

اثر سرکه و پروبیوتیک بر عملکرد رشد، pH و جمعیت لاکتوباسیلوس محتویات گوارشی جوجه‌های گوشتی در دوره آغازین

پرویز الله دو^۱، حیدر زرقی^{۲*}، حسن کرمانشاهی^۳، محمد رضا عدالتیان دوم^۴

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد- گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- استادیار گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۳- استاد گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی- دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی- دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۱۴ تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۱۵

چکیده

این آزمایش به منظور بررسی اثر افرودن سرکه به آب آشامیدنی و پروبیوتیک به جیره آغازین بر عملکرد، pH محتویات گوارشی و جمعیت لاکتوباسیلوس ایشورم جوجه‌های گوشتی انجام شد. آزمایش با استفاده از ۳۳۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یکروزه سویه رأس-۳۰۸ در قالب طرح کاملاً تصادفی به روش فاکتوریل ۳×۲، با ۶ تیمار، ۵ تکرار و ۱۱ قطعه جوجه در هر تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل افرودن دو سطح صفر و ۱/۰ درصد پروبیوتیک ^{۱۰}×۱۰۱ تعداد باکتری زنده مولک اسید لاکتیک در هر گرم مکمل به جیره آغازین و افرودن سه سطح صفر، ۱ و ۲ درصد سرکه با غلاظت ۵ درصد اسید استیک به آب آشامیدنی بودند. جیره پایه بر مبنای ذرت و کنجاله سویا و بر اساس جداول احتیاجات راهنمای پرورش جوجه‌های گوشتی سویه رأس-۳۰۸-۲۰۱۵ سال ۲۰ تنظیم شد. آزمایش در دوره سنی آغازین (۱-۱۰ روزگی) انجام شد. در سن ۱۰ روزگی یک قطعه جوجه از هر واحد آزمایشی (۵ قطعه برای هر تیمار) انتخاب و به منظور بررسی pH محتویات اندام‌های گوارشی و فلور میکروبی ایشورم کشتار شدند. میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی در پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک توأم با افرودن سرکه در سطوح ۱ و ۲ درصد به آب آشامیدنی در مقایسه با پرندگان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل به طور معنی داری کمتر بود. جمعیت لاکتوباسیلوس ایشورم در پرندگان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل به طور معنی داری توأم با افرودن سرکه در سطوح ۱ و ۲ درصد به آب آشامیدنی در مقایسه با پرندگان تغذیه شده با جیره حاوی پروبیوتیک و یا آب آشامیدنی حاوی سرکه در مقایسه با پرندگان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل به طور معنی داری بیشتر بود. اثر افرودن پروبیوتیک به جیره، افرودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر pH محتویات گوارشی معنی دار نشد. نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد افرودن اسید آلی به آب مصرفی توأم با افرودن پروبیوتیک به جیره آغازین می‌تواند در استقرار فلور میکروبی مفید ایشورم و راندمان غذایی جوجه‌های گوشتی مؤثر باشد.

کلمات کلیدی: سرکه، پروبیوتیک، جوجه‌های گوشتی

* نویسنده مسئول: حیدر زرقی

آدرس: گروه علوم دامی- دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. تلفن: ۰۵۱۳۸۰۵۷۶۵

پست الکترونیک: h.zarghi@um.ac.ir

محیط قلایی دستگاه گوارش پرنده در روزهای اول زندگی می‌شود و به این ترتیب شرایط برای فعالیت و استقرار میکروارگانیسم‌های پاتوژن مثل کلستریدیوم‌ها فراهم می‌گردد. برای از بین بردن میکروارگانیسم‌های مضر می‌توان با تقویت میکروارگانیسم‌های مفید و غلبه بر باکتری‌های مضر زمینه بهبود عملکرد حیوان را فراهم نمود (۲۷).

اسیدی فایرها شامل ترکیباتی از اسیدهای آلی (اسید استیک، اسید پروپیونیک، اسید بوتیریک، اسید سیتریک و نمک‌های آنها) هستند. اسیدهای آلی را می‌توان به صورت مکمل غذایی به جیره یا به آب آشامیدنی طیور اضافه نمود. اسیدهای آلی با کمک به باکتری‌های مفید در ایجاد کلنی، غلبه بر جمعیت میکروب‌های مضر و ایجاد تعادل میکروبی در دستگاه گوارش اثرات مثبت خود را بر جای می‌گذارند و در نهایت باعث بهبود شاخص‌های عملکرد تولیدی، راندمان تبدیل غذایی، تحریک سیستم ایمنی و خشی کردن سموم باکتریایی در روده می‌شوند (۴). افزودن اسیدهای آلی به خوراک یا آب آشامیدنی باعث کاهش pH محتويات دستگاه گوارش، کاهش تجمع پاتوژن‌ها در دیواره روده، تحریک رشد فلور میکروبی مفید روده (۶)، کمک به غلبه جمعیت باکتری مفید بر باکتری‌های بیماری‌زا و کاهش متابولیت‌های سمی (آمونیاک و آمین‌ها) تولید شده توسط باکتری‌های مضر می‌شوند (۳۵).

پروپیوتیک به مخلوطی از باکتری‌های زنده گفته می‌شود که با هدف ایجاد تأثیرات مفید از طریق تغییر کمی و کیفی فلور میکروبی روده مورد استفاده قرار می‌گیرند. هدف از خوراندن پروپیوتیک‌ها تثبیت میکروب‌های مفید و ممانعت از تجمع باکتری‌های مضردر دستگاه گوارش و به دنبال آن کمک به حفظ

مقدمه

فلور میکروبی دستگاه گوارش تحت تأثیر عوامل مختلف استرس‌زا همچون حمل و نقل، واکسیناسیون، تغییر جیره غذایی، بیماری‌ها و جزء این‌ها واقع است. برهم خوردن تعادل فلور میکروبی دستگاه گوارش موجب تضعیف مکانیسم‌های دفاعی بدن میزبان می‌شود، در این شرایط استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، به منظور مهار یا حذف میکروارگانیسم‌های زیان‌آور اجتناب ناپذیرخواهد بود. مصرف مستمر و طولانی مدت آنتی‌بیوتیک‌ها به منظور پیشگیری از وقوع بیماری‌ها یا کنترل آنها در پرورش دام و طیور، ممکن است منجر به حضور این نوع ترکیبات در محصولات تولیدی شود (۱۰). همچنین استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها موجب ایجاد سویه‌های مقاوم میکروبی بیماری‌زا می‌شود، به طوری که کمیسیون افزودنی‌های ضد میکروبی خوراک اروپا طی گزارشی باقی‌مانده‌های آنتی‌بیوتیک در محصولات دامی را تهدیدی جدی برای سلامت انسان مطرح کرده است. از سال ۱۹۹۷، سازمان‌های بهداشت و خوار و بار جهانی توجه زیادی به خطرات بالقوه افزودن آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد به جیره دام و طیور داشته و سرانجام در اروپا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد از سال ۲۰۰۶ ممنوع شد (۱۴).

در دوران جنینی دستگاه گوارش جوجه عاری از هر گونه میکروارگانیسم است. پس از هچ میکروارگانیسم‌ها به دستگاه گوارش وارد، در اندام‌های مختلف دستگاه گوارش مستقر و تکثیر می‌یابند. تنوع میکروبی تشییت شده در دستگاه گوارش تحت تأثیر شرایط متفاوت فیزیکی و شیمیایی حاکم بر بخش‌های مختلف دستگاه گوارش واقع است. در دوران جنینی املاح صفراءوری مترشحه در روده تجمع می‌یابد و باعث ایجاد

روشنایی و ۱ ساعت تاریکی در کل دوره آزمایش اعمال شد.

جیره مورد استفاده در این آزمایش بر پایه ذرت و کنجاله سویا تنظیم شد، به این منظور ترکیب شیمیایی اقلام پایه جیره (ذرت و کنجاله سویا) مورد استفاده در تنظیم جیره‌های مصرفی به روش طیف بینی مادون قرمز نزدیک انعکاسی (Near infrared reflectance) تعیین شدند. سرکه مورد استفاده در این آزمایش سرکه سیب با غلظت ۵ درصد اسید استیک بود. پروپیوتیک مورد استفاده در این آزمایش، پروپیوتیک باکتریایی لاکتوباسیل - باکتوسل با تعداد باکتری زنده مولد اسید لاکتیک 1×10^{10} CFU در هر گرم بود. جیره پایه بر اساس حداقل احتیاجات اسیدهای آمینه قابل هضم توصیه راهنمای رأس (۳۰۸) و ترکیب شیمیایی مواد خوراکی بر اساس نتایج حاصل از آنالیز مواد خوراکی پایه (ذرت، کنجاله سویا) به روش NIR، با استفاده از نرم افزار جیره نویسی UFFDA تنظیم شد.

اعمال تیمارهای آزمایشی شامل مکمل کردن آب آشامیدنی با افزودن سه سطح سرکه سیب (صفر، ۱ و ۲ درصد) با و بدون افزودن پروپیوتیک به میزان ۰/۱ درصد به جیره مصرفی، به روش فاکتوریل (۳×۲) در قالب طرح کاملاً تصادفی، ۶ تیمار با ۵ تکرار و ۱۱ قطعه پرنده در هر تکرار انجام شد.

جوچه‌های هر پن در بدبو ورود به سالن و سن ۱۰ روزگی به صورت گروهی توزین شدند. به منظور حداقل کردن اثر وزن محتویات دستگاه گوارش ۴ ساعت قبل از وزن‌کشی (در سن ۱۰ روزگی) به جوچه‌ها گرسنگی داده شد. رشد به صورت میزان افزایش وزن روزانه به ازای هر قطعه پرنده در روز محاسبه شد. میزان مصرف خوراک هر پن معادل مقدار خوراک عرضه شده در طول دوره منهای مقدار خوراک باقی

سلامت حیوان است (۹). پروپیوتیک‌ها با ایجاد تغییرات مؤثر در جمعیت میکروبی روده و نگهداری فلور باکتری‌های مفید مصرفي، کاهش جمعیت میکروب‌های بیماری‌زا، تحریک رشد میکروب‌های تولید کننده‌ی اسیدلاکتیک و به دنبال آن تغییر pH محتویات روده، کاهش تولید مواد سمی، کاهش فعالیت آنزیم‌های باکتریایی و تولید آمونیاک (۱۶ و ۳۶) و بهبود هضم خوراک (۱۷) اثرات مثبت خود را اعمال می‌کنند.

این پژوهش به منظور بررسی اثر افزودن سطوح مختلف سرکه (به عنوان یک اسیدی فایر ارزان و قابل دسترسی) به آب آشامیدنی و همچنین افزودن پروپیوتیک باکتوسل به جیره مصرفی در دوره آغازین پرورش (۱-۱۰ روزگی) جوجه‌های گوشتی بر عملکرد، جمعیت لاکتوباسیلوس ایلنوم و pH محتویات دستگاه گوارش انجام شد.

مواد و روش کار

برای انجام این آزمایش تعداد ۳۳۰ قطعه جوجه خروس گوشتی یک روزه سویه تجاری رأس ۳۰۸ از نزدیکترین موسسه جوجه کشی به محل آزمایش تهیه شد. جوجه‌ها بعد از ورود به سالن توزین و بین ۳۰ پن (در هر پن ۱۱ پرنده) با میانگین وزن گروهی مشابه (514 ± 25 گرم) تقسیم شدند. هر پن توسط مانع توری به ارتفاع یک متر محصور و دارای یک متر مربع مساحت بود. دمای جایگاه پرورش در روز ورود جوجه‌ها ۳۲-۳۵ درجه سانتی گراد تنظیم شد، پس از ۷۲ ساعت روزانه ۰/۵-۰/۴ درجه سانتی گراد دمای سالن کاهش یافت. رطوبت نسبی در دامنه ۶۰-۷۰ درصد تأمین و برنامه نوردهی سالن شامل ۲۳ ساعت

های کشت به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط بی‌هوایی قرار گرفتند.

داده‌های به دست آمده برای اثرات اصلی، سطوح مختلف افزودن سرکه به آب آشامیدنی و افزودن پروپویوتیک به جیره مصرفی و برای اثرات متقابل بین آنها آنالیز شدند. نتایج بدست آمده از آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با روش فاکتوریل، با استفاده از نرم افزار آماری SAS و رویه مدل عمومی خطی GLM مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ($P < 0.05$) انجام شد (۳۴). مدل ریاضی طرح آماری به شرح زیر بود.

$$Y_{ijk} = \mu + V_i + T_j + VT_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

که در آن Y_{ijk} = مقدار صفت مورد نظر، μ = میانگین جامعه، V_i = اثر سطح سرکه در آب، T_j = اثر افزودن پروپویوتیک به جیره، VT_{ij} = اثر متقابل سطح سرکه در آب آشامیدنی و افزودن پروپویوتیک به جیره و ε_{ijk} = خطای آزمایش در هر مشاهده است.

نتایج

تأثیر افزودن سطوح مختلف پروپویوتیک به جیره و افزودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر فراسنجه‌های عملکرد تولیدی جوجه‌های گوشتشی در دوره آغازین در جدول ۲ گزارش شده است. اثر افزودن پروپویوتیک به جیره بر مصرف خوراک معنی دار شد ($P < 0.02$)، ولی اثر افزودن سرکه در سطوح مختلف (صفر، ۱ و ۲ درصد) به آب آشامیدنی بر مصرف خوراک تأثیر معنی داری نداشت ($P > 0.05$ ، اثر متقابل افزودن پروپویوتیک به جیره مصرفی و سرکه به آب آشامیدنی بر مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک معنی دار شد ($P < 0.05$).

مانده در پایان دوره محاسبه سپس میزان مصرف خوراک هر قطعه در روز با توجه به تعداد جوجه‌های هر پن و تاریخ بروز تلفات به صورت گرم مصرف خوراک به ازای هر قطعه در روز تصحیح شد. ضریب تبدیل خوراک یا مقدار غذای مورد نیاز برای افزایش واحد وزن زنده از تقسیم خوراک مصرفی بر میزان افزایش وزن محاسبه شد.

در روز ۱۰ آزمایش از هر واحد آزمایشی یک قطعه پرنده (۵ قطعه از هر تیمار) که به میانگین وزنی پرنده‌گان واحد آزمایشی نزدیک بود، جهت کشتار انتخاب شد. پرنده‌گان انتخاب شده توزین با جابه‌جایی مهره گردن کشتار، بلا فاصله محوطه شکمی باز و اندام‌های مختلف دستگاه گوارش آنها جدا شدند. مقدار ۰/۵ گرم از محتويات اندام‌های گوارشی (چینه دان، سنگدان و ایلئوم) به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط و پس از ۳۰ ثانیه هم زدن pH محتويات با دستگاه pH متر (Metrohm AG CH-9101 Herisau, Switzerland) خوانده و ثبت شد (۳۵). محتويات ایلئوم به داخل فالکون استریل به سرعت تخلیه شده و تا زمان انتقال به آزمایشگاه بر روی یخ نگهداری شدند، در آزمایشگاه نمونه‌ها تا هنگام انجام کارهای آزمایشگاهی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. برای شمارش تعداد باکتری‌های لاکتوباسیلوس از هر فالکون مقدار ۱ گرم نمونه گرفته شد. یک گرم نمونه اخذ شده را با ۹ میلی لیتر محلول PBS رقیق و به خوبی مخلوط تا کاملاً همگن گردد، سپس رقت‌های سریالی تا 10^{-4} و 10^{-5} از این محلول تهیه گردید. با توجه به اینکه بررسی جمعیت لاکتوباسیل‌ها هدف این آزمایش بود از محیط‌های Muller-Hinton Agar (MHA) کشت داده شد. هر رقت در محیط کشت MHA برای شمارش باکتری لاکتوباسیلوس کشت داده شد. محیط

محتویات قسمت‌های مختلف دستگاه گوارش نداشت ($P > 0.05$).

تأثیر افزودن سطوح مختلف پروپیوتیک به جیره و افزودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر جمعیت لاکتوباسیلوس محتویات ایلئوم جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰ روزگی در جدول ۳ گزارش شده است. اثر افزودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی و پروپیوتیک به جیره مصرفی بر جمعیت لاکتوباسیلوس معنی‌دار نشد ($P > 0.05$). اثر متقابل بین افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی و سرکه به آب آشامیدنی بر جمعیت لاکتوباسیلوس ایلئوم معنی دار شد ($P < 0.05$). جمعیت لاکتوباسیلوس ایلئوم در پرنده‌گان تغذیه شده با جیره حاوی پروپیوتیک و یا آب آشامیدنی حاوی سرکه در مقایسه با پرنده‌گان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل، میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک کمتری داشتند (جدول ۲). اثر افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی، سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر میانگین وزن زنده در سن ۱۰ روزگی، میزان افزایش وزن روزانه (رشد) معنی‌دار نشد ($P > 0.05$).

پرنده‌گان تغذیه شده با جیره حاوی پروپیوتیک و آب آشامیدنی حاوی سرکه در سطح ۱ و ۲ درصد به طور معنی‌داری در مقایسه با پرنده‌گان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل، میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک کمتری داشتند (جدول ۲). اثر افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی، سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر میانگین وزن زنده در سن ۱۰ روزگی، میزان افزایش وزن روزانه (رشد) معنی‌دار نشد ($P > 0.05$).

تأثیر افزودن سطوح مختلف پروپیوتیک به جیره و افزودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی و اثر متقابل بین آنها بر pH محتویات چینه‌دان، سنگ‌دان و ایلئوم جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰ روزگی در جدول ۳ گزارش شده است. نتایج نشان داد که افزودن سطوح مختلف سرکه به آب آشامیدنی، پروپیوتیک به جیره مصرفی و اثر متقابل بین آنها تأثیر معنی‌داری بر pH

جدول ۱- ترکیب اقلام خوراکی (درصد) و مواد مغذی جیره آزمایشی ۱

درصد	اقلام خوراکی
۴۹/۱۷	ذرت
۴۲/۱۵	کنچاله سویا
۴/۲۰	روغن سویا
۱/۰۶	دی‌کاسیم فسفات
۱/۴۱	سنگ آهک
۰/۱۹	نمک طعام
۰/۱۵	جوش شیرین
۰/۳۵	دی-آل-متیونین
۰/۲۰	ال-لیزین هیدروکلراید
۰/۱۲	ال-ترنوفین
۰/۲۵	مکمل ویتامینه ۲
۰/۲۵	مکمل معدنی ۳
۳۰۰۰	آنالیز محاسباتی مواد مغذی جیره‌های آزمایشی بر حسب نتایج آنالیز ذرت و کنچاله سویا
۲۳/۰۰	پرووتین خام (درصد)
۰/۹۶	کلریم (درصد)
۰/۹۸	فسفرقابل دسترس (درصد)
۰/۱۶	سدیم (درصد)
۰/۲۰	کلر (درصد)
۱/۲۵	پتاسیم (درصد)
۱/۴۱	آرژنین (درصد)
۰/۶۵	متیونین (درصد)
۱/۲۸	لیزین (درصد)
۰/۹۵	متیونین+سیستین (درصد)
۰/۱۸۶	ترنوفین (درصد)

^a در جیره فوق با جایگزینی سطوح صفر و ^b درصد مکمل پروپویوتیک باکتریایی لاکتوباسیل - باکتوسل با تعداد باکتری زنده مولد اسید لاتکتیک 1×10^{10} CFU در هر گرم ≤ 2 تیمار آزمایشی تهیه شد.

^c مکمل ویتامین در هر کیلو گرم جیره مواد زیر را تأثیر می کرد: ویتامین A، ۹۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین D₃، ۲۰۰۰ واحد بین المللی؛ ویتامین E، ۱۸ واحد بین المللی؛ ویتامین K₃، ۲ میلی گرم؛ ویتامین B₁₂، ۰۰۲ میلی گرم؛ تیامین، ۱/۸ میلی گرم؛ ریبوفلاوین، ۶/۶ میلی گرم؛ نیاسین، ۱۰ میلی گرم؛ اسید فولیک، ۰/۱ میلی گرم؛ بیوتین، ۰/۱۵ میلی گرم؛ پریدوکسین، ۳ میلی گرم؛ اسید پانتوتئیک، ۳۰ میلی گرم؛ کولین کلراید، ۵۰ میلی گرم.

^d مکمل مواد معدنی در هر کیلو گرم جیره مواد زیر را تأثیر می کرد: روی، ۸۴/۷ میلی گرم؛ منگنز، ۱۰۰ میلی گرم؛ سلنیوم، ۰/۰۰۰ میلی گرم؛ مس، ۱۰ میلی گرم؛ آهن، ۵۰۰ میلی گرم.

جدول ۲- اثر افزودن پروپویوتیک به جیره آغازین و سرکه به آب آشامیدنی بر شاخص‌های عملکرد تولیدی جوجه‌های گوشتی ۱-۰ روزگی

		تعداد تکرار		اثر اصلی و م مقابل	
		میانگین وزن ۱۰ روزگی	ضریب تبدیل خواراک	پروپویوتیک	
		(گرم/گرم)	(برنده/گرم)	صفر	
۱/۴۳	۱۸/۲۳	۲۵/۷۴ ^a	۲۲۸/۴۵	۱۵	
۱/۳۷	۱۷/۹۲	۲۴/۱۶ ^b	۲۲۵/۴۹	۱۵	
۰/۰۲	۰/۳۸	۰/۴۶	۳/۹۰	خطای استاندارد میانگین	
				سرکه	
۱/۴۳	۱۸/۱۶	۲۶/۰۰	۲۲۷/۳۴	۱۰	
۱/۳۹	۱۸/۱۹	۲۴/۵۳	۲۲۸/۲۷	۱۰	
۱/۳۸	۱۷/۸۷	۲۴/۳۲	۲۲۵/۳۰	۱۰	
۰/۰۳	۰/۹۷	۰/۰۷	۴/۷۸	خطای استاندارد میانگین	
				الرات مقابل	
				پروپویوتیک	
۱/۴۷ ^a	۱۸/۵۷	۲۷/۲۱ ^a	۲۳۱/۴۰	۵	صفر
۱/۳۹ ^{ab}	۱۸/۲۳	۲۴/۹۴ ^{ab}	۲۲۸/۵۵	۵	۱
۱/۴۲ ^{ab}	۱۷/۸۹	۲۵/۰۶ ^{ab}	۲۲۵/۴۰	۵	۲
۱/۴۰ ^{ab}	۱۷/۷۵	۲۴/۷۹ ^{ab}	۲۲۲/۲۷	۵	صفر
۱/۳۸ ^b	۱۸/۱۵	۲۴/۱۱ ^b	۲۲۸/۰۰	۵	۱
۱/۳۴ ^b	۱۷/۸۶	۲۳/۵۸ ^b	۲۲۵/۱۹	۵	۲
۰/۰۴	۰/۹۶	۰/۸۱	۶/۷۶	خطای استاندارد میانگین	
				سطح احتمال معنی‌داری	
۰/۲۹	۰/۵۷	۰/۰۲	۰/۵۹	پروپویوتیک	
۰/۶۶	۰/۸۷	۰/۰۹	۰/۹۰	سرکه	
۰/۰۴	۰/۸۰	۰/۰۴	۰/۸۰	پروپویوتیک × سرکه	

^{a,b} میانگین‌های هر ستون برای هر اثر (اصلی و مقابل) که دارای حروف غیر مشابه هستند اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

جدول ۳- اثر افزودن پروپویوتیک به جیره آغازین و سرکه به آب آشامیدنی بر جمعیت لاکتوباسیلوس ایلیوم و pH محتويات دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی در سن ۱۰ روزگی

		تعداد		اثر اصلی و مقابل	
		pH اندام‌های گواراشی	جمعیت لاکتوباسیلوس	تکرار	پروپویوتیک
		چیزه دان	ایلیوم	سکنگان	
			Log CFU/g		
۶/۱۷	۲/۸۸	۴/۴۷	۳/۴۵	۱۵	صفر
۶/۰۰	۳/۰۰	۴/۴۵	۳/۵۷	۱۵	۰/۱
۰/۲۳	۰/۰۵	۰/۰۳	۰/۰۵	خطای استاندارد میانگین	سرکه
۶/۰۶	۳/۰۱	۴/۴۴	۳/۳۷	۱۰	صفر
۶/۲۲	۲/۹۴	۴/۵۱	۳/۵۸	۱۰	۱
۵/۹۷	۲/۸۹	۴/۴۴	۳/۵۹	۱۰	۲
۰/۲۸	۰/۰۷	۰/۰۴	۰/۰۶	خطای استاندارد میانگین	الرات مقابل
				پروپویوتیک	
۵/۸۷	۲/۸۸	۴/۲۸	۲/۱/ ^b	۵	صفر
۶/۱۴	۲/۹۸	۴/۵۴	۲/۶۰ ^a	۵	۱
۶/۲۹	۲/۷۹	۴/۴۹	۲/۶۵ ^a	۵	۲
۶/۲۵	۲/۱۳	۴/۴۹	۲/۶۳ ^a	۵	صفر
۶/۱۰	۲/۹۰	۴/۲۸	۲/۵۶ ^a	۵	۱
۵/۶۴	۲/۹۹	۴/۳۹	۲/۵۳ ^a	۵	۲
۰/۴۰	۰/۱۰	۰/۰۵	۰/۰۸	خطای استاندارد میانگین	سطح احتمال معنی‌داری
				پروپویوتیک	
۰/۶۱	۰/۱۶	۰/۷۳	۰/۱۵	۰/۱۵	پروپویوتیک
۰/۸۱	۰/۵۲	۰/۴۰	۰/۴۲	۰/۴۲	سرکه
۰/۴۵	۰/۲۴	۰/۲۳	۰/۰۲	۰/۰۲	پروپویوتیک × سرکه

^{a,b} میانگین‌های هر ستون برای هر اثر (اصلی و مقابل) که دارای حروف غیر مشابه هستند اختلاف معنی دار است ($P < 0.05$).

وزن در سن ۱۰ روزگی و رشد روزانه (۱۰-۱ روزگی) نداشت (جدول ۲). در توافق با نتایج حاصل از این آزمایش افزودن پروپیوتیک به جیره جوجه‌های گوشتی، اثری بر افزایش وزن بدن و رشد دستگاه گوارش نداشت (۱۱ و ۳۷). در مقابل برخی از محققین اثر افزودن پروپیوتیک به جیره جوجه‌های گوشتی را برابر رشد مثبت ارزیابی کرده‌اند، آن‌ها نشان دادند که وزن بدن در جوجه‌هایی که پروپیوتیک اسید لاکتیکی دریافت کرده بودند نسبت به آنهایی که آن را دریافت نکرده بودند، به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت (۱۰ و ۳۳). این اثرات مثبت ممکن است تحت تأثیر ویژگی‌های عمومی پروپیوتیک‌ها مانند تولید اسید لاکتیک، حذف رقباتی باکتری‌های بیماری‌زا و بهبود وضعیت لایه مخاطی روده واقع باشد (۲۴، ۲۹ و ۳۰).

نتایج مطالعات متعدد نشان داده است که اسیدی نمودن جیره با استفاده از مکمل اسیدهای آلی در سطح مناسب سبب بهبود افزایش وزن بدن جوجه‌های گوشتی می‌گردد که این امر ناشی از بهبود مصرف خوراک، بهبود هضم و جذب خوراک، بهبود فلور میکروبی مفید روده، کاهش تولید مواد سمی، کاهش وقوع عفونت‌ها و تعدیل پاسخ سیستم ایمنی طیور به هنگام استفاده از مکمل اسیدهای آلی در جیره می‌باشد (۱ و ۳). عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی هنگام استفاده از اسیدهای چرب کوتاه و متوسط زنجیره بهبود یافته است (۲۱) همچنین استفاده از اسیداستیک، اسیدسیتریک و اسیدلاکتیک باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک گردید (۲). البته عدم تأثیر مثبت افزودن اسیدآلی به جیره بر عملکرد رشد توسط برخی محققین نیز گزارش شده است (۲۳ و ۲۶).

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد افزودن سرکه به آب آشامیدنی تأثیر معنی داری بر pH محتويات

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از این آزمایش نشان داد که پرنده‌گان تغذیه شده با جیره حاوی پروپیوتیک و آب آشامیدنی حاوی سرکه در سطح ۱ و ۲ درصد به طور معنی‌داری در مقایسه با پرنده‌گان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل دارای میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل خوراک کمتری بودند (جدول ۲). افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی موجب بهبود قابلیت دسترسی مواد مغذی و مواد معدنی از طریق محلول سازی و جذب بهتر آن‌ها و سنتز بعضی از ویتامین‌ها می‌شود (۲۰) و به این طریق باعث کاهش میزان مصرف خوراک می‌شود. افزودن پروپیوتیک به جیره جوجه‌های گوشتی باعث کاهش ضریب تبدیل خوراک (۳۱) شد. اگر چه در مقابل نتایج بدست آمده از این آزمایش و نتایج فوق گزارش شده است که افزودن پروپیوتیک لاکتوپاسیلوس به جیره جوجه‌های گوشتی میزان مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی را تحت تأثیر قرار نداد (۳۷). افزودن سطوح مختلف اسیدسیتریک (۳ - ۱/۵ درصد) از طریق کاهش pH محتويات دستگاه گوارش منجر به کاهش سرعت عبور مواد مغذی از روده کوچک می‌شود که نتیجه آن کاهش مصرف خوراک است (۱۸). افزودن ۲۰ گرم اسید سیتریک بر کیلوگرم جیره منجر به کاهش معنی دار مصرف خوراک گردید (۱۲). در مقابل نتایج حاصل از این آزمایش و نتایج فوق گزارش شده است که استفاده از اسیداستیک، اسیدسیتریک و اسیدلاکتیک باعث افزایش میزان مصرف خوراک شد (۲). استفاده از ۰/۵ درصد اسید سیتریک منجر به افزایش مصرف خوراک در مقایسه با گروه شاهد شد (۱۵).

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی تأثیر معنی داری بر میانگین

روده کوچک، سبب بهبود رشد لاکتوباسیل‌ها شود (۶). مشاهده نتایج متفاوت حاصل از افروden اسیدی فایر به آب آشامیدنی و یا خوراک مصرفی در آزمایشات مختلف ممکن است متأثر از فرم اسیدی فایر، شرایط پرورش و تغذیه جوجه‌های گوشتی باشد (۲۳). اسیدی فایرهای تجاری موجود در بازار دارای شکل‌های مختلفی از جمله (اسید آزاد، نمک اسید، پوشش دار و یا بدون پوشش) می‌باشند (۵).

ایجاد فلور میکروبی طبیعی به وسیله حذف رقابتی و افزایش قابلیت هضم خوراک از اثرات مفید استفاده از پروپیوتیک‌ها می‌باشد (۷). گزارش شده است که استفاده از پروپیوتیک در جیره منغه‌های تخمگذار باعث کاهش باکتری‌های مضر و افزایش باکتری‌های لاکتوباسیلوس شد (۲۲). افروden باکتری‌های پروپیوتیکی گرم مثبت و گرم منفی به جیره جوجه‌های گوشتی اثر بسیار مثبتی بر فلور میکروبی روده کوچک آنها داشت و استفاده از این پروپیوتیک‌ها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک ویرجینیامايسین می‌تواند بیانگر جایگزینی مناسب آنها به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در جیره باشد (۲۱). البته در مقابل نتایج فوق گزارش شده است که سرکه پس از ورود به چینه دان به سرعت به آئیون و پروتون تفکیک شده و این شکل یونیزه به دلیل داشتن بار الکتریکی قادر به عبور از غشاء سلولی نبوده و نمی‌تواند اثر باکتری کشی خود را اعمال کند (۱۳). همچنین احتمال جذب اسیدهای آلی در روده کوچک نیز وجود دارد (۵).

به طور کلی نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد در شرایط تغذیه جوجه‌های گوشتی با جیره‌ای بر پایه ذرت و سویا افروden اسید آلی (سرکه) به آب آشامیدنی توانم با پروپیوتیک به خوراک مصرفی در دوره آغازین پرورش می‌تواند در بهبود جمعیت

گوارشی نداشت (جدول ۳). یکی از دلایل اصلی بروز عدم تأثیر حاصل از افروden اسیدی فایر به آب آشامیدنی یا خوراک مصرفی بر تغییر pH محتويات دستگاه گوارش، ظرفیت بافری محتويات دستگاه گوارش و شکل مولکولی اسیدی فایر است. اقلام خوراکی مورد استفاده در تغذیه طیور دارای ظرفیت بافری بالایی هستند در نتیجه مانع از تأثیر مورد انتظار اسیدی فایر مورد استفاده بر کاهش pH محتويات دستگاه گوارش می‌شود (۵). در صورت استفاده از اسیدی فایر به صورت آزاد و غیر پوشش دار احتمال دارد اسید در چینه دان و سنگدان پرنده یونیزه شود، که این را می‌توان به بالاتر بودن pH چینه دان نسبت به pK_a برخی از اسیدهای آلی (مثل اسید سرکه) نسبت داد (۱۳) همچنین احتمال جذب اسیدهای آلی در روده کوچک نیز وجود دارد (۲۵).

نتایج این آزمایش نشان داد که جمعیت لاکتوباسیلوس ایلئوم در پرنده‌گان تغذیه شده با جیره حاوی پروپیوتیک و یا آب آشامیدنی حاوی سرکه در مقایسه با پرنده‌گان تغذیه شده با جیره و آب فاقد مکمل به طور معنی‌دار بیشتر بود (جدول ۳). استفاده از اسید آلی ضمن مهار کردن رشد میکروب‌های مضر، شرایط تغذیه‌ای را به نفع باکتری‌های مفیدی، همچون لاکتوباسیلوس فراهم می‌کند (۳۵). برخی از محققین اثر افزودن پروپیوتیک به جیره مصرفی را بر جمعیت لاکتوباسیل محتويات ایلئوم و سکوم جوجه‌های گوشتی مثبت و معنی‌دار گزارش کردند (۲۸ و ۲۹). همچنین گزارش شده است که استفاده از $۰/۲$ و $۰/۴$ درصد اسید فوماریک و اسید پروپیونیک، باعث افزایش پرگنه‌های لاکتوباسیل به دست آمده از دستگاه گوارش جوجه‌ها در سنین ۲۴ و ۴۲ روزگی می‌شود (۱۹). افروden سرکه به جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند با کاستن pH محتويات

- 455.
7. Apata, D. F. (2008). Growth performance nutrient digestibility and immune response of broiler chicks feed diets supplemented with a culture of lactobacillus bulgaricus. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **88**:1253-1258.
 8. Aviagen. (2015). Ross 308: broiler nutrition specification. In H. Aviagen Inc., AL, (Ed.). USA.
 9. Baba, E., Fuller, A. L., Gilbert, J. M., Thayer, S. G., McDougald, L. R. (1992). Effects of *Eimeria brunetti* infection and dietary zinc on experimental induction of necrotic enteritis in broiler chickens. *Avian Disease* **36**: 59-62.
 10. Baurhoo, B., Ferket, P. R., Zhao, X. (2009). Effects of diets containing different concentrations of mannanoligosaccharide or antibiotics on growth performance, intestinal development, cecal and litter microbial populations, and carcass parameters of broilers. *Poultry Science* **88**: 2262-2272.
 11. Bieranski, J., Slizewska, K. (2009). The effect of a new probiotic preparation on the performance and fecal microflora of broiler chickens. *Veterinarni Medicina* **54**: 525-531.
 12. Brenes, A., Viveros, A., Arija, I., Centeno, C., Pizarro, M., Bravo, C. (2003). The effect of citric acid and microbial phytase on mineral utilization in broiler chicks. *Animal Feed Science and Technology* **110**: 201-219.
 13. Chaveerach, P., Keuzenkamp, D. A., Lipman, L. J., 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 changes. *Poultry science* **83**: 330-334.
 14. Chaves, A. V., Stanford, K., Dugan, M. E. R., Gibson, L. L., McAllister, T. A., Van Herk, F., et al. (2008). Effects of cinnamaldehyde, garlic and juniper berry essential oils on rumen fermentation, blood metabolites, growth performance, and carcass characteristics of growing lambs. *Journal of Livestock Science* **117**: 215-224.
 15. Chowdhury, R., Islam, K. M. S., Khan, M. J., Karim, M. R., Haque, M. N., Khatun, M. (2009). Effect of citric acid, avilamycin and

میکروبی مفید ایلثوم و راندمان تبدیل غذایی در جوجه‌های گوشتی مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله مؤلفین از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد و معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی که امکان اجرای این پژوهش را فراهم نمودند، قدردانی می‌نمایند.

منابع

1. Abdel-Azeem, F., El-Hommosany, Y. M., Nematallah, G. M. (2000). Effect of citric acid in diets with different starch and fiber levels on productive performance and some physiological traits of growing rabbits. *Egypt Journal Rabbit Science* **10**: 121-145.
2. Abdel-Fattah, S. A., El-Sanhoury, M. H., El-Mednay, N. M., Abdel-Azeem, F. (2008). Thyroid activity, some blood constituents, organs morphology and performance of broiler chicks fed supplemental organic acids. *International Journal of Poultry Science* **7**: 215-222.
3. Abdo, M., Zeinb, A. (2004). Efficacy of acetic acid in improving the utilization of low protein-low energy broiler diets. *Egypt Poultry Science* **24**: 123-141.
4. Akbari, M. R., Kermanshahi, H., Kalidari, G. A. (2004). Effect of acetic acid administration in drinking water on performance and growth characteristics and ileal microflora of broiler chickens. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* **3**: 139-147.
5. Allahdo, P., Zarghi, H. Kermanshahi, H. Edatati Dovom. M. R. (2017). Effect of Apple Vinegar Addition to the Drinking Water on Growth Performance, Ileal Lactobacillus Population, Digestive Chyme pH and Immune Response of Broiler Chickens. *Research on Animal Production* **8**:55-62.
6. Alp, M., Kocabagli, M., Kahraman, R., Bostan, K. (1999). Effect of dietary supplementation with organic acids and zinc bacitracin on ileal microflora, pH and performance in broilers. *Turkish journal of Veterinary and Animal Science* **23**: 451-



- (2004). Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics. Best practice & research. *Clinical Gastroenterology* **18**: 299-313.
25. Kamran, Z., Sarwar, M., Nisa, M., Nadeem, M. A., Ahmad, S., Mushtaq, T., et al. (2008). Effect of Lowering Dietary Protein with Constant Energy to Protein Ratio on Growth, Body Composition and Nutrient Utilization of Broiler Chicks. *Asian-Australian Journal of Animal Science* **21**: 1629-1634.
26. Leeson, S., Namkung, H., Antongiovanni, M., & Lee, E. H. (2005). Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poultry Science* **84**: 1418-1422.
27. Olnoon, C. G., Beski, S. S. M., Choct, M., Iji, P. A. (2015). Use of Lactobacillus johnsonii in broilers challenged with *Salmonella* sofia. *Animal Nutrition* **1**: 203-212.
28. Pascual, M., Hugas, M., Badiol, J., Monfort, J. M., Garriga, M. (1999). Lactobacillus salivarius CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *Applied Environ Microbiol* **65**: 4981-4986.
29. Patterson, J. A., Burkholder, K. M. (2003). Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Science* **82**: 627-631.
30. Rajmane, B. V. (2000). Efficacy of protexin on performance of broilers. *Parel Mumbai, Bombay Veterinary College, Born Veterinary* **14**: 542.
31. Reid, G., Friendship, R. (2002). Alternative to antibiotics use: Probiotic for the gut. *Animal Biology* **13**: 97-112.
32. Ricke, S. C. (2003). Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry Science*, **82**: 632-639.
33. Samli, H. E., Senkoylu, N., Koc, F., Kanter, M., Agma, A. (2007). Effects of Enterococcus faecium and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and microbiota. *Archives of Animal Nutrition* **61**: 42-49.
34. SAS. (2003). User's guide: Statistics (Version 9.1): S.A.S Institute Cary, NC.
35. Thompson, J. L., Hinton, M. (1997). Antibacterial activity of formic and their combination on the performance, tibia ash and immune status of broilers. *Poultry Science* **8**: 1616-1622.
16. Cole, C. B., Fuller, R., Newport, M. J. (1987). The effect of diluted yoghurt on the gut microbiology and growth of piglets. *Food Microbiology* **4**: 83-85.
17. Dierick, N. (1989). Biotechnology aids to improve feed and feed digestion: enzymes and fermentation. *Archives of Animal Nutrition* **39**: 241-261.
18. Ebrahimnezhad, Y., Maher-Sis, N., Aghajanzadeh-Golshani, A., Galekandi, J. G., M., S., Darvishi, A. (2012). Effects of combination of citric acid and microbial phytase on the serum concentration and digestibility of some minerals in broiler chicks. *Asian Journal of Animal Sciences* **6**: 189-195.
19. Garcia, V., Catala Gregori, P., Hernandez, F., Megias, M. D., Madrid, J. (2007). Effect of formic acid and plant extracts on growth, nutrient digestibility, intestine mucosa morphology, and meat yield of broilers. *The Journal of Applied Poultry Research* **16**: 555-562.
20. Green, A. A., Sainsbury, D. W. B. (2001). *The role of probiotic in producing quality poultry products*. Paper presented at the XV European Symposium on the quality of poultry meat. 9-12 september. Turkey: 245-251.
21. Hashemzadeh, F., Rahimi, S., Karimi-Torshizi, M. A., Masoudi, A. A. (2013). Effect of probiotics and antibiotic supplementation on serum biochemistry and intestinal microflora in broiler chicks. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* **5**: 2394-2398.
22. Hassanein, S. M., Soliman, N. K. (2010). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) adding to diets on intestinal microflora and performance of Hy-line layer hens. *American Journal of Science* **5**: 159-169.
23. Hernández, F., García, V., Madrid, J., Orengo, J., Catalá, P., Megias, M. D. (2006). Effect of formic acid on performance, digestibility, intestinal histomorphology and plasma metabolite levels of broiler chickens. *British Poultry Science* **47**: 50-56.
24. Isolauri, E., Salminen, S., Ouwehand, A. C.

- propionic acids in the diet of hens and salmonellas in the crop. *British Poultry Science* **38**:159-165.
36. Yoon, C., Na, C. S., Park, J. H., Han, S. K., Nam, Y. M., J.T., K. (2004). Effect of feeding multiple probiotics on performance and fecal noxious gas emission in broiler chicks. *Korean Journal of Poultry Science* **31**: 229-235.
37. Yu, B., Liu, J. R., Chiou, M. Y., Hsu, Y. R., Chiou, P. W. S. (2007). The effects of probiotic Lactobacillus reuteri Pg4 strain on intestinal characteristics and performance in broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Science* **20**: 1243-1251.

Archive of SID

Effect of Vinegar and Probiotics on Growth Performance, Chyme pH and Lactobacillus Population of very Young Broiler Chicks

Allahdo, P.¹, Zarghi, H.^{2,*}, Kermanshahi, H.³, Edalatian Dovom, M.R.⁴

1. MSc graduated, Department of Animal Science, faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2. Assistant professor, Department of Animal Science, faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

3. Professors, Department of Animal Science, faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

4. Assistant professor, Department of Food Science Industry, faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

Received Date: 4 June 2016

Accepted Date: 4 January 2018

Abstract: This experiment was carried out to evaluate the effects of adding vinegar to drinking water (DW) and probiotic to starter diet (SD) on growth performance, gastrointestinal tract (GIT) contents pH, and ileal lactobacillus population of broiler chicks. A total of 330 one-day-old male Ross-308 broiler chicks were used in a completely randomized design (CRD) experiment consisted of 6 treatments with factorial arrangement 2×3 and 5 replicates of 11b each. Treatments consisted of 2 levels of adding probiotic zero and $0.1\% \text{ "1} \times 10^{10} \text{ CFU lactic acid/g of supplement"}$ to SD and 3 levels of adding vinegar zero, 1 and 2% “5% acetic acid concentration” to DW. A corn-soybean meal based diet was formulated to meet the nutrient levels suggested by Ross-308 (2015). The study lasted from 1-10d of age. At the 10th day of age's one bird from each experimental unit (5 for each treatment) were randomly selected and were slaughtered for evaluation GIT content pH, and ileal lactobacillus population. In the birds were fed supplemented diet with probiotic combination drunk supplemented water with 1 and 2% vinegar levels feed intake (FI) and feed conversion ratio (FCR) were significantly lower than birds fed diet and drunk water without any supplementation. In the birds were fed supplemented diet with probiotic and or were drunk supplemented water with vinegar, ileal lactobacillus population were significantly higher than birds fed diet and drunk water without any supplementation. The addition vinegar to DW and probiotic to SD, and their interaction effects were not significant on the pH of GIT contents. In conclusion, drinking water supplementation with vinegar and or starter diet supplementation with probiotic will improved ileal benefit microbial flora and feed efficiency of broiler chicks.

Keywords: Acetic acid, Broiler chickens, Probiotic

*Corresponding author: Zarghi, H.

Address: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Tel: +985138805745

Email: h.zarghi@um.ac.ir