از ۰/۰۰۵۱ مول در لیتر فیتات سدیم در pH برابر با ۵/۵ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد آزاد می‌سازد. عمده میکروارگانیسم تولید شده توسط این محصول، Aspergillus Niger می‌باشد که تا ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد در برابر حرارت مقاوم است. در طول دوره پرندگان به آب و خوراک دسترسی آزاد داشتند. برنامه‌ی روشنایی شامل ۲۴ ساعت روشنایی در سه روز اول و ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی در بقیه‌ی روزهای دوره‌ی آزمایش بود. دمای محیط سالن به تدریج از ۳۴ درجه‌ی سلسیوس در روز اول به ۲۴ درجه‌ی سلسیوس در روز ۲۸ رسید و سپس تابت ماند. همچنین میزان رطوبت سالن از بدو ورود جوجه‌ها تا ۱۵ روزگی به میزان ۶۰ تا ۷۰ درصد حفظ گردید و بعد از آن، رطوبت به طور نسبی کاهش یافت تا بستر خیس نشود. در طول دوره، جهت تهویه‌ی مناسب از هواکش‌های مناسب با سن جوجه‌ها و میزان گاز تولیدی در سالن استفاده شد.

میکروفلور روده

برای اندازه‌گیری میکروفلور روده، در سن ۴۲ روزگی دو پرنده از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و بعد از ۱۲ ساعت گرسنگی دادن، کشتار شدند. پس از ذبح و بازکردن حفره‌ی شکمی، ایلئوم از ناحیه‌ی زایده‌ی مکل و محل اتصال آن به سکوم‌ها و راست روده (Ileo-Ceca-Clonic Junction)، با قیچی استریل جدا گردید. سپس محتویات یک سوم انتهای ایلئوم به داخل قوطی‌های استریل تخلیه و

پس از بستن درب آن، بلافاصله فریز شد. در انجام کلیه‌ی این مراحل دقت شد تا از ورود آلودگی‌های ثانویه به نمونه‌های اخذ شده جلوگیری شود. از این نمونه‌ها برای انجام آزمایش‌های میکروبی استفاده گردید. شمارش باکتری‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت (MRS-Agar) و شمارش اشرشیاکلی در محیط کشت EMB (Eosin methylene-blue) انجام گردید. پس از تهیه و آماده‌سازی نمونه از محتویات ایلئوم، رقت‌های متوالی (از 10^{-1} تا 10^{-6}) تهیه شد. سپس به منظور شمارش کل باکتری‌های موردنظر، عمل کشت در محیط‌های کشت اختصاصی صورت پذیرفت. تعداد کل باکتری‌های موجود در هر رقت تهیه شده از محتویات ایلئوم شمارش شده و میانگین آنها به عنوان تعداد کل باکتری در واحد گرم محتویات گوارشی برای هر تکرار از تیمار مربوط محاسبه گردید(۳۳).

آزمایش ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI)

آزمایش‌های سرمی (سرولوژیک) در طیور به طور کلی به منظور تشخیص بیماری‌ها، بررسی میزان موفقیت واکسیناسیون و اهداف غربالگری به کار می‌روند. برخی از این آزمون‌ها به علت هزینه‌ی بالا و دشواری در اجرای آن اغلب کاربرد تحقیقاتی داشته و در مؤسسات پژوهشی-آموزشی استفاده می‌شوند و برخی دیگر به علت سهولت اجرا و هزینه‌های به نسبت کمتر، علاوه بر مراکز تحقیقاتی، در اکثر آزمایشگاه‌های تشخیصی به کار گرفته می‌شوند در این رابطه می‌توان به آزمایش‌های ممانعت از هماگلوتیناسیون (Heamagglutination Inhibition=HI)، آگلوتیناسیون سرم روی پلت (Pellet Serum Agglutination) و آزمون الایزا (ELISA) اشاره کرد. آزمایشHI، جهت ارزیابی پاسخ سرمی سیستم ایمنی پرنده به برخی از عفونت‌ها که عامل آن توانایی آگلوتینه کردن گلبول‌های قرمز را دارد، استفاده می‌شود. اساس این آزمایش‌ها شناسایی و سنجش کیفی و کمی آنتی‌بادی ایجاد شده علیه یک عامل عفونت‌زای مشخص نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها، قارچ‌ها و حتی انگل‌ها می‌باشد. برای تحریک سیستم ایمنی به منظور سنتز آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ویروس نیوکاسل برای ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف بر ایمنی هومورال پرندگان، تمام جوجه‌های مورد آزمایش در روزهای یازدهم و سی و سوم با استفاده از واکسن زنده‌ی نیوکاسل (لاسوتا) واکسینه شدند. جهت تعیین سیستم ایمنی هومورال دو هفته بعد از اولین تزریق واکسن زنده به پرندگان، تست HI1 صورت گرفت (از هر تکرار دو پرنده مشخص و علامت‌گذاری می‌شود). یک هفته بعد از اولین نمونه‌گیری، مجدداً تست HI2 بر روی همان پرندگان مشخص شده در تست قبلی صورت گرفت. آزمایش HI برای تعیین تیتر آنتی‌بادی بیماری نیوکاسل به این شرح انجام شد. در این روش ابتدا ۲۵ میکرولیتر سرم فیزیولوژی به تمام خانه‌های پلت اضافه شد و سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه سرم به خانه‌های ردیف اول اضافه شد؛ بعد از این مرحله ۲۵ میکرولیتر از خانه‌های ردیف اول برداشته به خانه‌های ردیف دوم اضافه شد به ترتیب این عمل تا خانه‌های ردیف آخر تکرار شد. بعد از اتمام این عمل، ۲۵ میکرولیتر آنتی‌ژن رقیق شده به خانه‌ها اضافه و ۳۰ دقیقه زمان داده شد؛ سپس ۲۵ میکرولیتر از گلبول‌های قرمز خون (یک درصد رقیق شده) که با سرم فیزیولوژی در بالن به حجم رسیده بود، به خانه‌های کیت اضافه شد و بعد از ۳۰ دقیقه واکنش کامل شد. آخرین خانه‌ای که در آن آگلوتیناسیون مشاهده شد، تیتر آنتی‌بادی است و شماره آن خانه ثبت شد(۳۴).

تعیین سلول‌های ایمنی خون

هتروفیل‌ها سلول‌های فاگوسیت هستند که برای مقابله با عوامل عفونت‌زایی نظیر ویروس‌ها، باکتری‌ها و نیز ذرات خارجی شکل گرفته‌اند و به میزان زیادی در محل‌های آسیب دیده در اثر تولید مواد شیمیایی جاذب، حضور می‌یابند. عمده‌ترین عمل هتروفیل‌ها به دام انداختن و از بین بردن ذرات بیگانه بوسیله عمل فاگوسیتوز می‌باشد و افزایش تعداد آنها شاخص مهمی جهت مشخص نمودن وجود عوامل میکروبی و بیماری‌زا در بدن می‌باشد. نسبت هتروفیل‌ها به لنفوسیت‌ها شاخص مهمی در ارزیابی سطح ایمنی بدن می‌باشد و هر چقدر این نسبت بیشتر باشد، به همین مقدار نیز سطح ایمنی بدن کمتر بوده و احتمال مقاومت در مقابل عوامل بیماری‌زا کاهش می‌یابد(۳۵). جهت شمارش سلول‌های ایمنی خونی شامل هتروفیل، لنفوسیت و نسبت هتروفیل به لنفوسیت از ورید بالی، ۲ میلی‌لیتر خون با استفاده از سرنگ‌هایی که پیشتر به هپارین آغشته بودند، گرفته شد. از خون حاصله برای تهیه‌ی سرم با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پس از تهیه گسترش از نمونه‌ها، شمارش تعداد لنفوسیت و هتروفیل با استفاده از میکروسکوپ و در پی رنگ‌آمیزی گیسما – رایت انجام گردید(۳۳).

جدول ۱- اجزای تشکیل دهنده و ترکیب شیمیایی جیره‌های غذایی آزمایشی

اجزای جیره (٪)	دوره‌ی آغازین (۱ الی ۱۰ روزه‌گی)	دوره‌ی رشد (۱۱ الی ۲۴ روزه‌گی)	دوره پایانی (۲۵ الی ۴۲ روزه‌گی)
ذرت	۴۷/۷۵	۵۴/۹۳	۵۶/۷۵
کنجاله سویا	۴۴/۵۰	۳۷/۹۰	۳۶/۷۱
روغن سویا	۳/۲۶	۳/۳۹	۳/۰۵
پودر استخوان	۲/۲۶	۲/۱۸	۱/۸۷
پودر صدف	۰/۲۹	۰/۲۹	۰/۳۳
نمک طعام	۰/۴۶	۰/۴۷	۰/۴۲
مکمل ویتامینی*	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
مکمل معدنی*	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
دی ال- متیونین	۰/۳۷	۰/۳۴	۰/۳۸
انرژی قابل سوخت و ساز (کیلوکالری/ کیلوگرم)	۳۰۰۰	۳۰۰۰	۳۰۰۰
پروتئین خام (٪)	۲۱/۸۰	۲۰/۹۵	۲۰/۶۴
کلسیم (٪)	۱/۰۵	۰/۸۸	۰/۸۰
فسفر قابل استفاده (٪)	۰/۵۰	۰/۴۳	۰/۳۹
سدیم (٪)	۰/۳۲	۰/۲۱	۰/۱۹
لیزین (٪)	۱/۶۷	۱/۲۶	۱/۲۳
متیونین + سیستئین (٪)	۱/۱۸	۰/۹۹	۰/۸۵
ترپیتوفان (٪)	۰/۳۵	۰/۲۸	۰/۲۸

* در هر ۲/۵ کیلوگرم از مکمل ویتامینی شرکت داروسازان: ۹۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۸۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۱۷۵۰ میلی‌گرم ویتامین B_1، ۶۶۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_2، ۹۸۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_3، ۲۹۶۵۰ میلی‌گرم ویتامین B_5، ۲۹۴۰ میلی‌گرم ویتامین B_6، ۱۰۰۰ میلی‌گرم ویتامین B_9، ۱۵ میلی‌گرم ویتامین B_{12}، ۱۰۰ میلی‌گرم ویتامین بیوتین، ۲۵۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید و ۱۰۰۰ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان وجود داشت.
در هر ۲/۵ کیلوگرم از مکمل‌معدنی شرکت داروسازان: ۹۹۲۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۸۴۷۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰۰۰۰ میلی‌گرم مس، ۹۹۰ میلی‌گرم ید، ۲۰۰ میلی‌گرم سلنیوم و ۲۵۰۰۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید وجود داشت.

تحلیل آماری داده‌ها:

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از رویه‌ی GLM نرم‌افزار SAS (۹/۲) تجزیه و تحلیل و میانگین‌ها با روش توکی در سطح (P≤ ۰/۰۵) مقایسه شدند(۳۶).

مدل آماری طرح به صورت زیر بود:

$$Yijkl=\mu+Ai + Bj +Ck + ABij + ACik + BCjk + ABCijk + \varepsilon ijkl$$

Yijkl= مقدار اندازه‌گیری شده برای هر پرنده، μ= میانگین جامعه، Ai= اثر روغن ضروری آویشن، Bj= اثر روغن ضروری پونه، Ck= اثر فیتاز میکروبی، ABij= اثر متقابل روغن ضروری آویشن و پونه، ACik= اثر متقابل روغن ضروری آویشن و فیتاز میکروبی، BCjk= اثر متقابل روغن ضروری پونه و فیتاز میکروبی، ABCijk= اثر متقابل روغن ضروری آویشن، پونه و فیتاز میکروبی، Eijkl = خطای آزمایشی.

نتایج

میکروفلور روده

با توجه به نتایج نشان داده شده در جدول۲، بررسی اثرات اصلی، نشان داد تیمارهایی که اسانس آویشن مصرف کرده بودند، در مقایسه با سایر تیمارها جمعیت کلی‌فرم و کل باکتری‌های هوازی (TAB) کمتری داشتند (P<۰/۰۵). تیمارهایی که اسانس پونه دریافت کرده بودند نیز در مقایسه با سایر تیمارها کلی‌فرم کمتری داشتند (P<۰/۰۵). مصرف آنزیم فیتاز میکروبی به تنهایی سبب کاهش تعداد کلی‌فرم‌ها در مقایسه با سایر تیمارها شد (P<۰/۰۵).

ایمنی هومورال (تست HI)

سطح ایمنی هومورال در اولین مرحله نمونه‌برداری (HI1) و دومین مرحله نمونه‌برداری (HI2) تفاوت معنی‌داری در بین گروه‌های مختلف آزمایشی نشان داد (p<۰/۰۵). تیمارهایی که آویشن دریافت کرده بودند در روزهای ۲۵ و ۳۲ در مقایسه با سایر گروه‌ها عیار آنتی‌بادی بیشتری داشتند (p<۰/۰۵). در بررسی اثرات اصلی مربوط به تست HI، در سطح استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از اسانس آویشن، عیار آنتی‌بادی در روز ۲۵ (۱/۵۶) و در روز ۳۲ (۴/۱۲) بوده است. در اثرات متقابل دو طرفه، استفاده همزمان از آویشن و پونه، سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس آویشن و صفر درصد پونه، روز ۲۵ بیشترین عیار آنتی‌بادی (۲/۱۸) مربوط به آویشن بوده است. در بررسی اثرات متقابل دوطرفه استفاده همزمان از آویشن و فیتاز میکروبی، بیشترین عیار آنتی بادی مربوط به آویشن در سطح ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم و سطح صفر درصد فیتاز میکروبی در روز ۳۲ بوده است (۴/۳۱).

ایمنی سلول‌های خونی

در بررسی سطح ایمنی سلول‌های خونی، تیمارهایی که اسانس‌های آویشن و پونه را دریافت نکرده بودند، کمترین نسبت هتروفیل به لنفوسیت‌ها را داشتند. مصرف اسانس آویشن بدون اسانس پونه، یا اسانس پونه بدون آویشن سبب افزایش نسبت هتروفیل‌ها و لنفوسیت‌ها شد (p<۰/۰۵). مصرف آنزیم فیتاز، بدون اسانس آویشن نیز سبب افزایش نسبت هتروفیل‌ها به لنفوسیت‌ها شد (p<۰/۰۵). کمترین نسبت هتروفیل به لنفوست در اثرات متقابل سه طرفه که از هر سه ماده آزمایشی در این تیمار استفاده شده بود مشاهده شد (۰/۹۶)، هر چند تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها

نداشت. در بررسی کلی وضعیت ایمنی سلول‌های خونی، کمترین میزان لنفوسیت در اثرات متقابل دو طرفه و استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از اسانس پونه مشاهده شد (۴۱/۵۰). بیشترین میزان لنفوست در اثرات متقابل سه طرفه که از هر سه ماده آزمایشی در این تیمار استفاده شده بود مشاهده شد (۵۰/۷۵). بیشترین میزان هتروفیل نیز در اثرات متقابل سه طرفه مشاهده گردید، که تیمار حاوی ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اسانس پونه، صفر درصد آویشن و ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی بود (۵۹/۵۰). کمترین میزان هتروفیل هم در اثرات متقابل سه طرفه که از هر سه ماده آزمایشی در این تیمار استفاده شده بود، مشاهده شد(۴۸/۷۵).

جدول ۲- اثرات افزودن روغن‌های اسانسی (آویشن و پونه‌ی کوهی) و آنزیم فیتاز میکروبی بر میکروفلور روده‌ی جوجه‌های گوشتی (log cfu/g digesta)

اثرات	باکتری‌های لاکتوباسیلوس*	کلی فرم	کل باکتری‌های هوازی
آویشن			
۰	۵/۶۸	۸/۷۴^{a}	۹/۸۵^{a}
۲۰۰	۵/۱۵	۷/۶۲^{b}	۸/۷۰^{b}
SEM	۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۳۵
p-value	۰/۳	۰/۰۲	۰/۰۳
پونه			
۰	۵/۵۶	۸/۶۲^{a}	۹/۵۱
۲۰۰	۵/۲۶	۷/۷۴^{b}	۹/۰۴
SEM	۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۳۵
p-value	۰/۵۵	۰/۰۰۴	۰/۳۵
آنزیم فیتاز میکروبی			
۰	۵/۵۷	۸/۰۷	۸/۱
۵۰۰	۵/۲۶	۸/۳	۹/۵
SEM	۰/۳۵	۰/۳۱	۰/۳۵
p-value	۰/۵۵	۰/۶۲	۰/۲۷
آویشن × پونه			
۰ ۰	۵/۸۴	۹/۴۵^{a}	۹/۹۴
۰ ۲۰۰	۵/۵۱	۸/۰۳^{b}	۹/۷۶
۲۰۰ ۰	۵/۲۸	۷/۷۹^{b}	۹/۰۷
۲۰۰ ۲۰۰	۵/۰۲	۷/۴۵^{b}	۸/۳۲
SEM	۰/۵	۰/۴۵	۰/۴۹
p-value	۰/۹۴	۰/۰۴	۰/۵۲
آویشن × فیتاز میکروبی			
۰ ۰	۵/۷	۸/۹۷^{a}	۹/۴
۰ ۵۰۰	۵/۶۵	۸/۵^{a}	۱۰/۳
۲۰۰ ۰	۵/۴۳	۷/۱۶^{b}	۸/۶
۲۰۰ ۵۰۰	۴/۸۷	۸/۰۸^{ab}	۸/۸
SEM	۰/۵	۰/۴۵	۰/۴۹
p-value	۰/۶۱	۰/۰۲	۰/۴۹

پونه × فیتاز میکروبی				
۰	۰		۵/۴۹	۸/۷۵	۹/۴۶
۰	۵۰۰		۵/۶۳	۸/۴۹	۹/۵۵
۲۰۰	۰		۵/۶۴	۷/۳۹	۸/۵۳
۲۰۰	۵۰۰		۵/۸۹	۸/۱۰	۹/۵۵
SEM			۰/۵	۰/۴۵	۰/۴۹
p-value			۰/۳۸	۰/۲۹	۰/۳۵
آویشن	پونه	فیتاز میکروبی			
۰	۰	۰	۵/۶۱	۹/۶۲^{a}	۹/۷
۲۰۰	۰	۰	۵/۳۸	۷/۸۷^{ab}	۹/۲۲
۰	۲۰۰	۰	۵/۷۹	۸/۳۳^{ab}	۹/۱
۰	۰	۵۰۰	۶/۰۸	۹/۲۷^{bc}	۱۰/۴۱
۲۰۰	۲۰۰	۰	۵/۴۸	۶/۴۶^{abc}	۷/۹۶
۲۰۰	۰	۵۰۰	۵/۱۹	۷/۷۱^{bc}	۸/۹۲
۰	۲۰۰	۵۰۰	۵/۲۲	۷/۷۴^{c}	۱۰/۴۱
۲۰۰	۲۰۰	۵۰۰	۴/۵۶	۸/۴۵^{ab}	۸/۶۹
SEM			۰/۷۰	۰/۶۳	۰/۷
p-value			۰/۸۷	۰/۰۴	۰/۹۲

***میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی‌داری باهم دارند (P<۰/۰۵).**

بحث و نتیجه گیری

میکروفلور روده

در این پژوهش تیمارهای اثرات اصلی که حاوی آویشن و پونه به تنهایی بودند به همراه تیمارهای که در بررسی اثرات متقابل دو طرفه، حاوی آویشن و پونه بودند، باعث کاهش کلی‌فرم‌ها شدند (p<۰/۰۵). پژوهش‌های پیشین نشان داده است که مصرف اسانس آویشن به ترتیب به صورت آشامیدنی و اسانس می‌تواند منجر به کاهش تعداد کل باکتری‌های روده، کاهش *کلی‌فرم‌ها* و افزایش *لاکتوباسیلوس‌ها* شود(۳۷،۱). همچنین مصرف آنزیم فیتاز نیز می‌تواند سبب کاهش تعداد *کلی‌فرم‌ها* شود(۳۸). فلور میکروبی در بهینه کردن استفاده از مواد مغذی، القای پاسخ ایمنی و پیشبرد توسعه‌ی سلول‌ها و مخاط روده نقش مهمی دارند(۳۹). *لاکتوباسیل‌ها* تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت، اما بیشترین میزان *لاکتوباسیل‌ها* در بررسی اثرات متقابل دو طرفه و تیماری که از ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم اسانس پونه و ۵۰۰ واحد فیتاز میکروبی استفاده شده بود، مشاهده گردید (۵/۸۹). لاکتوباسیل‌ها مواد باکتریواستاتیک شبیه باکتریوسین و اسیدهایی از قبیل اسید لاکتیک تولید می‌کنند که می‌توانند pH دستگاه گوارش را کاهش دهند(۴۰). آنها همچنین از طریق رقابت و آنتاگونیسم سبب جلوگیری از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا شده، فلور روده را تنظیم می‌کنند(۴۱). از سوی دیگر، *E.coli* می‌تواند سبب ایجاد بیماری در جوجه‌های گوشتی شود(۴۰). استفاده از اسانس آشامیدنی آویشن می‌تواند در کنترل جمعیت میکروبی روده و تغییر مطلوب این جمعیت به سمت باکتری‌های مفید از جمله باکتری‌های گونه‌ی لاکتوباسیل مؤثر بوده و نقش مثبت ایفا نماید(۴۲).

جدول ۳- اثرات افزودن روغن‌های اسانسی (آویشن و پونه‌ی کوهی) و آنزیم فیتاز میکروبی بروضعیت ایمنی هومورال (HI) جوجه‌های گوشتی

اثرات			ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI1) (روز ۲۵)	ممانعت از هماگلوتیناسیون (HI2) (روز ۳۲)
آویشن				
۰			۰/۸۴^{b}	۳/۵۳^{b}
۲۰۰			۱/۵۶^{a}	۴/۱۲^{a}
SEM			۰/۲۳	۰/۱۵
p-value			۰/۰۳	۰/۰۰۷
پونه				
۰			۱/۰۶	۳/۸۷
۲۰۰			۱/۳۴	۳/۷۸
SEM			۰/۲۳	۰/۱۵
p-value			۰/۴	۰/۶۶
آنزیم فیتاز میکروبی				
۰			۱/۴۶	۳/۷۸
۵۰۰			۰/۹۳	۳/۸۷
SEM			۰/۲۳	۰/۱۵
p-value			۰/۱۱	۰/۶۶
آویشن × پونه				
۰	۰		۱/۱۸^{ab}	۳/۷۵
۰	۲۰۰		۰/۵^{b}	۳/۳۱
۲۰۰	۰		۰/۹۳^{ab}	۴
۲۰۰	۲۰۰		۲/۱۸^{a}	۴/۲۵
SEM			۰/۳۳	۰/۲۱
p-value			۰/۰۰۵	۰/۱۱
آویشن × آنزیم فیتاز میکروبی				
۰	۰		۱/۰۶	۳/۲۵^{b}
۰	۵۰۰		۰/۶۲	۳/۸۱^{ab}
۲۰۰	۰		۱/۸۷	۴/۳۱^{a}
۲۰۰	۵۰۰		۱/۲۵	۳/۹۳^{ab}
SEM			۰/۳۳	۰/۲۱
p-value			۰/۷۸	۰/۰۳
پونه × آنزیم فیتاز میکروبی				
۰	۰		۱/۳۱	۳/۶۲
۰	۵۰۰		۰/۸۱	۴/۱۲
۲۰۰	۰		۱/۶۲	۳/۹۳
۲۰۰	۵۰۰		۱/۰۶	۳/۶۲
SEM			۰/۳۳	۰/۲۱
p-value			۰/۹۲	۰/۰۶
آویشن	پونه	آنزیم فیتاز میکروبی		
۰	۰	۰	۱/۵	۳/۳۷
۲۰۰	۰	۰	۰/۸۷	۴/۱۲
۰	۲۰۰	۰	۰/۶۲	۳/۱۲
۰	۰	۵۰۰	۰/۳۷	۳/۵
۲۰۰	۲۰۰	۰	۱/۱۲	۳/۸۷
۲۰۰	۰	۵۰۰	۰/۷۵	۴/۱۲
۰	۲۰۰	۵۰۰	۲/۶۲	۴/۷۵
۲۰۰	۲۰۰	۵۰۰	۱/۷۵	۳/۷۵
SEM			۰/۴۷	۰/۳۰
p-value			۰/۵۱	۰/۳۱

*میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی‌داری باهم دارند (P<۰/۰۵).

جدول ٤- اثرات افزودن روغن‌های اسانسی (آویشن و پونه‌ی کوهی) و آنزیم فیتاز میکروبی بر وضعیت سلول‌های خونی جوجه‌های گوشتی

اثرات			٪ هتروفیل	٪ لنفوسیت	هتروفیل / لنفوسیت
آویشن					
۰			۵۳	۴۵/۹۳	۱/۱۸
۲۰۰			۵۲/۵۶	۴۶/۴۳	۱/۱۷
SEM			۰/۹۸	۰/۹۶	۰/۰۴
p-value			۰/۷۵	۰/۷۱	۰/۸۰
پونه					
۰			۵۲/۳۷	۴۶/۷۵	۱/۱۵
۲۰۰			۵۳/۱۸	۴۵/۶۲	۱/۱۹
SEM			۰/۹۸	۰/۹۶	۰/۰۴
p-value			۰/۵۶	۰/۴۱	۰/۵۴
آنزیم فیتاز میکروبی					
۰			۵۳/۱۸	۴۵/۸۱	۱/۱۹
۵۰۰			۵۲/۱۳	۴۶/۵۶	۱/۱۵
SEM			۰/۹۸	۰/۹۶	۰/۰۴
p-value			۰/۵۶	۰/۵۸	۰/۵۷
آویشن × پونه					
۰	۰		۵۰/۸۷^{b}	۴۸/۱۲^{a}	۱/۰۷۸۷^{b}
۰	۲۰۰		۵۵/۱۲^{a}	۴۱/۵۰^{b}	۱/۲۸۵۰^{a}
۲۰۰	۰		۵۳/۸۷^{a}	۴۲^{b}	۱/۲۳۰۰^{a}
۲۰۰	۲۰۰		۵۱/۲۵^{b}	۴۷/۶۲^{a}	۱/۱۰۲۵^{b}
SEM			۱/۳۹	۱/۳۶	۰/۰۶۴
p-value			۰/۰۱۶	۰/۰۱۳	۰/۰۱۰۸
آویشن × آنزیم فیتاز میکروبی					
۰	۰		۵۱/۶۲^{ab}	۴۷/۷۵^{ab}	۱/۱۰^{b}
۰	۵۰۰		۵۴/۳۷^{a}	۴۴/۱۲^{b}	۱/۲۶^{a}
۲۰۰	۰		۵۴/۷۵^{a}	۴۳/۸۷^{b}	۱/۲۸^{a}
۲۰۰	۵۰۰		۵۰/۳۷^{b}	۴۹^{a}	۱/۰۵^{b}
SEM			۱/۳۹	۱/۳۶	۰/۰۶۴
p-value			۰/۰۱۳	۰/۰۰۲	۰/۰۰۲۷
پونه × آنزیم فیتاز میکروبی					
۰	۰		۵۲/۶۲	۴۶/۷۵	۱/۱۵
۰	۵۰۰		۵۲/۱۲	۴۶/۷۵	۱/۱۵
۲۰۰	۰		۵۳/۷۵	۴۴/۸۷	۱/۲۲
۲۰۰	۵۰۰		۵۲/۶۲	۴۶/۳۷	۱/۱۶
SEM			۱/۳۹۵	۱/۳۶	۰/۰۶۴
p-value			۰/۸۲۳۶	۰/۵۸	۰/۶۵
آویشن	پونه	آنزیم فیتاز میکروبی			
۰	۰	۰	۴۹/۵۰	۵۰/۲۵	۰/۹۹
۲۰۰	۰	۰	۵۵/۷۵	۴۳/۲۵	۱/۳۲
۰	۲۰۰	۰	۵۳/۷۵	۴۵/۲۵	۱/۲۱
۰	۰	۵۰۰	۵۲/۲۵	۴۶/۲۵	۱/۱۶
۲۰۰	۲۰۰	۰	۵۳/۷۵	۴۴/۵۰	۱/۲۴
۲۰۰	۰	۵۰۰	۵۲	۴۷/۲۵	۱/۱۳
۰	۲۰۰	۵۰۰	۵۶/۵۰	۴۲/۰۰	۱/۳۶
۲۰۰	۲۰۰	۵۰۰	۴۸/۷۵	۵۰/۷۵	۰/۹۶
SEM			۱/۹۷	۲/۹۵	۰/۱۳
p-value			۰/۸۲	۰/۷۸	۰/۷۶

***میانگین‌های با حروف لاتین متفاوت در هر ستون، اختلاف معنی‌داری باهم دارند (P<۰/۰۵).**

غضنفری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نشان دادند؛ تیماری که از اسانس درمنه‌ی دشتی در سطح mg/Kg ۳۰۰ استفاده شده بود، بیشترین جمعیت *لاکتوباسیل* و کمترین جمعیت *اشیرشیاکلی* را در بین تیمارهای آزمایشی داشت(۴۳). این یافته‌ها با نتایج Tiihonen در سال ۲۰۱۰(۴۴). که بیان داشتند، روغن‌های اسانسی باعث بهبود و تثبیت میکروفلورای سکوم به ویژه، افزایش *لاکتوسیلوس* در ۴۲ روزگی می‌شود، مطابقت داشت. *لاکتوباسیل‌ها* به همراه *بیفیدوباکترها* با تولید اسید استیک و اسید لاکتیک و همچنین کاهش pH، می‌توانند مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا شوند. *لاکتوباسیل‌ها* قادرند از دو طریق سیستم ایمنی را تقویت و تحریک نمایند، این میکروارگانیسم‌ها در طول دیواره‌ی روده تکثیر و توسعه پیدا می‌کنند و یا این که با کمک آنتی‌ژن‌های آزاد شده، میکروارگانیسم‌های مرده را جذب و مستقیماً ایمنی راتحریک می‌نمایند(۴۵). از جمله معایب وجود میکروب‌های مضر در دستگاه گوارش، افزایش تجزیه‌ی پروتئین و اسیدهای آمینه‌ی مواد هضمی، فعالیت دی‌آمیناسیونی پروتئین و اسیدهای آمینه‌ی مصرفی و نیز افزایش سرعت تجزیه‌ی آن‌ها در اثر ترشح موادی از قبیل آنزیم اوره‌آز توسط میکروب‌ها می‌باشد و با توجه به اینکه، کاربرد گیاهان دارویی سبب کاهش جمعیت میکروبی مضر دستگاه گوارش می‌شود، لذا سرعت تجزیه‌ی پروتئین و اسیدهای آمینه‌ی مواد گوارشی کاهش یافته و مقادیر بیشتری از آنها جذب و در بدن ذخیره می‌شود و منجر به بهبود بازده لاشه و به دنبال آن باعث کاهش تبدیل پروتئین به چربی گردیده و مقادیر کمتری چربی نیز می‌تواند در بدن تجمع یابد[۴۶].

طبق نتایج جدول ۲، استفاده از ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم از اسانس آویشن، باعث کاهش کل باکتری‌های هوازی شده است ($p<۰/۰۵$). در گزارشی استفاده از اسانس آویشن و سیر باعث کاهش کل باکتری‌های هوازی و جمعیت اشریشیاکلای شد(۴۷). افزودن اسانس آویشن به آب آشامیدنی جوجه‌های گوشتی، موجب کاهش جمعیت اشریشیاکلای و کل باکتری‌های هوازی شد(۳۷). از طرفی استفاده از عصاره سیر، آویشن و مخلوطی از هر دو آنها تأثیری بر جمعیت اشریشیاکلای و کل باکتری‌های هوازی نداشتند(۴۸). مواد افزودنی گیاهی تأثیر عمیقی بر جمعیت میکروبی روده پرندگان دارند .تانن‌ها و ترکیبات مؤثره موجود در گیاهان دارویی می‌توانند موجب تغییر در جمعیت میکروفلور روده شده و قارچ‌ها و باکتری‌هایی را که باعث افزایش اتلاف با منشأ بدنی و صدمه به دستگاه گوارش می‌شوند، را کاهش دهند و رشد باکتری‌های مفید را تحریک کنند(۴۹). تیمول و کارواکرول از جمله ترکیبات فنلی مؤثره اصلی تشکیل دهنده گیاه آویشن می‌باشند که دارای اثرات ضد باکتریایی هستند و اثر سینرژیستی با یکدیگر دارند. گزارش شده که ترکیبات مؤثره موجود در گیاهان دارویی اثرات هم‌کوشی دارند و به همین دلیل، در بسیاری از موارد مخلوط چند گیاه مورد استفاده قرار می گیرد(۵۰). عمل احتمالی مواد فعال در ترکیبات گیاهی ممکن است به گونه‌ای باشد که با نفوذ به ساختمان غشای باکتری‌های بیماری‌زا، سبب تغییر انتقال یون هیدروژن و پتاسیم در پروتئین ناقل غشا شده و با اختلال در واکنش های آنزیمی ATP سنتتاز، منجر به مرگ سلول شوند(۵۱).

ایمنی هومورال (تست HI)

نتایج حاصله نشان می‌دهد که مصرف اسانس آویشن سبب افزایش ایمنی هومورال شد ($P>۰/۰۵$). در ارتباط با افزودن اسانس آویشن، مطالعات نشان دادند که افزودن اجزای فعال

اسانس آویشن همانند تیمول و کارواکرول پاسخ ایمنی هومورال را در جوجه های گوشتی بهبود بخشید(۵۲). همسو با نتایج این مطالعه است. پژوهش‌گران بر این باور هستند که فلاونوئیدها و دیگر اجزای فنولی به بهبود سیستم ایمنی از طریق فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمک می‌کنند(۱۰). مکانیسم عمل محصولات گیاهان دارویی بخوبی مشخص نشده است، ولی پیشنهاد شده که آنها نفوذپذیری غشاهای سلولی را تغییر می‌دهند و باعث نابودی باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند(۵۱). سیستم ایمنی عموماً از گیاهان دارویی و ادویه‌جات غنی از کاروتنوئیدها، ویتامین C و فلاوونوئیدها بهره‌مند می‌شود(۵۳). هرچند گزارش شده است که استفاده از اسانس آویشن، تاثیری بر ایمنی هومورال ندارد، که با نتایج حال حاضر این پژوهش همخوانی ندارد(۵۴،۱).

ایمنی سلول‌های خونی

با توجه به نتایج، استفاده از اسانس‌های پونه،آویشن و فیتاز نسبت هتروفیل به لنفوسیت را افزایش داد و باعث کاهش ایمنی سلول‌های خونی شد ($p<0/05$). هتروفیل‌ها سلول‌های فاگوسیت هستند که برای مقابله با عوامل عفونت‌زایی مانند ویروس‌ها، باکتری‌ها و نیز ذرات خارجی شکل گرفته‌اند و به میزان زیادی در محل‌های آسیب‌دیده در اثر تولید مواد شیمیایی جاذب، حضور می‌یابند. عمده‌ترین عمل هتروفیل‌ها به دام انداختن و از بین بردن ذرات بیگانه به وسیله فاگوسیتوز می‌باشد و افزایش تعداد آنها شاخص مهمی برای مشخص کردن وجود عوامل میکروبی و بیماری‌زا در بدن است(۵۵). لنفوسیت‌ها، لکوسیت‌هایی هستند که در بافت‌های لنفوئیدی مانند تیموس، طحال و غده‌های لنفاوی یافت می‌شوند. در حالت عادی و عدم وجود بیماری و حملات میکروبی، لنفوسیت‌ها اکثریت گلبول‌های سفید خون طیور را تشکیل داده و سلول‌هایی هستند که درنهایت وظیفه تولید آنتی‌بادی و همچنین تظاهرات ایمنی باواسطه سلولی را به عهده دارند(۵۵). در طیور سالم تعداد لنفوسیت‌ها بیشتر از سایر گلبول‌های سفید در خون است. عوامل استرس‌زا با تحریک ترشح هورمون ACTH و هورمون های غدد فوق کلیوی موجب افزایش نسبی تعداد هتروفیل‌ها به لنفوسیت‌ها در طیور می‌شوند(۳۵). این نتایج با افزایش استرس اکسیداتیو درکبد به وسیله‌ی این تیمارها همخوانی دارد. زیرا گزارش شده است، استرس و استرس اکسیداتیو می‌توانند سبب افزایش مقدار چربی بطنی و نیز افزایش وزن کبد می‌شود، همچنین استرس اکسیداتیو سبب تضعیف ایمنی می‌شود(۵۶). نسبت هتروفیل به لنفوسیت معیار موثقی برای بررسی وضعیت ایمنی و استرس پرندگان است. مشخص شده است که استرس و کورتیکوسترون خوراکی سبب افزایش تعداد هتروفیل‌ها و کاهش تعداد لنفوسیت‌ها و در نتیجه‌ی کاهش نسبت هتروفیل به لنفوسیت می‌شود(۵۷). پژوهشگران گزارش کردند که مصرف اسانس آویشن سبب افزایش غیرمعنی‌دار نسبت هتروفیل‌ها به لنفوسیت‌ها شد(۵۸). همچنین گزارش شده است که مصرف آویشن سبب افزایش تولید آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل نشد ولی تعداد هتروفیل و لنفوسیت‌ها را افزایش داد(۵۴). نتایج متناقض در اثر اسانس‌ها بر سیستم ایمنی سلول‌های خون می‌تواند در اثر ژنتیک، نوع و سطح گیاه دارویی مورد استفاده شده باشد(۵۹). البته با وجود نبود اختلاف معنی‌دار در اثرات متقابل سه طرفه، کمترین نسبت هتروفیل به لنفوست در تیماری بود که از هر سه ماده آزمایشی در آن استفاده شده بود. به نظر می‌رسد اثرات همکوشی اسانس‌های آویشن و پونه به همراه فیتاز میکروبی در بهبود سیستم ایمنی موثر بوده است. همچنین، دلیل دیگری که

می‌توان بیان کرد، اینکه گیاهان دارویی و معطر به علت داشتن ترکیبات فلاوونوئیدها،کاروتنوئیدها و ویتامین C، اثرات سودمندی بر سیستم ایمنی داشته باشند(۵۳). از سوس دیگر گیاهان دارویی و معطر بواسطه تولید متابولیت‌های ثانویه از بوجود آمدن تنش‌های فیزیولوژیکی و محیطی حاصل از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کنند(۶۰). با توجه به نتایج ، نتیجه‌گیری می‌شود که استفاده از آنزیم فیتاز میکروبی و اسانس آویشن، جمعیت باکتری‌های کلی‌فرم روده را کاهش می‌دهد. همچنین ایمنی هومورال تحت تأثیر تیمارهای اعمال شده، بهبود پیدا کردند. سطح ایمنی سلول‌های خونی در نتیجه‌ی تیمارهای اعمال شده تحت تأثیر قرار نگرفتند. جهت اطمینان از نتایج حاصله و کسب اطلاعات بیشتر پیرامون استفاده همزمان از اسانس‌ها به ویژه اسانس آویشن و فیتاز میکروبی، نیاز به انجام آزمایش‌های تکمیلی در این زمینه ضروری می‌باشد.

تشکر و قدردانی

از زحمات و راهنمایی‌های دکتر علیرضا صفامهر، دکتر علی نوبخت،دکتر یوسف مهمان‌نواز، دکتر سامان مهدوی و پرسنل محترم مزرعه تحقیقات کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مراغه و دکتر شهرام فرج‌اله‌زاده تشکر به عمل می‌آید.

تعارض منافع

هیچ گونه تعارض منافعی توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع مالی

تحقیق اخیر با هزینه شخصی خود دانشجو و در قالب طرح پژوهشی پایان نامه‌ای انجام شده است.

فهرست منابع

1. Rahimi S, Teymouri Zadeh Z, Karimi Torshizi MA, Omidbaigi R, Rokni H. Effect of the three herbal extracts on growth performance, immune system, blood factors and intestinal selected bacterial population in broiler chickens. J Agric Sci Technol. 2011;13(4):527–39.

2. Association EP. Five years without antibiotic growth promoters (AGP) in the EU livestock production. Accessed Mar. 11, 2013. http://asso-epa.com/five years-withoutantibiotic-growth-promoters-agp-in-the-eu-livestock-production/. 2012.

3. Brochot, A., Guilbot, A., Haddioui, L., Roques, C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. Microbiologyopen. 2017.

4. Adaszyńska-Skwirzyńska, M., Szczerbińska, D. The antimicrobial activity of lavender essential oil (Lavandula angustifolia) and its influence on the production performance of broiler chickens. J Anim Physiol Anim Nut. 2018;102(4):1020–5.

5. Sabo, V. A., Knezevic P. Antimicrobial activity of Eucalyptus camaldulensisDehn. plant extracts and essential oils: A review. Indust. Crop Prod. 2019;132:13–429.

6. Sevim, B., Gümüş, E., Harman, H., Ayasan, T., Başer, E., Altay, Y. A, K. Effects of dietary rosemary essential oil on growth performance, carcass traits and some hematological values of chukar partridge. J Agric Food Sci Technol. 2020;8(2):430–5.

7. Chowdhury, S., Mandal, G.P., Patra, A.K., Kumar, P., Samanta, I. P, S., Samanta A. Different essential oils in diets of broiler chickens: 2. Gut microbes and morphology, immune response, and some blood profile and antioxidant enzymes. Anim Feed Sci Technol. 2018;236:39–47.

8. Pirgozliev, V., Mansbridge, S. C., Rose, S. P., Mackenzie, A. M. B, A., Karadas, F., Bravo D. Dietary essential oils improve feed efficiency and hepatic antioxidant content of broiler chickens. Animal. 2019;13(3):502–8.

9. Juglal S, Govinden R, Odhav B. Spice oils for the control of co-occurring mycotoxin-producing fungi. J Food Prot. 2002;65(4):683–7.

10. Yang Y. F. Zhao L. L. Shao Y. X. Liao X. D. Zhang L. Y. Lin L. U. Luo X. G. Effects of dietary graded levels of cinnamon essential oil and its combination with bamboo leaf flavonoid on immune function, antioxidative ability and intestinal microbiota of broilers. J Int Agric. 2019;18(9):2123-2132.

11. Zhai, H., Liu, H., Wang, S., Wu, J., Kluenter AM. Potential of essential oils for poultry and pigs. Anim Nut. 2018;

12. Sabuna, C., Harimurti, S., Nurcahyo RW. Utilization of distillation waste of Lemon Grass (Cymbopogonnardus) as litter for reducing parasite diseases and its influence on broiler performance. In IOP Conference Series. Earth Environ Sci. 2019;381(1).

13. Sidiropoulou, E., Skoufos, I., Marugan-Hernandez, V., Giannenas I, Bonos, E., Aguiar-Martins, K., Tzora A. In vitro anticoccidial study of oregano and garlic essential oils and effects on growth performance, faecal oocyst output and intestinal microbiota in vivo. Front Vet Sci. 2020;

14. Hernández F, Madrid J, García V, Orengo J, Megías MD. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. Poult Sci. 2004;83(2):169–74.

15. Gülçin, İ., Gören, A.C., Taslimi, P., Alwasel, S.H., Kılıc, O., Bursal E. Anticholinergic, antidiabetic and antioxidant activities of Anatolian pennyroyal (Menthapulegium)-analysis of its polyphenol contents by LC-MS/MS. Biocat Agric Biotechnol. 2020;23:101441.

16. Mehdizadeh T. Hashemzadeh M Nazarizadeh A. Neyriz-Naghadehi M. Tat M. Ghalavand M. Dorostkar. R. Antimicrobial effects of Zataria multiflora essential oil and Lactobacillus acidophilus on Escherichia coli O157 stability in the Iranian probiotic white brined. J Food Saf. 2018;

17. Bouhtit, F., Najar, M., Agha, D.M., Melki, R., Najimi, M., Sadki, K. L, P., Hamal, A., Lagneaux, L., Merimi M. The biological response of mesenchymal stromal cells to thymol and carvacrol in comparison to their essential oil: An innovative new study. Food Chem Toxic. 2019;

18. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R, Beynen AC. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. Br Poult Sci. 2003;44(3):450–7.

19. Mohammadi F. Choobkar N. Goudarzi M. Effects of Mentha Pulegium L and Zataria multiflora on Hematological Parameters, Oxidative Stress Biomarkers and Antibody Titter Resulted from Newcastle and Gumboro Vaccines in Broiler Chickens. Vet Res Biol Prod. 2019;128:116-129. (Persian).

20. Platel K, Srinivasan K. Digestive stimulant action of spices: A myth or reality? Indian J Med Res. 2004;119(5):167–79.

21. Najafi P, Torki M. Performance, blood metabolites and immunocoinpetaence of broiler chicks fed diets included essentioal oils of medicinal herbs. J Anim Vet Adv. 2010;9(7):1164–8.

22. Nobakht A, Norani J, Safamehr A. The effects of different amounts of Mentha pulegium L. (pennyroyal) on performance, carcass traits, hematological and blood biochemical parameters of broilers. J Med Plants Res. 2011;5(16):3763–8.

23. Ghalamkari, G., M. Toghyani, N. Landy ET. Investigation the effects using different levels of Mentha pulegium L. (pennyroyal) in comparison with an antibiotic growth promoter on performance, carcass traits and immune responses in broiler chickens. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;

24. Shelton JL, Southern LL, Gaston LA, Foster A. Evaluation of the nutrient matrix values for phytase in broilers. J Appl Poult Res. 2004;13(2):213–21.

25. Farhadi, D., Karimi, A., Sadeghi, G., Rostamzadeh, J., Bedford M. Effects of a high dose of microbial phytase and myo-inositol supplementation on growth performance, tibia mineralization, nutrient digestibility, litter moisture content, and foot problems in broiler chickens fed phosphorus-deficient diets. Poult Sci. 2017;

26. Roofchaei, A., Rezaeipour, V., Vatandour, S., Zaefarian F. Influence of dietary carbohydrases, individually or in combination with phytase or an acidifier, on performance, gut morphology and microbial population in broiler chickens fed a wheat-based diet. Anim Nut. 2019;5(1):63–7.

27. Walk CL, Bedford MR, Santos TS, Paiva D, Bradley JR, Wladecki H, et al. Extra-phosphoric effects of superdoses of a novel microbial phytase. Poult Sci. 2013;92(3):719–25.

28. Manobhavan M, Elangovan A V, Sridhar M, Shet D, Ajith S, Pal DT, et al. Effect of super dosing of phytase on growth performance, ileal digestibility and bone characteristics in broilers fed corn-soya-based diets. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2016;100(1):93–100.

29. Adeola O, Sands J. Does supplemental dietary microbial phytase improve amino acid utilization? A perspective that it does not. J Anim Sci. 2003;81(14_suppl_2):E78----E85.

30. Steiner T. Phytogenics in animal nutrition. 2009. Nottingham University Press, Nottingham, U. K, ISB.

31. Mehri M, Sabaghi V, Bagherzadeh-Kasmani F. Mentha piperita (peppermint) in growing Japanese quails diet: Performance, carcass attributes, morphology and microbial populations of intestine. Anim Feed Sci Technol. 2015;207:104–11.

32. NRC. Nutrient Requirements of Poultry : Nutrient Requirements of chickens. Natl Acad Press. 1994;(Ninth Edition):National Academy Press, Washington, DC.

33. Hashemi SR, Zulkifli I, Davoodi H, Zunita Z, Ebrahimi M. Growth performance, intestinal microflora, plasma fatty acid profile in broiler chickens fed herbal plant (Euphorbia hirta) and mix of acidifiers. Anim Feed Sci Technol. 2012;178(3–4):167–74.

34. Allan WH and Gough REA. Standard haemagglutination inhibition test for Newcastle disease: A comparison of macro and micro methods. Vet Rec. 1973;95(6):120–3.

35. Sturkie PD. Avian physiologhy. (4nd ed). Phytogenics Anim Nutr. 1995;New York: Springer Verlag.

36. SAS. SAS Users guide: Statistics. Cary, NC. 2009;

37. Saki AA, Kalantar M, Khoramabadi V. Effects of Drinking Thyme Essence (Thymus vulgaris L.) on Growth, Performance, Immune Response and Intestinal Selected Bacterial Population in Broiler Chickens. Poult Sci J. 2014;2(2):113–23.

38. Aydin A, Pekel AY, Issa G, Demirel G, Patterson PH. Effects of dietary copper, citric acid, and microbial phytase on digesta pH and ileal and carcass microbiota of broiler chickens fed a low available phosphorus diet. J Appl Poult Res. 2010;19(4):422–31.

39. Rabizadeh S, Sears C. Diseases Specialist: How Gut Microflora Promote Health and Disease. Curr Infect Dis Rep. 2008;10:92–8.

40. EL-Sawah AA, Dahshan ALHM, El-Nahass E-S, El-Mawgoud AIA. Pathogenicity of Escherichia coli O157 in commercial broiler chickens. Beni-Suef Univ J Basic Appl Sci. 2018;7(4):620–5.

41. Li Z, Wang W, Liu D, Guo Y. Effects of Lactobacillus acidophilus on the growth performance and intestinal health of broilers challenged with Clostridium perfringens. J Anim Sci Biotechnol. 2018;9(1):25.

42. Hoffman-Pennesi D, Wu C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal Salmonella population in broilers. J Appl Poult Res. 2010;19(4):432–43.

43. Ghazanfari, Sh. Adib Moradi, M. Rahimi Niat F. Effects of different levels of Artemisia sieberi essential oil on intestinal morphology characteristics, microflora population and immune system in broiler chickens. J Vet Res. 2015;70(2):195–202.

44. Tiihonen K, Kettunen H, Bento MHL, Saarinen M, Lahtinen S, Ouwehand AC, et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. Br Poult Sci. 2010;51(3):381–92.

45. Wang X, Gibson GR. Effects of the in vitro fermentation of oligofructose and inulin by bacteria growing in the human large intestine. J Appl Bacteriol. 1993;75(4):373–80.

46. Oskoueian E. Dalir M. A review of the most widely used medicinal plant active compounds and their effects on growth, health and production parameters in the poultry industry. Vet Res Biol Prod. 2019;125:: 2-12. (Persian).

47. Razieh Valipourian. Farid Shariatmadari. Mohammad Amir Karimi Torshizi. Effect of Garlic and Thyme's essential oils blend after feed restriction period on the performance, growth rate and microbial population of broiler chickens. Anim Prod. 2018;20(4):565-576 persian.

48. Kyaw PHH, San Win K, Lay KK MK, KH MA and S. Effect of dietary garlic and thyme seed supplementation on the production performance,

carcass yield and gut microbial population of broiler chickens. J Sci Agric. 2017;269–74.

49. Bento MHL AT and MH. The influence of tannin, pectin and polyethylene glycol on attachment of 15N-labelled rumen microorganisms to cellulose. Anim Feed Sci Technol. 2005;122:41–57.

50. Salimian, A. M., Tabeidian, S. A. and Irandoust H 2016. Dietary effects of cinnamon, turmeric and carnation powders on performance, morphological changes of intestine and blood serum oxidation status of broilers. J Anim Prod. 2016;18:141--150 (In Persian).

51. Bölükbaşi ŞC, Erhan MK, Kaynar Ö. The effect of feeding thyme, sage and rosemary oil on laying hen performance, cholesterol and some proteins ratio of egg yolk and Escherichia coli count in feces. Arch fur Geflugelkd. 2008;72(5):231–7.

52. Hashemipour, H., H. Kermanshahi, A. Golian, T. Veldkam P. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. Poult Sci. 2013;92:2059–69.

53. Voljč M, Frankič T, Levart A, Nemec M, Salobir J. Evaluation of different vitamin e recommendations and bioactivity of α-tocopherol isomers in broiler nutrition by measuring oxidative stress in vivo and the oxidative stability of meat. Poult Sci. 2011;90(7):1478–88.

54. Al-Beitawi NA, El-Ghousein SS, Athamneh MZ. Effect of Adding Crushed Pimpinella Anisum, Nigella Sativa Seeds and Thymus Vulgaris Mixture to Antibiotics-Free Rations of Vaccinated and Non-Vaccinated Male Broilers on Growth Performance, Antibody Titer and Haematological Profile. Ital J Anim Sci. 2010;9(2):e43.

55. Safamehr A, Mirahmadi M, Nobakht A. Effect of nettle (Urtica dioica) medicinal plant on growth performance, immune responses, and serum biochemical parameters of broiler chickens. Int Res J Appl Basic Sci(Internet). 2012;3(4):721–8. Available from: http://www.irjabs.com

56. Eid YZ, Ohtsuka A, Hayashi K. Tea polyphenols reduce glucocorticoid-induced growth inhibition and oxidative stress in broiler chickens. Br Poult Sci. 2003;44(1):127–32.

57. Gross WB, Siegel HS. Evaluation of the Heterophil/Lymphocyte Ratio as a Measure of Stress in Chickens. Avian Dis. 1983;27(4):972–9.

58. Souri H, Khatibjoo A, Taherpoor K, Hassan Abadi A, Fattahnia F, Askari M. Effect of Thymus vulgaris and Satureja khuzestanica Ethanolic Extracts on Broiler Chickens' Performance and Immune Response. Iran J Appl Anim Sci. 2015;5(2):437–46.

59. Symeon GK, Zintilas C, Ayoutanti A, Bizelis JA, Deligeorgis SG. Effect of dietary oregano essential oil supplementation for an extensive fattening period on growth performance and breast meat quality of female medium-growing broilers. Can J Anim Sci. 2009;89(3):331–4.

60. Windisch W, Schedle K, Plitzner C, Kroismayr A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. J Anim Sci. 2008;86(14):E140--E148.

Journal of Animal Physiology and Development
Volume 16, Issue 1, Number 61, Pages 111-128
Qjaphd.sinaweb.net **ISSN: 9880-1735**

The effects of adding essential oils (*Thymus vulgaris* L. *and Mentha pulegium* L.) and microbial phytase on intestinal microflora and immune level (humoral immunity (HI) and blood cells) in broilers.

Eslam Ghalandari [1], Alireza Safamehr[2], **Ali Nobakht[3]**, Yousef Mehmannavaz[4] and Saman Mahdavi [5]

1. PhD student in Animal Nutrition, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran.
2. Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran.
3.Associate Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran.
Corresponding author: anobakht20@yahoo.com
4.Assistant Professor, Department of Animal Sciences, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran
5.Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, Maragheh Branch, Maragheh, Iran

Received:2022.08. 31 **Accepted: 2022.10.17**

Abstract

Background & Aims: Although medicinal plants have been used in different ways in feeding poultry, including broiler chickens, the simultaneous use of essential oils and enzymes, especially microbial phytase enzyme, has been used less. Thyme and Mentha are plants that affect the immune system. The positive effects of phytase have been documented in poultry. The purpose of this research is to investigate the mutual effects of essential oils and phytase enzyme on intestinal microflora and immunity level of broiler chickens.

Materials and Methods: This experiment examines intestinal microflora and immune level (humoral immunity (HI test) and blood cells) using three levels of thyme essential oil, Mentha essential oil and microbial phytase with 8 treatments and 4 repetitions and a total of 32 test units for 42 days. It was done on broilers. Culture methods (MRS-Agar and EMB) and ELISA method and commercial biochemistry kits were used to check intestinal microflora and immune level, respectively.

Results: Examining the main effects showed that the treatments that consumed thyme essential oil had lower coliform population and total aerobic bacteria (TAB) compared to other treatments ($p<0.05$). The level of humoral immunity showed a significant difference among different experimental groups ($p<0.05$). The treatments that did not receive essential oils of thyme and Mentha had the lowest ratio of heterophils to lymphocytes ($p<0.05$).

Conclusion: The results showed that the use of microbial phytase enzyme and thyme essential oil reduces the population of intestinal coliform bacteria and the use of thyme essential oil improves humoral immunity.

Key word: essential oil, immunity, microbial phytase, intestinal microflora, broiler