تولیدات دامی
دوره ۲۱ ■ شماره ۴ ■ زمستان ۱۳۹۸
صفحه‌های ۵۳۱-۵۲۱

اثرات اسانس گیاهی ریزپوشانی‌شده زنیان بر عملکرد رشد و جمعیت میکروبی روده جوجه‌های گوشتی

طاهره مرصادی ثابت‌کردمحله[۱]، مازیار محیطی اصلی[۲*]، حسن درمانی کوهی[۲]
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
۲. دانشیار، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۰۲/۱۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۵/۱۵

چکیده

این آزمایش به‌منظور بررسی اثرات افزودن سطوح مختلف اسانس آزاد و پوشش‌دارشده گیاه زنیان در جیره جوجه‌های گوشتی بر عملکرد رشد و جمعیت میکروبی برخی باکتری‌های ایلئوم با استفاده از ۳۲۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل ۴×۲ با دو نحوه فرآوری اسانس (آزاد و پوشش‌دار) و چهار سطح اسانس در جیره (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) انجام شد. صفات عملکردی در طول آزمایش و وزن اندام‌های گوارشی و جمعیت میکروبی ایلئوم در ۴۲ روزگی اندازه‌گیری شدند. جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی اسانس پوشش‌دار زنیان در سن یک تا ۲۱ روزگی افزایش وزن روزانه بیش‌تر و ضریب تبدیل کم‌تری نسبت به آنهایی که اسانس آزاد دریافت نمودند، داشتند (P<۰/۰۵). بیش‌ترین وزن نسبی کبد متعلق به جوجه‌هایی تغذیه شده با اسانس پوشش‌دار بود (P<۰/۰۵). اثر متقابل بین نحوه فرآوری اسانس و سطح اسانس در جیره بر شمار اشریشیاکولای معنی‌دار بود (P<۰/۰۵). نتیجه‌گیری کلی این‌که، استفاده از اسانس پوشش‌دارشده زنیان سبب بهبود افزایش وزن روزانه و ضریب تبدیل خوراک در سه هفته ابتدای پرورش و بهبود در جمعیت میکروبی روده و شاخص تولید اروپایی در کل دوره پرورش شد.

کلیدواژه‌ها: اسانس زنیان، جوجه گوشتی، ریزپوشانی، عملکرد، میکروفلور روده.

Effects of microencapsulated Ajowan essential oil on growth performance and intestinal microflora of broilers

Tahereh Mersadi-Sabet-Kordmahale[1], Maziar Mohiti-Asli[2*], Hassan Darmani-Kuhi[2]
1. Former M.Sc. Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
2. Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture Science, University of Guilan, Rasht, Iran.
Received: May 3, 2019 Accepted: August 6, 2019

Abstract

This experiment was carried out to investigate the effect of different inclusion levels of free and microencapsulated essential oil of Ajowan (EOA) herb in broilers diet on growth performance and some ileal bacteria population. A total of 320 one-day-old chicks were distributed in a completely randomized design with 2×4 factorial arrangement. The dietary factors were 2 different forms of EOA (free and encapsulated) and 4 dietary inclusion levels of EOA (0, 50, 100 and 150 mg/kg). Growth performance parameters were recorded throughout the experiment, and intestinal organs weight and ileal microbial population were measured on 42 day of age. Broilers fed encapsulated EOA in diet had higher body weight gain and lower feed conversion ratio during 1 to 21 day of age than those fed free EOA (P<0.05). Higher relative weight of liver (% of live weight) was achieved in broilers fed diets supplemented with encapsulated EOA (P<0.05). There was a significant interaction between the form and dietary levels of EOA on *E. coli* count (P<0.05). As a general conclusion, use of encapsulated EOA led to an improvement in body weight gain, FCR, and European Production Index, in the first three weeks of growth and in the whole period of growth phase, respectively.

Keywords: Ajowan essential oil, broiler, encapsulation, intestinal microflora, performance.

* نویسنده مسئول Email: mmohiti@guilan.ac.ir

مقدمه

اصطلاح فیتوژنیک به پودر خشک گیاه، عصاره‌ها، اسانس‌ها و یا الئورزین‌های گیاهی اطلاق می‌شود. استفاده از ترکیبات با منشأ گیاهی به‌دلیل نقش بالقوه آنها به‌عنوان جایگزین آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد، اخیراً در تغذیه طیور افزایش یافته است [۲۴]. نتایج پژوهش‌ها حاکی از آن است که استفاده از گیاهان دارویی و مشتقات آن‌ها سبب افزایش عملکرد جوجه‌های گوشتی و بهبود سلامت دستگاه گوارش می‌شود [۱۰]. خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی و ترکیبات آنها در شرایط آزمایشگاهی علیه بسیاری از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت بررسی شده است. باکتری‌های گرم منفی درمقایسه با باکتری‌های گرم مثبت به‌دلیل دارابودن غشای لیپوپلی‌ساکاریدی، مقاومت بیش‌تری نسبت به اسانس‌های گیاهی دارند [۳].

آزمایش‌های پیشین درخصوص کاربرد اسانس‌های گیاهی، در بسیاری از موارد نتایج متناقضی را بر مصرف خوراک، عملکرد رشد و میکروفلور روده نشان داده‌اند. استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌صورت آزاد و با غلظت بالا در جیره سبب عدم خوش‌خوراکی و کاهش مصرف خوراک در طیور می‌گردد. اسانس‌های گیاهی و ترکیبات فعال آنها به سرعت تحت تأثیر شرایط محیطی از قبیل اکسیژن، نور، رطوبت و pH تجزیه شده و فعالیت زیستی خود را از دست می‌دهند. بنابراین، برای بررسی اثرات محصولات گیاهی در شرایط استاندارد، استفاده از روش‌های پوشش‌دارکردن ترکیبات زیست‌فعال، راه‌کاری مناسب به‌نظر می‌رسد [۲۴]. امروزه پژوهش‌های بسیاری در زمینه پوشش‌دارکردن اسانس‌های گیاهی توسط پلیمرها به‌منظور محافظت از این ترکیبات در برابر شرایط محیط و بهبود خصوصیات ضدمیکروبی آن‌ها در حال انجام است. پوشش‌های خوراکی می‌توانند از پلی‌ساکاریدها، پروتئین‌ها، چربی‌ها و یا مخلوطی از این ترکیبات تشکیل شوند. آلژینات پلیمری طبیعی است که به‌عنوان سدی در مقابل انتقال اکسیژن عمل کرده و سبب جلوگیری از رشد باکتری‌های هوازی و به‌تأخیرانداختن اکسیداسیون لیپیدها می‌شود [۲۳]. مطالعات اندکی درخصوص افزودن اسانس گیاهی ریزپوشانی‌شده به جیره جوجه‌های گوشتی و مقایسه آن با اسانس آزاد منتشر شده است. بنابراین، این پژوهش با هدف بررسی اثر اسانس ریزپوشانی‌شده زنیان در ماتریس آلژینات کلسیم بر عملکرد رشد و میکروفلور روده جوجه‌های گوشتی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از ۳۲۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه راس ۳۰۸ (مخلوط دو جنس نر و ماده) در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۴ با دو روش فرآوری اسانس (آزاد و پوشش‌دار) و چهار سطح افزودن اسانس به جیره (صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم در کیلوگرم) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار و ۱۰ پرنده در هر تکرار استفاده شد. جوجه‌های گوشتی در واحدهای آزمایشی (۰/۶۶ مترمربع فضای مفید به‌جز فضای اشغال‌شده توسط آبخوری و دانخوری) روی بستری از تراشه‌های چوب به‌مدت ۴۲ روز پرورش یافتند. جیره‌های آزمایشی براساس احتیاجات گزارش‌شده توسط راهنمای تغذیه جوجه گوشتی راس ۳۰۸ متوازن شدند [۱۹]. اجزا و ترکیبات جیره‌های غذایی پایه مورداستفاده در دوره پرورش در جدول ۱ نشان داده شده است. اسانس گیاهی زنیان به‌وسیله دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی (GC/MS, Thermoquest, San Jose, USA) تجزیه شد و مقدار تیمول آن ۵۱/۰۹ درصد شناسایی شد. به‌طور خلاصه، جهت ریزپوشانی اسانس، ابتدا ظرفیت بارگیری اسانس در غلظت نیم تا دو درصد آلژینات سدیم بررسی شد، سپس اسانس زنیان در پوششی از هیدروژل

زیست‌سازگار آلژینات کلسیم به‌صورت میکروکپسوله تهیه شد [۴] و در نهایت ریزدانه‌های آلژینات- اسانس با استفاده از یک صافی جمع‌آوری و سپس با آب مقطر آب‌کشی و روی کاغذ خشک شدند.

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی

مواد خوراکی (درصد)	آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی)	رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی)	پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)
دانه ذرت	۵۴/۰۴	۵۷/۷۲	۶۲/۶۶
کنجاله سویا	۳۹/۰۸	۳۵/۲۳	۳۰/۰۲
روغن گیاهی	۲/۳۳	۲/۹۲	۳/۵۲
دی کلسیم فسفات	۲/۰۳	۱/۷۳	۱/۵۲
کربنات کلسیم	۱/۰۴	۰/۹۲	۰/۸۵
کلرید سدیم	۰/۲۳	۰/۲۹	۰/۲۸
بیکربنات سدیم	۰/۱۵	۰/۱۰	۰/۱۲
پیش مخلوط ویتامینی[۱]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
پیش مخلوط معدنی[۲]	۰/۲۵	۰/۲۵	۰/۲۵
ال- لایزین منوهیدروکلراید ۷۸ درصد	۰/۲۱	۰/۱۸	۰/۱۷
دی ال- متیونین ۹۹ درصد	۰/۳۰	۰/۲۸	۰/۲۵
ال- ترئونین ۹۸ درصد	۰/۰۹	۰/۰۸	۰/۰۷
ضدکوکسیدیوز	۰	۰/۰۵	۰/۰۵
ترکیبات شیمیایی محاسبه‌شده			
انرژی قابل متابولیسم (کیلوکالری بر کیلوگرم)	۲۸۷۰	۳۰۰۰	۳۱۰۰
پروتئین خام (درصد)	۲۲/۰۰	۲۰/۸۱	۱۸/۸۹
آرژنین قابل هضم (درصد)	۱/۳۷	۱/۲۱	۱/۰۸
لیزین قابل هضم (درصد)	۱/۳۴	۱/۱۳	۱/۰۰
متیونین قابل هضم (درصد)	۰/۶۳	۰/۵۷	۰/۵۲
متیونین + سیستین قابل هضم (درصد)	۰/۹۹	۰/۸۵	۰/۷۸
ترئونین قابل هضم (درصد)	۰/۸۲	۰/۷۵	۰/۶۷
کلسیم (درصد)	۰/۹۶	۰/۸۷	۰/۷۸
فسفر قابل دسترس (درصد)	۰/۴۸	۰/۴۴	۰/۳۹
سدیم (درصد)	۰/۱۵	۰/۱۶	۰/۱۶
کلر (درصد)	۰/۲۲	۰/۲۴	۰/۲۴

۱. مکمل ویتامینی در هر کیلوگرم جیره ۹۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین‌المللی ویتامین D_3، ۱۸ واحد بین‌المللی ویتامین E، ۲ میلی‌گرم ویتامین K_3، ۱/۸ میلی‌گرم B_1، ۶/۶ میلی‌گرم B_2، ۳۰ میلی‌گرم B_3، ۱۰ میلی‌گرم ویتامین B_5، ۳ میلی‌گرم B_6، ۱ میلی‌گرم B_9، ۰/۰۱۵ میلی‌گرم B_{12}، ۰/۰۱ میلی‌گرم ویتامین H_2، ۵۰۰ میلی‌گرم کولین و ۱ میلی‌گرم آنتی‌اکسیدان تأمین می‌نمود.

۲. مکمل معدنی در هر کیلوگرم جیره مقدار ۵۰ میلی‌گرم آهن، ۱۰۰ میلی‌گرم منگنز، ۸۵ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم مس، ۱ میلی‌گرم ید و ۰/۲ میلی‌گرم سلنیوم تأمین می‌نمود.

حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس گیاهی برای باکتری‌های *اشریشیا کولای*، *کلی‌فرم* و *لاکتوباسیلوس* توسط روش استاندارد میکرودایلوشن مایع تعیین شد [۲۵]. برای این منظور، سریال رقت 10^{-1} تا 10^{-8} از اسانس خالص زنیان در دی‌متیل‌سولفیداکساید (DMSO) پنج درصد تهیه شد (برای هر باکتری سه تکرار قرار داده شد). مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر رقت در درون چاهک‌های ۹۶ خانه‌ای الایزای حاوی ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون باکتریایی نیم مک‌فارلند و ۵۰ میکرولیتر محیط MHB اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ تا ۷۲ ساعت برای باکتری موردنظر گرم‌خانه‌گذاری شدند. میکروپلیت‌ها با دستگاه الایزا بررسی شدند و کم‌ترین غلظت اسانس که در آن رشد قابل‌مشاهده‌ای براساس کدورت مشاهده نگردید، به‌عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی در نظر گرفته شد.

شاخص‌های عملکردی شامل وزن بدن، خوراک مصرفی، ضریب تبدیل خوراک به‌طور هفتگی و تلفات به‌طور روزانه برای هر گروه اندازه‌گیری، ثبت و به‌صورت دوره‌ای محاسبه شدند. در پایان آزمایش، شاخص کارایی اروپایی نیز با استفاده از فرمول وزن بدن (کیلوگرم) × درصد ماندگاری × ۱۰۰ / ضریب تبدیل خوراک × سن کشتار (روز)، محاسبه شد [۱۳]. در ۴۲ روزگی، دو قطعه جوجه از هر تکرار که تقریباً وزنی نزدیک به وزن میانگین آن واحد آزمایشی داشتند، انتخاب و ذبح شدند و وزن زنده، وزن کبد، سنگدان، پیش‌معده و پانکراس با ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۱ گرم اندازه‌گیری شدند. جهت تعیین جمعیت میکروبی ایلئوم، در ۴۲ روزگی دو قطعه جوجه گوشتی از هر تکرار با وزنی نزدیک به میانگین آن تکرار، انتخاب و ذبح شدند و حدود دو گرم از محتویات ایلئوم به داخل میکروتیوب‌های استریل تخلیه و برای بررسی جمعیت اشرشیا کولای و لاکتوباسیلوس و کلی‌فرم در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان کشت میکروبی ذخیره شدند.

نمونه‌ها پس از خارج‌شدن از فریزر به‌مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه یخ‌گشایی شدند و یک گرم نمونه از ایلئوم هر پرنده در لوله آزمایش حاوی نه میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (PBS) ریخته شد و به‌مدت سه دقیقه ورتکس شد، سپس رقیق‌سازی تا 10^{-4} تکرار شد. جهت کشت نمونه‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر از هریک از سری‌های رقت 10^{-4}، 10^{-3}، 10^{-2} برداشته و روی پلیت‌های حاوی محیط کشت ریخته و با آنس کاملاً در سطح محیط کشت پخش شد. نمونه‌های مربوط به باکتری *اشریشیا کولای* و *کلی‌فرم‌ها* به‌مدت ۴۸ ساعت در۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباسیون شد و نمونه‌های مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس* به‌مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی در انکوباتور قرار گرفتند. پس از انکوباسیون تعداد کلنی‌ها مورد شمارش قرار گرفتند و سپس کلنی‌های مربوط به هر پلیت در فاکتور رقت (معکوس ضریب رقت) ضرب و به‌عنوان شمار CFU در یک گرم نمونه منظور شد و در نهایت داده‌های CFU به شکل Log_{10} گزارش شدند.

اثرات اصلی نحوه فرآوری اسانس (آزاد و پوشش‌دار) و سطوح مختلف افزودن اسانس به جیره و اثر متقابل این فاکتورها با استفاده از میانگین حداقل مربعات رویه GLM نرم‌افزار آماری SAS (نسخه ۹/۲) [۲۲] برای رابطه ۱ تجزیه شد و میانگین‌ها توسط آزمون توکی در سطح پنج درصد مقایسه شدند.

$$Y_{ijk} = \mu + P_i + L_j + (PL)_{ij} + e_{ijk} \quad \text{رابطه ۱)}$$

که در این رابطه، Y_{ijk}، مقدار هر مشاهده؛ μ، میانگین کل؛ P_i، اثر نحوه‌ی فرآوری اسانس؛ L_j، اثر سطوح افزودن اسانس به جیره جوجه‌های گوشتی؛ $(PL)_{ij}$، اثر متقابل فرآوری اسانس و سطح افزودن اسانس به جیره و e_{ijkl}، اثر خطای آزمایشی است.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس در (جدول ۲) نشان داده شده است. پژوهش‌گران پیشین نشان دادند که اسانس زنیان فعالیت ضدمیکروبی قوی را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *باسیلوس سابتیلیس* (MIC=۰/۰۰۰۲۵٪) دارد و حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس زنیان علیه *اشریشیا کولای* ۰/۰۰۰۵ درصد اعلام شده است [۲۳]. همبستگی مثبت بالایی بین فعالیت ضدباکتریایی و محتوای فنلی ترکیبات گیاهی وجود دارد [۶]. لذا می‌توان فعالیت ضدمیکروبی اسانس زنیان را عمدتاً مربوط به حضور تیمول دانست. باکتری‌های گرم منفی معمولاً در مقایسه با باکتری‌های گرم مثبت نسبت به اسانس‌ها مقاوم‌ترند [۳]. گزارش شده است که حداقل غلظت مهارکنندگی تیمول و کارواکرول برای باکتری اشریشیا کولای به‌ترتیب ۰/۱۸۷ و ۰/۳۷۵ میکروگرم در میلی‌لیتر است [۵].

جدول ۲. حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) اسانس زنیان برای برخی باکتری‌های روده (میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

باکتری	اشریشیا کولای	کلی‌فرم‌ها	لاکتوباسیلوس‌ها
MIC	۱/۱۱۳	۱/۱۱۳	۰/۱۱۱۳

اگرچه خواص ضدباکتریایی اسانس‌های گیاهی در شرایط برون‌تنی موردآزمایش قرارگرفته است اما به‌نظر می‌رسد نتایج آنها با اثرات اسانس‌ها در شرایط درون‌تنی سازگار نیست. به‌طوری‌که هر دو اثر بهبودیافتن و عدم تغییر جمعیت میکروبی روده در حیوانات تک‌معده‌ای گزارش شده است [۲]. بنابراین، ممکن است نتایجی که در مطالعات آزمایشگاهی به‌دست می‌آید دقیقاً با آن‌چه که در بدن موجود زنده اتفاق می‌افتد، منطبق نباشد. به‌همین دلیل پژوهش‌گران باید مراقب باشند تا نتایج بررسی‌های آزمایشگاهی را کاملاً به موجود زنده تعمیم ندهند، زیرا ممکن است سبب نتیجه‌گیری اشتباه در مورد اثرات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی در حیوانات و سیستم‌های زیستی شود. ارزیابی دقیق و صحیح اثر ضدمیکروبی گیاهان دارویی و اسانس‌ها در شرایط درون‌تنی به‌دلیل جمعیت‌های بسیار پیچیده و تعادل میکروبی دستگاه گوارش و اثر متقابل اجزای فعال گیاهان دارویی و مشتقات آنها با سایر مواد مغذی، مشکل است [۱].

افزودن سطوح مختلف اسانس زنیان به جیره جوجه‌های گوشتی اثر معنی‌داری بر هیچ‌کدام از صفات عملکرد رشد نداشت ($P<۰/۰۵$، جدول ۳). جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی اسانس پوشش‌دار زنیان در سن یک تا ۲۱ روزگی افزایش وزن روزانه بیش‌تر (۳۰/۹ در برابر ۲۷/۳ گرم در روز؛ $P<۰/۰۵$) و ضریب تبدیل کم‌تری (۱/۴۸ در برابر ۱/۶۶؛ $P<۰/۰۵$) نسبت به جوجه‌های تغذیه‌شده با اسانس آزاد زنیان داشتند. ضریب تبدیل خوراک در کل دوره پرورش در جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره حاوی اسانس پوشش‌دار زنیان در مقایسه با جوجه‌های دریافت‌کننده اسانس آزاد زنیان تمایل به معنی‌داری داشت (۱/۷۴ در برابر ۱/۸۴؛ $P=۰/۰۶$). شاخص تولید اروپایی به‌طور معنی‌داری در جوجه‌های دریافت‌کننده اسانس زنیان پوشش‌دار بالاتر از آنهایی که با اسانس آزاد تغذیه شدند، بود (۳۱۳/۷ در برابر ۲۸۲/۵؛ $P<۰/۰۵$).

اغلب مطالعات تغییری در مصرف خوراک جوجه‌های گوشتی با استفاده از افزودنی‌های گیاهی یا اسانس مشاهده نکردند، اگرچه در برخی موارد نیز افزایش رشد و بهبود ضریب تبدیل خوراک مشاهده شد [۶]. گیاهان دارویی تنها در مقادیر خاصی قادرند برای بهبود مصرف خوراک استفاده شوند و کاربرد ترکیبات گیاهی در سطوح بالا ممکن است به‌دلیل بوی تند مواد آروماتیک مصرف خوراک طیور را کاهش دهد [۱۵]. در مطالعه‌ای که اخیراً

منتشر شده است بهترین ضریب تبدیل خوراک در جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با سطوح یک درصد دانه گشنیز و یک درصد دانه زنیان به‌دست آمد [۱]. در پژوهشی دیگر، استفاده از مخلوط اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن، لیمو و زنیان اثری بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی نداشت [۲۱].

جدول ۳. اثر سطوح مختلف اسانس آزاد و پوشش‌دار بر افزایش وزن روزانه، مصرف خوراک روزانه، ضریب تبدیل خوراک و شاخص تولید اروپایی در جوجه‌های گوشتی

		۱ تا ۲۱ روزگی			۲۲ تا ۴۲ روزگی			۱ تا ۴۲ روزگی			
منابع تغییرات		افزایش وزن روزانه (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل	افزایش وزن روزانه (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل	افزایش وزن روزانه (گرم)	مصرف خوراک روزانه (گرم)	ضریب تبدیل	شاخص تولید اروپایی
نحوه فرآوری	**سطح**										
آزاد	۰	۲۷/۹	۴۳/۰	۱/۵۷	۷۶/۱	۱۴۳/۴	۱/۸۹	۵۲/۰	۹۳/۲	۱/۸۰	۲۸۶/۳
	۵۰	۲۷/۶	۴۴/۹	۱/۶۳	۷۴/۵	۱۴۸/۱	۱/۹۹	۵۱/۱	۹۴/۳	۱/۸۵	۲۸۲/۸
	۱۰۰	۲۷/۶	۴۴/۹	۱/۶۷	۷۶/۰	۱۴۳/۵	۱/۹۰	۵۱/۸	۹۳/۴	۱/۸۲	۲۹۵/۰
	۱۵۰	۲۶/۲	۴۶/۱	۱/۷۶	۷۲/۸	۱۳۹/۰	۱/۹۲	۴۸/۸	۹۱/۷	۱/۸۹	۲۶۵/۹
پوشش‌دار	۰	۳۲/۱	۴۶/۴	۱/۴۸	۷۷/۳	۱۴۰/۳	۱/۸۳	۵۴/۷	۹۳/۲	۱/۷۲	۳۰۲/۵
	۵۰	۳۰/۲	۴۴/۷	۱/۴۸	۷۸/۴	۱۴۴/۰	۱/۸۴	۵۴/۳	۹۴/۳	۱/۷۴	۳۱۸/۷
	۱۰۰	۳۲/۲	۴۱/۴	۱/۳۰	۷۹/۱	۱۴۲/۱	۱/۸۰	۵۵/۶	۹۱/۱	۱/۶۴	۳۴۶/۴
	۱۵۰	۲۹/۳	۴۷/۹	۱/۶۷	۷۴/۵	۱۴۶/۰	۱/۹۷	۵۱/۹	۹۵/۹	۱/۸۶	۲۸۷/۴
SEM		۱/۹۷	۱/۹۰	۰/۱۱۶	۲/۵۲	۲/۶۲	۰/۰۷۵	۲/۰۶	۱/۲۵	۰/۰۷۱۶	۱۹/۴۹
نحوه فرآوری											
اسانس آزاد		^{b}۲۷/۳	۴۴/۷	^{a}۱/۶۶	۷۴/۹	۱۴۳/۵	۱/۹۳	^{b}۵۰/۹	۹۳/۱	۱/۸۴	^{b}۲۸۲/۵
اسانس پوشش‌دار		^{a}۳۰/۹	۴۵/۱	^{b}۱/۴۸	۷۷/۳	۱۴۳/۱	۱/۸۶	^{a}۵۴/۱	۹۳/۶	۱/۷۴	^{a}۳۱۳/۷
SEM		۰/۹۸	۰/۹۵	۰/۰۵۸	۱/۲۶	۱/۳۱	۰/۰۳۷	۱/۰۳	۰/۶۲	۰/۰۳۶	۹/۷۴
سطح اسانس (میلی‌گرم در کیلوگرم)											
صفر		۳۰/۰	۴۴/۷	۱/۵۲	۷۶/۷	۱۴۱/۹	۱/۸۶	۵۳/۴	۹۳/۲	۱/۷۶	۲۹۴/۴
۵۰		۲۸/۹	۴۴/۸	۱/۵۶	۷۶/۴	۱۴۶/۱	۱/۹۲	۵۲/۷	۹۴/۳	۱/۸۰	۳۰۰/۸
۱۰۰		۲۹/۹	۴۳/۱	۱/۴۸	۷۷/۶	۱۴۲/۸	۱/۸۵	۵۳/۷	۹۵/۳	۱/۷۳	۳۲۰/۷
۱۵۰		۲۷/۷	۴۷/۰	۱/۷۲	۷۳/۷	۱۴۲/۵	۱/۹۴	۵۰/۴	۹۳/۸	۱/۸۷	۲۷۶/۶
SEM		۱/۳۹	۱/۳۵	۰/۰۸۲	۱/۷۸	۱/۸۵	۰/۰۵۳	۱/۴۵	۰/۸۸	۰/۰۵۰	۱۳/۷۸
نوع اثر		***P*-value**									
نحوه فرآوری		۰/۰۱۶	۰/۷۵۶	۰/۰۴۴	۰/۱۸۲	۰/۸۳۵	۰/۲۱۴	۰/۰۳۸	۰/۵۸۹	۰/۰۶۱	۰/۰۳۳
سطح اسانس		۰/۶۳۸	۰/۲۶۹	۰/۲۲۸	۰/۴۵۴	۰/۳۸۵	۰/۵۷۰	۰/۳۷۶	۰/۴۲۶	۰/۲۴۰	۰/۱۸۶
فرآوری×سطح		۰/۹۵۱	۰/۳۲۱	۰/۵۹۴	۰/۹۴۷	۰/۱۶۴	۰/۵۸۲	۰/۹۹۵	۰/۰۹۶	۰/۷۵۱	۰/۸۰۴

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (*P*<۰/۰۵). SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با جیره حاوی افزودنی فیتوژنیک پوشش‌دارشده ضریب تبدیل خوراک کم‌تری نسبت به تیمارهای شاهد و بدون پوشش داشتند [۱۱]. وزن جوجه‌ها در ۴۲ روزگی و افزایش وزن بدن به‌طورکلی از روز یک تا ۴۲ در تیمار پوشش‌دارشده بیش‌تر از جوجه‌های تیمار شاهد گزارش شد. افزودن ۱۰۰ میلی‌گرم ترکیبات پوشش‌دارشده کارواکرول، تیمول و لیمونن در هر کیلوگرم جیره سبب بهبود عملکرد رشد و هم‌چنین قابلیت هضم ظاهری ایلئومی مواد مغذی در جوجه‌های گوشتی شد که احتمالاً به‌دلیل بهبود ترشح آنزیم‌های گوارشی بوده است [۱۱]. جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با مخلوط اسانس‌های پوشش‌دارشده سیر و *فیلانتوس نیروری* عملکرد رشد بهتری داشتند، این مسأله ممکن است نشان دهد که پوشش‌دار کردن می‌تواند از آلیسین، اسانس و فلاونوئید کل محافظت کند [۱۷]. عملکرد بهتر اسانس‌های پوشش‌دار را می‌توان به‌دلیل افزایش پایداری و ماندگاری اسانس‌ها دانست. زیرا پوشش‌دارکردن با کاهش اکسیداسیون، تبخیر و یا حتی اثرات متقابل با سایر اجزای موجود در محصول نهایی، از اسانس‌ها محافظت می‌کند [۸].

نتایج مربوط به وزن نسبی برخی اندام‌های داخلی در (جدول ۴) نشان داده شده است. اثر متقابل نحوه فرآوری و سطح افزودن اسانس به جیره در مورد درصد وزن کبد معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$) و جوجه‌های گوشتی تغذیه‌شده با سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم اسانس پوشش‌دار زنیان بیش‌ترین درصد وزن کبد را داشتند. وزن نسبی پیش‌معده، سنگدان و پانکراس تحت تأثیر نحوه فرآوری و سطح افزودن اسانس قرار نگرفت. برخی پژوهش‌گران با افزودن تیمول و کارواکرول (ماده مؤثره زنیان) به‌مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم جیره جوجه‌های گوشتی، تفاوتی در وزن نسبی کبد در مقایسه با شاهد مشاهده نکردند [۱۵]. در مطالعه‌ای دیگر، افزودن سطوح یک و دو درصد دانه زنیان به جیره اثری بر وزن کبد نداشت [۱]. با این وجود، وزن سنگدان و پیش‌معده با افزودن دو درصد دانه زنیان افزایش یافت [۱]. افزایش وزن سنگدان و کبد می‌تواند هضم فیزیکی خوراک در سنگدان و ترشح صفرا را افزایش دهد که هضم مواد مغذی را بهبود می‌دهد.

نتایج مربوط به اثر سطوح مختلف اسانس زنیان آزاد و پوشش‌دارشده بر باکتری‌های ایلئوم جوجه‌های گوشتی در (جدول ۵) نشان داده شده است. شمار باکتری‌های اشریشیا کولای و کلی‌فرم‌ها در ایلئوم جوجه‌های تغذیه‌شده با جیره‌های حاوی اسانس زنیان پوشش‌دار کم‌تر از آنهایی بود که جیره‌های حاوی اسانس آزاد را دریافت نمودند ($P<۰/۰۵$). هم‌چنین با افزایش سطح اسانس زنیان در جیره‌ها کاهش معنی‌داری در شمار باکتری‌های اشریشیاکولای و کلی‌فرم در ایلئوم مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). اثر متقابل بین نحوه فرآوری اسانس و سطح اسانس در جیره بر شمار اشریشیاکولای معنی‌دار بود ($P<۰/۰۵$). به‌طوری‌که افزایش سطح اسانس پوشش-دارشده در جیره در مقایسه با اسانس آزاد، با شیب تندتری شمار اشریشیاکولای در ایلئوم را کاهش داد. سطوح ۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم اسانس آزاد زنیان در هر کیلوگرم جیره در مقایسه با شاهد و سطح ۵۰ میلی‌گرم آن سبب کاهش شمار باکتری اشریشیاکولای در ایلئوم شدند، درحالی‌که حتی سطح ۵۰ میلی‌گرم اسانس پوشش‌دار نیز مانند سطوح بالاتر آن سبب کاهش شمار این باکتری شد. تفاوت معنی‌داری در شمار لاکتوباسیلوس‌های ایلئوم با افزودن سطوح مختلف اسانس آزاد یا پوشش‌دار مشاهده نشد ($P< ۰/۰۵$).

اسانس زنیان می‌تواند مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش مانند اشریشیاکولای و سالمونلا تیفیموریوم شود [۹]. در آزمایشی دیگر، کم‌ترین شمار

کلنی کلی‌فرم‌ها در جوجه‌های تغذیه‌شده با ۳۵۰ میلی‌گرم عصاره زنیان در کیلوگرم جیره مشاهده شد [۷]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزودن ۱۰۰ یا ۱۵۰ میلی‌گرم اسانس زنیان در کیلوگرم جیره سبب کاهش جمعیت اشریشیاکولای در ایلئوم شد که با بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی همراه بود. ترکیبات فیتوژنیک سبب تعدیل ترکیب فلور سکومی با کاهش کلی‌فرم‌ها و تقویت میکروفلورای مفید روده مانند لاکتوباسیل می‌شوند [۲۰]. در آزمایش حاضر، مصرف جیره حاوی اسانس زنیان پوشش‌دارشده با آلژینات سبب کاهش شمار باکتری‌های اشریشیاکولای و کلی‌فرم‌ها در ایلئوم شد. این نتیجه با یافته‌های سایر پژوهش‌گران که نشان دادند تیمارهای با پوشش آلژینات‌کلسیم سبب کاهش تعداد باکتری‌ها نسبت به تیمارهای بدون پوشش شدند، مطابقت دارد [۱۶].

جدول ۴. اثر سطوح مختلف اسانس آزاد و پوشش‌دار بر وزن نسبی برخی اندام‌های داخلی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی (درصد وزن زنده)

منابع تغییرات		کبد	پیش معده	سنگدان	پانکراس
نحوه فرآوری	سطح				
آزاد	۰	۲/۳۵^{abc}	۰/۴۲	۱/۶۱	۰/۲۷
	۵۰	۲/۲۲^{bc}	۰/۴۴	۱/۶۳	۰/۲۸
	۱۰۰	۲/۳۵^{abc}	۰/۴۰	۱/۵۷	۰/۲۹
	۱۵۰	۲/۱۷^{c}	۰/۴۰	۱/۵۴	۰/۳۰
پوشش‌دار	۰	۲/۱۹^{bc}	۰/۴۲	۱/۵۴	۰/۲۵
	۵۰	۲/۶۷^{ab}	۰/۴۰	۱/۴۹	۰/۲۹
	۱۰۰	۲/۶۸^{a}	۰/۴۱	۱/۵۰	۰/۳۱
	۱۵۰	۲/۷۶^{a}	۰/۴۱	۱/۶۱	۰/۳۰
SEM		۰/۰۸۹	۰/۰۲۶	۰/۰۵۹	۰/۰۱۶
نحوه فرآوری					
اسانس آزاد		۲/۲۷^{b}	۰/۴۱	۱/۵۹	۰/۲۸
اسانس پوشش‌دار		۲/۵۳^{a}	۰/۴۱	۱/۵۴	۰/۲۹
SEM		۰/۰۴۵	۰/۰۱۳	۰/۰۳۰	۰/۰۰۸
سطح اسانس (میلی‌گرم در کیلوگرم)					
صفر		۲/۳۷^{b}	۰/۴۲	۱/۵۷	۰/۲۶
۵۰		۲/۴۰^{ab}	۰/۴۲	۱/۵۶	۰/۲۹
۱۰۰		۲/۵۲^{a}	۰/۴۱	۱/۵۳	۰/۳۰
۱۵۰		۲/۴۱^{ab}	۰/۴۱	۱/۵۸	۰/۳۰
SEM		۰/۰۶۳	۰/۰۱۸	۰/۰۴۲	۰/۰۱۲
نوع اثر			(*P*-value)		
نحوه فرآوری		۰/۰۰۰۱	۰/۹۰۶	۰/۲۲۲	۰/۶۶۷
سطح اسانس		۰/۰۵۹	۰/۹۲۲	۰/۸۸۶	۰/۰۸۲
فرآوری × سطح		۰/۰۰۴	۰/۶۷۹	۰/۳۶۳	۰/۶۹۰

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است (*P*<۰/۰۵). SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

تیمول، کارواکرول و پاراسیمن از اجزای اصلی تشکیل‌دهنده اسانس گیاه زنیان هستند که فعالیت ضدمیکروبی زنیان به این ترکیبات مربوط است [۱۲]. تیمول و کارواکرول سبب برهم‌زدن یکپارچگی غشای سلول باکتری می‌شوند و بر هموستازی pH و تعادل یون‌ها تأثیر می‌گذارد که در نهایت سبب مرگ باکتری می‌شود. به‌طورکلی، خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها به ترکیبات فنلی که دارای حلقه فنیل با یک گروه هیدروکسیل هستند، نسبت داده می‌شود. اغلب اسانس‌های گیاهی اثر ضدمیکروبی خود را با آسیب‌رساندن به دیواره سلولی باکتری‌ها، تغییر ساختار و انعقاد پروتئین‌ها اعمال می‌کنند. اسانس‌ها ترکیبات آب‌گریز با وزن مولکولی کم هستند که می‌توانند در غشای لیپیدی باکتری نفوذ کنند و عملکرد غشا را تغییر دهند [۳]. دیواره باکتری‌های گرم منفی دارای لایه لیپوپلی‌ساکاریدی است که آب‌دوست بوده و مانع نفوذپذیری مواد هیدروفوبیک مانند اسانس‌ها می‌شود. به‌همین دلیل در شرایط آزمایشگاهی، اغلب باکتری‌های گرم منفی به اثر ضدمیکروبی اسانس‌ها مقاوم بوده‌اند. علاوه بر انتقال یون‌ها از طریق غشای پلاسمایی، گروه هیدروکسیل نیز در غیرفعال‌کردن آنزیم‌های باکتریایی مؤثر است [۳].

جدول ۵. اثر سطوح مختلف اسانس آزاد و پوشش‌دار بر جمعیت برخی باکتری‌های ایلئوم (Log_{10} CFU/g) جوجه‌های گوشتی

منابع تغییرات		اشریشیاکولای	کلی‌فرم‌ها	لاکتوباسیلوس‌ها
نحوه فرآوری	سطح			
آزاد	۰	۵/۱۴[a]	۵/۲۶	۵/۲۷
	۵۰	۵/۰۶[a]	۴/۷۴	۵/۲۹
	۱۰۰	۴/۶۸[b]	۴/۶۶	۵/۳۲
	۱۵۰	۴/۶۷[b]	۴/۶۵	۵/۳۲
پوشش‌دار	۰	۵/۱۰[a]	۵/۰۴	۵/۲۹
	۵۰	۴/۷۲[b]	۴/۷۲	۵/۳۳
	۱۰۰	۴/۶۷[b]	۴/۶۴	۵/۳۵
	۱۵۰	۴/۵۷[b]	۴/۵۷	۵/۳۶
SEM		۰/۰۵۰	۰/۰۴۳	۰/۰۳۹
نحوه فرآوری				
اسانس آزاد		۴/۸۹[a]	۴/۸۳[a]	۵/۳۰
اسانس پوشش‌دار		۴/۷۷[b]	۴/۷۴[b]	۵/۳۳
SEM		۰/۰۲۵	۰/۰۲۱	۰/۰۱۹
سطح اسانس (میلی‌گرم در کیلوگرم)				
صفر		۵/۱۲[a]	۵/۱۵[a]	۵/۲۸
۵۰		۴/۸۹[b]	۴/۷۳[b]	۵/۳۱
۱۰۰		۴/۶۸[c]	۴/۶۵[bc]	۵/۳۳
۱۵۰		۴/۶۲[c]	۴/۶۱[c]	۵/۳۴
SEM		۰/۰۳۵	۰/۰۳۰	۰/۰۲۷
نوع اثر		*P*-value		
نحوه فرآوری		۰/۰۰۱	۰/۰۰۸	۰/۲۸۰
سطح اسانس		۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۴۰۴
فرآوری × سطح		۰/۰۰۶	۰/۰۶۳	۰/۹۸۵

a-c: تفاوت میانگین‌ها با حروف متفاوت در هر ستون معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). SEM: خطای استاندارد میانگین‌ها.

تیمول و ایزومر کارواکرول آن که در گیاهانی مانند زنیان، آویشن و پونه یافت می‌شوند به‌عنوان فنل‌های مونوترپن طبقه‌بندی شده‌اند و اثرات ضدمیکروبی آنها را در شرایط آزمایشگاهی اثبات شده است [۱۸]. اسانس و عصاره برخی از گیاهان خانواده نعناییان با درصد کارواکرول و تیمول بالا، اثر بیش‌تری بر میکروب‌ها دارند. نشان داده شده است که آویشن، با واسطه مواد زیست‌فعالی نظیر تیمول و کارواکرول، سبب کاهش تعداد باکتری‌های هوازی (کلی‌فرم‌ها) در چینه‌دان، ژژنوم و روده بزرگ می‌شود [۱]. کاهش تعداد کلی‌فرم‌ها در پرندگان تغذیه‌شده با اسانس آویشن یا ترکیبی از اسانس‌ها شامل تیمول گزارش شده است [۱۴]. بنابراین، افزودن ترکیبات گیاهی به جیره غذایی می‌تواند بر شمار میکروارگانیسم‌های روده اثر بگذارد. اگرچه ترکیب شیمیایی مشتقات گیاهی برای دستیابی به اثرات مطلوب مهم است، پیش‌بینی شده است که خواص ضدمیکروبی اسانس‌ها در پرندگان می‌تواند تحت تأثیر جیره غذایی پایه و شرایط محیطی قرار گیرد. هرچند اثرات اسانس‌های گیاهی تا حدی به مهار باکتری‌های بیماریزا مربوط است، تحریک ترشح آنزیم‌های گوارشی به‌وسیله اسانس‌ها نیز می‌تواند قابلیت هضم خوراک را افزایش دهد و تعادل میکروب‌های روده را به‌طور غیرمستقیم تنظیم کند.

نتیجه‌گیری کلی این‌که، پوشش‌دارکردن اسانس‌های گیاهی می‌تواند به‌عنوان راه‌کاری مؤثر و کاربردی برای حفاظت از ترکیبات فعال و ارزشمند آن‌ها مدنظر قرار گیرد. ضمن این‌که، پوشش‌دارکردن اسانس‌های گیاهی می‌تواند سبب کاهش سطح موردنیاز آن‌ها در جیره برای بهبود میکروفلورای روده و عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی شود.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

منابع

1. Alitaneh, S, Afzali N, Sarir H and NaeimiPour H (2016) Screening for effects of different levels of ajowan (*Carum copticum* L.) and coriander (*Coriandrum sativum* L.) seeds on performance and carcass characteristics of Ross broiler chickens. Research on Animal Production, 7(14): 32-21.
2. Brenesa A and Rourab E (2010) Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. Animal Feed Science and Technology, 158: 1-14.
3. Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. International Journal of Food Microbiology, 94: 223-253.
4. Dima C, Gitin L, Alexe P and Dima S (2013) Encapsulation of coriander essential oil in alginate and alginate/chitosan microspheres by emulsification external gelation method. Inside Food Symposium, 9: 1-6.
5. Du E, Gan L, Li Z, Wang W, Liu D and Guo Y (2015) In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. Animal Science and Biotechnology, 6(58): 1-12.
6. Franz C, Baserb KHC and Windischc W (2009) Essential oils and aromatic plants in animal feeding–a European perspective. A review. Flavour and Fragrance Journal, 25: 327-340.
7. Gangeh, MR and Salarmoini M (2015) Effect of powder and hydroalcoholic extract of *Carum copticum* in comparision to growth promoters Virginiamycin antibiotic on performance, blood metabolites, intestinal morphology and meat quality of broiler chicks. Iranian Journal of Animal Science, 46(3): 289-299.
8. Gortzi O, Lalas S, Chinou I and Tsaknis J (2006) Reevaluation of antimicrobial and antioxidant activity of *Thymus spp*. extracts before and after encapsulation in liposomes. Journal of Food Protection, 69(12): 2998-3005.
9. Goudarzi GhR, Saharkhiz MJ, Sattari M and Zomorodian K (2011) Antibacterial activity and chemical composition of Ajowan (*Carum copticum* Benth. & Hook) essential oil. Journal of Agricultural Science and Technology, 13: 203-208.
10. Grashorn MA (2010) Use of phytobiotics in broiler nutrition–an alternative to infeed antibiotics? Journal of Animal and Feed Sciences, 19: 338-347.

11. Hafeez A, Manner K, Schieder C and Zentek J (2015) Effect of supplementation of phytogenic feed additives (powdered *vs.* encapsulated) on performance and nutrient digestibility in broiler chickens. Poultry Science, 95(3): 622-629.
12. Hashemipour H, Kermanshahi H, Golian A, Raji A and Van Krimpen MM (2013) Effect of Thymol + Carvacrol by next enhance 150® on intestinal development of broiler chickens fed CMC containing diet. Iranian Journal of Applied Animal Science, 3(3): 567-576.
13. Huff GR, Huff WE, Jalukar S, Oppy J, Rath NC and Packialakshmi B (2013) The effects of yeast feed supplementation on turkey performance and pathogen colonization in a transport stress/*Escherichia coli* challenge. Poultry Science, 92(3): 655-662.
14. Jang IS, Ko YH, Kang SY and Lee CY (2007) Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. Animal Feed Science and Technology, 134: 304-315.
15. Lee KW, Everts H, Kappert HJ, Frehner M, Losa R and Beynen AC (2003) Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. British Poultry Science, 44(3): 450-457.
16. Lu F, Liu D, Ye X, Wei Y and Liu F (2009) Alginate–calcium coating incorporating nisin and EDTAmaintains the quality of fresh northern snakehead (*Channa argus*) fillets stored at 4°C. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 848-854.
17. Natsir MH, Hartutik OS, and Widodo E (2013) Effect of either powder or encapsulated form of garlic and *Phyllanthus niruri* L. mixture on broiler performances, intestinal characteristics and intestinal microflora. International Journal of Poultry Science, 12(11): 676-680.
18. Ouwehand AC, Tiihonen K, Kettunen H, Peuranen S, Schulze H and Rautonen N (2010) In vitro effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. Veterinarni Medicina, 55(2): 71-78.
19. Ross Broilers Manual (2012) Ross 308 broiler nutrition manual. Ross Broiler Ltd., Newbridge, Midlothian, UK.
20. Sadek KM, Ahmed HA, Ayoub M and Elsabagh M (2014) Evaluation of Digestarom and thyme as phytogenic feed additives for broiler chickens. European Poultry Science, 78: 1-12.
21. Samadian F, Zeinoaldini S, Towhidi A, Karimi-Torshizi MA, Ansari-Pirasarei Z and Gholamzadeh P (2013) Evaluation of some phytogenic feed additives in growing chicks diet. International Journal of Agriculture, 3(1): 35-43.
22. SAS Institute (2002) SAS statistics user's guide. Version 9.2. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.
23. SongY, Liu L, Shen H, You J and Luo Y (2011) Effect of sodium alginate-based edible coating containing different anti-oxidants on quality and shelf life of refrigerated bream (*Megalobrama amblycephala*). Food Control, 22: 608-615.
24. Steiner T (2010) Phytogenics in animal nutrition: natural concepts to optimize gut health and performance. Nottingham University Press.
25. Wiegand I, Hilpert K and Hancock REW (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nature Protocols, 3(2): 163-175.