

# نشریه علوم دامی

(پژوهش و سازندگی)

شماره ۱۰۶، بهار ۱۳۹۴  
صص: ۲۱۹~۲۳۰

## بررسی تأثیر استفاده از سرکه و آنزیم فیتاز بر عملکرد و سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی

• نسیبه محمدباقری (نویسنده مسئول)

کارشناسی ارشد تغذیه دام و طیور گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.

• رامین نجفی

استادیار گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه.

تاریخ دریافت: آبان ۹۲      تاریخ پذیرش: اسفند ۹۲

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۹۳۵۸۶۳۴۹۸۹

Email: n.mohammadbagheri@gmail.com

### چکیده

مطالعه حاضر جهت بررسی اثرات مکمل‌سازی سرکه، آنزیم فیتاز و اثرات متقابل آن‌ها بر عملکرد، چربی‌های خون، سیستم ایمنی و برخی ویژگی‌های لاشه جوجه‌های گوشتی انجام شد. برای این منظور، تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه سویه راس ۳۰۸ د در یک آزمایش فاکتوریل ۲×۲ در قالب طرح کاملاً تصادفی، با چهار تیمار آزمایشی، پنج تکرار و ۱۲ قطعه جوجه در هر تکرار تا ۴۲ روزگی پرورش داده شدند. جیره‌های آزمایشی حاوی سرکه انگور (صفر و ۲ درصد) و آنزیم فیتاز (صفر و ۵۰۰ واحد فعال آنزیم در هر کیلوگرم از جیره) بودند. نتایج نشان دادند که استفاده از سطح دو درصد سرکه در تمامی دوره‌های آزمایشی منجر به افزایش معنی دار مصرف خوراک و افزایش وزن بدن شد ( $p < 0.05$ ). همچنین استفاده از سرکه در دو هفته اول پرورش، ضریب تبدیل خوراک را افزایش داد ( $p < 0.05$ ) در حالی که در همین دوره زمانی، آنزیم فیتاز باعث بهبود ضریب تبدیل خوراک شد ( $p < 0.05$ ). سرکه باعث کاهش سطوح کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL و VLDL سرم شد ( $p < 0.05$ ). همچنین ترکیب سرکه و آنزیم فیتاز سطح تری‌گلیسرید و VLDL سرم را کاهش دادند ( $p < 0.05$ ) در حالی که آنزیم فیتاز به تنها تأثیری بر چربی‌های خون نداشت ( $p > 0.05$ ).

سرکه همچنین منجر به افزایش وزن نسبی بورس و طحال شد ( $p < 0.05$ ) و افزودن آنزیم فیتاز نیز وزن نسبی بورس را افزایش داد ( $p < 0.05$ ). آنزیم فیتاز باعث افزایش میزان چربی محوطه بطی گردید ( $p < 0.05$ ) در حالی که سرکه تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات لاشه نداشت ( $p > 0.05$ ). در کل، نتایج نشان دادند که استفاده از سطح دو درصد سرکه در جیره منجر به بهبود پارامترهای رشدی و کاهش چربی‌های مضر سرم خونی جوجه‌های گوشتی گردید.

**واژه‌های کلیدی:** سرکه، آنزیم فیتاز، عملکرد، جوجه‌های گوشتی.

Animal Science Journal (Pajouhesh &amp; Sazandegi) No 106 pp: 219-230

**The Effect of Vinegar and Phytase on Performance and Immune System of Broiler Chickens**By: Nasibe Mohammadbagheri<sup>1\*</sup>, Ramin Najafi<sup>2</sup><sup>1</sup> MSc Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran<sup>2</sup> Asistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Iran

\*Corresponding author: n.mohammadbagheri@gmail.com, tel: +989358634989

**Received: November 2013****Accepted: February 2014**

The present study was conducted to evaluate the effect of vinegar and phytase supplementation on performance, blood lipids, immune system and some carcass characteristics of broiler chickens. For this purpose 240 one-day old male broiler chicks were divided in a  $2 \times 2$  factorial experiment based on completely randomized design with 4 treatments, 5 replicates and 12 chicks in each and reared throughout 42 day production. The experimental basal diets included vinegar (0 and 2%) and phytase enzyme (0 and 500 U phytase/kg of feed). Results indicated that use of 2 percentage of vinegar increased the feed consumption and body weight gain in Total experimental period ( $p < 0.05$ ). Vinegar increased the feed conversion ratio from 0 to 14 d of age ( $P < 0.05$ ) whereas phytase was significantly improved the feed conversion ratio from 0 to 14 d of age ( $P < 0.05$ ). Vinegar decreased the cholesterol, triglyceride, LDL and VLDL levels in blood serum ( $p < 0.05$ ). Combine the vinegar and phytase decreased the triglyceride and VLDL levels in blood serum ( $p < 0.05$ ) whereas, phytase alone didn't have any effect on blood lipids ( $p > 0.05$ ). Also result showed that vinegar increased the relative weight of bursa and spleen ( $p < 0.05$ ) and phytase increased the relative weight of bursa ( $p < 0.05$ ). Phytase increased the abdominal fat ( $p < 0.05$ ) while vinegar didn't have any effect on carcass characteristics ( $p > 0.05$ ). In conclusion, results showed that use of 2 percentage of vinegar improved the performance and decreased the harmful lipids in blood serum in broilers.

**Key words:** Vinegar, Phytase Enzyme, Performance, Broiler chicken.

**مقدمه**

افزایش حساسیت حیوان نسبت به برخی از عوامل بیماری‌زا گردد. باکتری‌ها می‌توانند نسبت به هر گونه آنتی‌بیوتیکی که بر ضد آنها استفاده شود، مقاوم گردند (Murry, 1991) و می‌توانند این مقاومت را از طریق ژنتیکی و پلاسمیدی به باکتری‌های نسل بعد انتقال دهند. همزمان با ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های غیردرمانی، یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های این صنعت، یافتن جایگزین یا جایگزین‌هایی مناسب برای این افزودنی است تا ضمن تأمین گوشاهی از نیازهای بالا و رو به رشد طیور با سلامتی انسان مغایرتی نداشته باشد.

در طی چند دهه گذشته، استفاده از اسیدهای آلی به منظور کاهش میکروگانیسم‌های بیماری‌زا (به دنبال وجود ارتباط نزدیک بین تغذیه و سلامت تولیدات دامی و به دنبال آن سلامت انسان‌ها) مرسوم شده است (Griggs, and Jacob, 2005).

هنگامی که اسیدهای آلی در جیره طیور استفاده می‌شوند از طریق افزایش اسیدیته مواد هضمی دستگاه گوارش باعث بهبود هضم

امروزه، پرورش طیور به عنوان یکی از بزرگترین منابع تأمین کننده پروتئین حیوانی جای خود را در جهان باز کرده است. صنعت طیور علاوه بر تأمین اسیدهای آمینه ضروری مورد نیاز انسان، از نظر اقتصادی به دلیل بازگشت سریع سرمایه و بازده غذایی بالا از Qadyanloo, Rahimi, (and Karimi Torshizi, 2009)

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها برای حفظ جمعیت میکروبی روده و کاهش رشد برخی از باکتری‌های بیماری‌زا مطلوب به نظر می‌رسد، همچنین این مواد رشد و ضربیت تبدیل خوراک را بهبود می‌بخشنند (Gunal, Yayli, Kaya, ; Ricke, 2003 ; Karahan, and Sulak, 2006).

از سوی دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها باعث افزایش تولید گوشت و استفاده از انرژی می‌شوند. اما به نظر می‌رسد استفاده زیاد از این ترکیبات در جیره غذایی حیوانات چندان مناسب نباشد چون این مواد فلور طبیعی روده را تغییر می‌دهند که ممکن است سبب

فیتاز بر عملکرد، چربی‌های خون، سیستم ایمنی و ویژگی‌های لشه جوجه‌های گوشتی صورت گرفته، مطالعه حاضر طراحی و اجرا گردید.

## مواد و روش‌ها

این آزمایش در مزرعه تحقیقاتی گروه علوم دامی دانشگاه ارومیه انجام شد. برای این منظور، تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه گوشتی نر یک روزه سویه راس ۳۰۸ در آزمایش فاکتوریل  $2 \times 2$  با دو سطح سرکه طبیعی انگور (۰ و ۲ درصد) و دو سطح آنزیم فیتاز (۰ و ۵۰ واحد فعال آنزیم در هر کیلوگرم از جیره) در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار آزمایشی، پنج تکرار و تعداد ۱۲ قطعه جوجه در هر تکرار تا ۴۲ روزگی پرورش داده شدند.

در هر یک از واحدهای آزمایشی، از آخوری پستانکی و دانخوری تراف استفاده شد و از تراشه‌های چوب به عنوان بستر استفاده گردید. دمای سالن در روز اول پرورش، ۳۲ درجه سانتی-گراد بود. سپس به تدریج کاهش یافت تا اینکه در ۴۲ روزگی به ۲۱ درجه سانتی گراد رسید. سیکل روشنایی در روز اول به صورت ۲۴ ساعت روشنایی بود و بعد از آن تا انتهای دوره به صورت ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی در شبانه روز ثبیت گردید. رطوبت نسبی سالن بین ۵۰ تا ۶۰ درصد متغیر بود. جوجه‌ها از صفر تا ۱۰ روزگی جیره آغازین، از ۱۱ تا ۲۴ روزگی جیره رشد و از ۲۵ تا ۴۲ روزگی جیره نهایی را بر اساس توصیه‌های راهنمای پرورش راس ۳۰۸ (Broiler nutrition specification, 2007)، دریافت کردند.

سرکه انگور استفاده شده در آزمایش حاضر به صورت تخمیر شده و با درصد خلوص ۶/۸ درصد اسید استیک بود و فیتاز مورد استفاده با نام تجاری ناتافوس محصولی از میکرووار گانیسم آسپرژیلوس نیجر بود که یک گرم از آن حاوی حداقل ۱۰۰۰۰ واحد فعال آنزیم (FTU<sup>۱</sup>) می‌باشد.

میزان مصرف آنزیم مطابق با دوز پیشنهادی شرکت سازنده در نظر گرفته شد (۲۰۰ گرم آنزیم فیتاز در یک تن جیره). در تمام دوره، دسترسی به آب و خوراک آزاد بود. در طول دوره پرورش، تمام

مواد غذی شده و قادرند از رشد میکرووار گانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری کنند (Ricke, 2003). همچنین تغذیه پرنده‌گان با اسیدهای آلی دارای اثرات مشتی از جمله بهبود ضریب تبدیل خوراک، بهبود رشد و افزایش جذب مواد معدنی می‌باشد (Abdel-Fattah, EI-Mednay, and Abdul-Azeem, 2008).

اسیدهای آلی (که بیشتر برای نگهداری و محافظت خوراک از تخریب میکروبی و قارچی استفاده می‌شوند) با اسیدی کردن بیشتر محیط روده موجب مهار باکتری‌های روده‌ای (که با میزان در دریافت مواد غذی رقابت می‌کنند) شده و در نهایت باعث بهبود Rotter, Friesen, Guenter, and Marllet, 1990 افزایش وزن حیوان می‌شوند (آنچه دریگر وظایف اسیدهای آلی، تحریک مصرف خوراک از طریق خوشخوراک نمودن آن، کاهش تولید آمونیاک و سایر متابولیت‌های میکروبی، کاهش دهنده رشد و افزایش قابلیت هضم و جذب پروتئین و انرژی به واسطه کاهش رقابت‌های میکروبی با میزان برای مواد غذایی Van Immerseel, Smet, De Buck, Meulemans, Haesebrouck, and Ducatelle, 2002).

فیتات، منبع اصلی ذخیره فسفات در دانه گیاهان است. فیتات موجود در جیره موجب افزایش دفع آمینواسیدهای درونزادی در جوجه‌های گوشتی می‌گردد که این تأثیر منفی از طریق مکمل سازی خوراک با آنزیم فیتاز تصحیح می‌گردد (Issa, Aydin, Pekel, demirel, and Patterson, 2010).

همچنین از آنجایی که حیوانات تک معده‌ای قادر آنزیم فیتاز در سیستم گوارشی خود هستند یا فعالیت فیتازی آنها بسیار پایین می‌باشد، قادر به استفاده از فسفر موجود در ساختار فیتات نمی‌باشند بنابراین به منظور افزایش جذب فسفات موجود در جیره غذایی و کاهش آلدگی فسفات در محیط، آنزیم فیتاز به جیره غذایی حیوانات تک معده‌ای از قبیل خوک، پرنده‌گان و ماهی‌ها افروزده می‌شود (Reddy, Sathe, and Salunkhe, 1982). از آنجا که مطالعات اندکی در مورد اثرات مکمل‌سازی سرکه و آنزیم

<sup>۱</sup> Phytase Unit

جهت تعیین مقدار آنتی بادی علیه آنتی ژن ویروس نیوکاسل از تست مهار آگلوتیناسیون (HI) استفاده شد (Snyder, Marquadt, Mallinson, Savage, and Allen, 1984). همچنین در روز کشتار، اندام‌های لنفوئیدی (بورس فابریسیوس، تیموس و طحال) برای بررسی وضعیت ایمنی با دقت جداسازی و توزین شدن.

### تجزیه آماری

نتایج بدست آمده از این آزمایش با استفاده از یک مدل آماری که در برگیرنده اثر سرکه، آنزیم فیتاژ و اثر متقابل بین آنها بود با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (۲۰۰۵) و رویه GLM تجزیه و تحلیل شدند. میانگین صفات مورد مطالعه در صورت معنی‌دار بودن با آزمون توکی و در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

### نتایج و بحث

نتایج حاصل از تأثیر سطوح مختلف سرکه، آنزیم فیتاژ و اثرات متقابل آنها بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در جدول ۲ ارائه شده است. نتایج نشان دادند که استفاده از سطح دو درصد سرکه در تمام دوره‌های آزمایشی منجر به افزایش مصرف خوراک شد ( $p < 0.05$ ) به طوری که تیمارهای دریافت کننده سرکه نسبت به تیمارهای فاقد آن مصرف خوراک بیشتری داشتند. به نظر می‌رسد این امر به این دلیل باشد که افزودن سرکه به دان آردی منجر به افزایش خوشخوارکی و بهبود مخلوط شدن ریز اقلام جیره شده است که در نتیجه آن مصرف خوراک افزایش یافته است.

گروه‌ها جیره‌های یکسانی بر پایه گندم-ذرت-سویا دریافت نمودند. تیمارهای آزمایشی به ترتیب شامل:

- ۱- جیره شاهد (گندم-ذرت-سویا)، ۲- جیره شاهد+دو درصد سرکه-۳- جیره شاهد+آنزیم فیتاژ، ۴- جیره شاهد+دو درصد سرکه+آنزیم فیتاژ بودند.

برای تحریک سیستم ایمنی به منظور سنتز آنتی بادی علیه آنتی ژن ویروس نیوکاسل جهت ارزیابی تأثیر تیمارهای مختلف بر ایمنی هومولال پرنده‌گان، تمام جوجه‌های مورد آزمایش در روزهای یازدهم و بیست و سوم با استفاده از واکسن لاسوتا (واکسن زنده بیماری نیوکاسل) به روش قطره چشمی واکسینه شدند. برای بررسی عملکرد پرنده‌گان، میانگین مصرف خوراک و میانگین افزایش وزن بدن به طور هفتگی در طول دوره آزمایش اندازه-گیری و ضریب تبدیل خوراک محاسبه شد. در روز ۴۲ پرورش، تعداد یک پرنده از هر تکرار به طور تصادفی انتخاب و کشتار شدند تا خصوصیات لاشه شامل وزن لاشه، وزن سینه، وزن ران و وزن چربی محوطه بطنی تعیین گردد.

جهت تهیه نمونه‌های سرم از تعداد سه پرنده از هر تکرار در روز ۴۲ پرورش، خون گیری انجام شد و با استفاده از دستگاه سانتریفوژ با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه سرم نمونه‌ها جداسازی گردید، نمونه‌های سرم تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به صورت فریز نگهداری شدند. جهت ارزیابی چربی‌های خون، مقادیر کلسترول، تری‌گلیسرید، LDL، HDL و VLDL نمونه‌های سرم مطابق دستورالعمل کیت‌های زیست‌شیمی با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر (Unica 12, Japan) اندازه‌گیری شدند.

### جدول شماره ۱- ترکیب جیره آزمایشی (%)

اجزای جیره	جیره آغازین (۱۰- روزگی)	جیره رشد (۱۱-۲۴ روزگی)	جیره پایانی (۲۵-۴۲ روزگی)
ذرت	۴۱/۹۰	۴۲/۴۹	۴۰
گندم	۱۴/۰۶	۲۰	۲۵
کنجاله سویا	۳۷/۵	۳۱/۲۰	۲۸/۱۵
روغن سویا	۲/۲	۲/۵۰	۳/۲
سنگ آهک	۱	۰/۸	۰/۸
دی کلسیم فسفات	۲/۲	۲	۱/۸
- متیونین دی ال	۰/۱۸	۰/۱۵	۰/۱۵
لیزین هیدرو کلرايد	۰/۱۶	۰/۰۶	۰/۱
مکمل ویتامینی و معدنی	۰/۵	۰/۵۰	۰/۵
نمک	۰/۳	۰/۳۰	۰/۳

ترکیبات محاسبه شده (%):

انرژی قابل متابولیسم (کیلو کالری / کیلو گرم)	۲۸۶۰	۲۹۵۰	۳۰۲۰
پروتئین خام	۲۱/۲۳	۱۹/۰۵	۱۸
کلسیم	۰/۹۶	۰/۸۴	۰/۷۹
فسفر قابل دسترس	۰/۴۷	۰/۴۳	۰/۳۹
متیونین	۰/۴۹	۰/۴۴	۰/۴۲
لیزین	۱/۲۸	۱/۰۶	۱/۰۲

مقادیر ویتامین ها در هر کیلو گرم جیره: ۹۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین A، ۲۰۰۰ واحد بین المللی ویتامین D<sub>۳</sub>، ۱۸ واحد بین المللی ویتامین E، ۲ میلی گرم ویتامین K<sub>۳</sub>، ۱/۸ میلی گرم ویتامین C، ۶/۶ میلی گرم ریبوفلاوین، ۳۰ میلی گرم نیاسین، ۳ میلی گرم پیریدوکسین، ۱ میلی گرم اسید فولیک، ۱۵ میلی گرم ویتامین B<sub>۱۲</sub>، ۰/۱ میلی گرم بیوتین، ۵۰۰ میلی گرم کولین کلرايد، ۱۰۰ میلی گرم اتوکسی کوئین.

مکمل معدنی در هر کیلو گرم جیره: ۱۰۰ میلی گرم منگنز، ۵۰ میلی گرم آهن، ۱۰ میلی گرم روی، ۱۰ میلی گرم مس، ۱ میلی گرم ید، ۰/۲ میلی گرم سلنیوم، ۱۰۰ میلی گرم آنتی اکسیدان.

## جدول ۲- تأثیر سرکه، آنزیم فیتاز و اثر متقابل آن‌ها بر عملکرد جوجه‌های گوشتی

تیمارها	صرف خوراک (گرم)								
	۲۹-۴۲	۱۵-۲۸	(۰-۱۴)	۲۹-۴۲	۱۵-۲۸	(۰-۱۴)	۲۹-۴۲	۱۵-۲۸	(۰-۱۴)
سرکه (%)									
A1	۱/۹۲	۱/۵۳	۱/۲۵ <sup>b</sup>	۱۱۶۳ <sup>b</sup>	۸۴۰ <sup>b</sup>	۳۵۰	۲۲۳۴ <sup>b</sup>	۱۲۹۱ <sup>b</sup>	۴۴۰ <sup>b</sup>
A2	۱/۸۸	۱/۵۵	۱/۲۷ <sup>a</sup>	۱۲۸۷ <sup>a</sup>	۸۸۸ <sup>a</sup>	۳۶۱	۲۴۱۸ <sup>a</sup>	۱۳۸۴ <sup>a</sup>	۴۶۰ <sup>a</sup>
فیتاز (FTU)									
B1	۱/۸۹	۱/۵۳	۱/۲۸ <sup>a</sup>	۱۲۴۸	۸۷۷	۳۵۲	۲۳۶۲	۱۳۴۷	۴۵۴
B2	۱/۹۱	۱/۵۶	۱/۲۴ <sup>b</sup>	۱۱۹۸	۸۵۱	۳۵۹	۲۲۹۰	۱۳۲۸	۴۴۶
Pooled SEM	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۰۰۹	۴۰	۱۵	۴/۷	۳۹	۱۹	۶
سطح احتمال									
سرکه	۰/۴۵	۰/۳۴	۰/۰۳	۰/۰۱	۰/۰۳	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۱
آنزیم فیتاز	۰/۱۲	۰/۴۲	۰/۰۲	۰/۶۷	۰/۷۵	۰/۷۴	۰/۶۸	۰/۵۷	۰/۱۲
سرکه × فیتاز	۰/۱۹	۰/۴۵	۰/۲۳	۰/۷۵	۰/۰۵	۰/۰۸	۰/۹۶	۰/۰۶	۰/۰۸

<sup>a,b</sup> آندیس‌های نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ ).

A1 و A2: سرکه صفر و دو درصد B1 و B2: آنزیم فیتاز صفر و ۵۰۰ واحد

بدست آمده در مطالعه حاضر، استفاده همزمان از سرکه و آنزیم فیتاز در جیره در مقایسه با استفاده از آنزیم فیتاز به تنها بی‌صرف خوراک و وزن بدن را افزایش داد هر چند این نتایج از لحظه آماری معنی‌دار نبودند ( $p > 0.05$ ). چگونگی اثرات متقابل بین اسیدهای آلی و آنزیم فیتاز کاملاً مشخص نیست، ولی Han, Roneker, Pond and Lei (1998) در سال ۱۹۹۸ گزارش کردند که احتمال دارد اسیدهای آلی با اسیدی کردن جیره و مواد هضمی، محیط بهتری را از لحظه pH برای عمل فیتاز فراهم نمایند. همچنین Ravindran, Selle, and Bryden (1999) گزارش کردند که فعالیت آنزیم فیتاز با غلظت یون  $H^+$  و کاتیون‌های آزاد مرتبط می‌باشد. بنابراین، استفاده از آنزیم فیتاز در جیره جوجه‌های گوشتی به همراه اسید آلی ممکن است با افزایش قابلیت هضم مواد معدنی کیلات شده با اسید فیتیک Nourmohammadi, Hosseini, Saraee, and Arab, (2011) و با افزایش آزادسازی مواد مغذی مورد نیاز برای رشد، منجر به بهبود صفات عملکردی جوجه‌های گوشتی گردد. نتایج

از سوی دیگر افزودن سرکه منجر به افزایش وزن جوجه‌های گوشتی در تمام دوره‌های آزمایش گردید ( $p < 0.05$ ). به نظر می‌رسد از آنجا که سرکه منجر به افزایش مصرف خوراک در هر سه دوره شده است، همین عامل دلیل افزایش وزن مشاهده شده می‌باشد. همچنین، با توجه به این که سرکه مورد استفاده در تحقیق حاضر سرکه طبیعی بود، علاوه بر اسید استیک دارای مواد مغذی دیگری از جمله ویتامین‌ها، نمک‌های معدنی، آمینواسیدها و اسیدهای آلی همچون اسید سیتریک، اسید مالیک، اسید تارتاریک، اسید لاکتیک و غیره می‌باشد Johnston and Gas, 2006) که به این ترتیب از طریق فراهم سازی مواد مغذی مورد نیاز، می‌تواند در بهبود صفات مورد بررسی تحت تأثیر سرکه مؤثر باشد. نتایج مطالعات متعددی نشان دادند که استیک اسید مهمترین ترکیب موجود در سرکه است همچنین گزارش شده که سرکه حاوی مقادیر بالایی از پلی‌فللهای ویتامین C و اسیدهای آلی می‌باشد Shahidi, McDonald, Chandrasekara, and Zhong, 2008)

گلیسرید، LDL و VLDL سرم خونی بیشتر از زمانی بود که به صورت ترکیبی به جیره اضافه شدند ( $p < 0.05$ ). سطح سرم تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت ( $p > 0.05$ ). از سوی دیگر نسبت HDL/Chol در اثر استفاده از سرکه به صورت معنی داری افزایش یافت ( $p < 0.05$ ). در مطالعه حاضر آنزیم فیتاز به تنها تأثیری بر سطح چربی های خون نداشت ( $p > 0.05$ ). مکمل نمودن جیره با اسیدهای آلی با تولید آنزیم های تجزیه کننده نمک های صفرایی و غیرمزدوج ساختن آنها و همچنین از طریق کاهش pH مجرای روده به واسطه فعالیت باکتری های اسید لاکتیکی، منجر به کاهش غلظت کلسترول می شوند. حلالیت اسیدهای صفرایی غیرمزدوج در pH پایین کاهش می یابد، در نتیجه از روده کمتر جذب شده و بیشتر در مدفع ترشح می شوند (Klaver, and Van der Meer, 1993).

در این شرایط کبد برای برقراری مجدد چرخه کبدی اسیدهای صفرایی، قسمت بیشتری از کلسترول را به صفرا تبدیل می کند و بنابراین از غلظت کلسترول در بافت ها و خون کاسته می شود Ziae, Karimi Torshizi, Bashtani, .(Ros, 2000) که احتمالاً اسیدهای آلی از طریق افزایش فعالیت آنزیم کلسترول آلفا-۷-هیدروکسیلاز و با تحريك ترشح اسیدهای صفرایی، Mohan, کلسترول خون را کاهش می دهند. همچنین

Kadirvel, Nataragen, and Bhaskaran ۱۹۹۶ در سال گزارش کردند که اسیدهای آلی با تأثیر مثبت بر فلور میکروبی روده و افزایش باکتری های تولید کننده اسیدلاکتیک در روده و همچنین از طریق مصرف تری گلیسرید توسط این باکتری ها سبب کاهش میزان تری گلیسرید در خون می شوند. دلیل احتمالی کاهش غلظت LDL خون جوجه های گوشتی تغذیه شده با اسیدهای آلی را می توان به موارد ذیل نسبت داد: ۱- کاهش در سنتر کبدی کلسترول به واسطه کاهش در فعالیت آنزیم ۳-هیدروکسی-۳-متیل گلوتاریل کواآنزیم-آ ردوکتاز و رابطه مستقیمی که این آنزیم با تولید کلسترول لیپوپروتئین با چگالی پایین دارد (Elson, and Qureshi, 1995) ۲- اثرات این

مطالعات متعددی (Abdel – Azeem, El-Hommosany, 2000 Abdo, and Zeinb 2004; and Nematallah, 2000) نشان دادند که اسیدی شدن جیره باعث افزایش بکارگیری مواد مغذی جیره و بهبود ضریب هضمی پروتئین می شود. این محققین گزارش کردند که استفاده از مکمل اسیدهای آلی در سطح مناسب سبب بهبود افزایش وزن بدن جوجه های گوشتی می گردد که این امر ناشی از بهبود مصرف خوراک، بهبود هضم و جذب خوراک، افزایش فلور میکروبی مفید روده، کاهش تولید مواد سمی، کاهش وقوع عفونت ها و تعدیل پاسخ سیستم ایمنی طیور به هنگام استفاده از مکمل اسیدهای آلی در جیره می باشد. نتایج همچنین نشان دادند که استفاده از سرکه در دو هفته اول پرورش منجر به افزایش ضریب تبدیل خوراک شد ( $p < 0.05$ ) در حالی که در همین دوره زمانی آنزیم فیتاز ضریب تبدیل خوراک را به صورت معنی داری کاهش داد ( $p < 0.05$ ). به نظر می رسد علت افزایش ضریب تبدیل خوراک در اثر استفاده از سرکه، افزایش خوشخوارکی جیره و به تبع آن افزایش مصرف خوراک است که بیش از ظرفیت هضم و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش بوده که منجر به افزایش ضریب تبدیل خوراک شده است. et al Abdel-Fattah ۲۰۰۸ در سال گزارش کردند که استفاده از اسید استیک، اسید سیتریک و اسید لاکتیک باعث بهبود افزایش وزن بدن، افزایش خوراک مصرفی و بهبود ضریب تبدیل خوراک شد.

نتایج مربوط به تأثیر سرکه، آنزیم فیتاز و اثرات متقابل آنها بر چربی های خون جوجه های گوشتی در جدول ۳ نشان دادند که افزودن سرکه به جیره باعث کاهش سطوح کلسترول، تری- گلیسرید، LDL و VLDL سرم شد ( $p < 0.05$ ). همچنین ترکیب سرکه و آنزیم فیتاز، سطح تری گلیسرید و VLDL سرم خونی جوجه های تغذیه شده با جیره های حاوی آنها را نسبت به جوجه هایی که با جیره های فاقد سرکه و آنزیم فیتاز تغذیه شده بودند، کاهش داد ( $p < 0.05$ ), البته بر اساس نتایج بدست آمده مشخص شد زمانی که سرکه و آنزیم فیتاز هر کدام به تنها بی در جیره استفاده شدند تأثیرشان بر کاهش سطوح کلسترول، تری-

ترکیبات در کاهش فعالیت آنزیم‌های لیپوژن و تولید تری‌آسیل گلیسرول‌ها (Santoso et al, 1995) و ۳-مکانیسم‌های تنظیم درون سلولی کلسترول (Shahbazi, and Maleknia, 1992). کاهش میزان کلسترول سرم توسط استفاده از سطوح اسیدهای آلی توسط Abdel-Fattah et al (2008) در سال Taherpour, Moravej, Shivazad, Adibmoradi, شد.

در سال ۲۰۰۶ گزارش کردند که استفاده از سرکه در تغذیه حیوانات دارای اثرات متعددی می‌باشد که از جمله آن‌ها می‌توان به کاهش کلسترول و تری‌گلیسرید سرم خونی اشاره کرد.

جدول ۳- تأثیر سرکه، آنزیم فیتاز و اثر متقابل آن‌ها بر چربی‌های خون جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی (mg/dl)

HDL/Chol	VLDL	LDL	HDL	تری‌گلیسرید	کلسترول	تیمارها
۰/۵۴ <sup>b</sup>	۶/۴ <sup>a</sup>	۵۳ <sup>a</sup>	۶۵	۳۱ <sup>a</sup>	۱۲۴ <sup>a</sup>	A1
۰/۶۱ <sup>a</sup>	۵/۵ <sup>b</sup>	۳۹ <sup>b</sup>	۶۴	۲۷ <sup>b</sup>	۱۱۰ <sup>b</sup>	A2
						فیتاز (FTU)
۰/۵۶	۶	۴۷	۶۶	۳۰	۱۱۹	B1
۰/۵۸	۵/۸	۴۵	۶۳	۲۸	۱۱۴	B2
۰/۰۱	۰/۱۱	۳	۱/۲	۰/۶	۳	Pooled SEM
				سطح احتمال		
۰/۰۱	۰/۰۰۳	۰/۰۲	۰/۸۷	۰/۰۰۶	۰/۰۲	سرکه
۰/۳۷	۰/۱۸	۰/۷۴	۰/۱۷	۰/۴۶	۰/۳۹	آنزیم فیتاز
۰/۱۲	۰/۰۰۴	۰/۰۳	۰/۲۰	۰/۰۳	۰/۰۴	سرکه ×

<sup>a-b</sup> آندیس‌های نامتشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ ). A1 و A2: سرکه صفر و دو درصد B1 و B2: آنزیم فیتاز صفر و ۵۰۰ واحد

برای محافظت پرندگان در برابر میکرووارگانیسم‌های مهاجم می‌باشد. در این رابطه Katanbaf, Dunnington, and Siegel در سال ۱۹۸۹ گزارش کردند که افزایش وزن نسبی اندام‌های لنفوئیدی به عنوان نشانه‌ای از پیشرفت سیستم ایمنی است. اسیدهای آلی می‌توانند از طریق کاهش رشد قارچ‌ها و جلوگیری از رشد مایکروتوكسین‌ها، بر جمعیت باکتریایی تاثیر گذاشته و سبب حذف باکتری‌های بیماری‌زای حساس به اسید آلی گردند و با غالب شدن لاکتوپاسیل‌ها در روده روی سیستم ایمنی موثر باشند و سبب ایجاد ایمنی مؤثر و مطلوب گردند Dorman and

با توجه به نتایج مربوط به بررسی سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در جدول ۴، تجزیه و تحلیل داده‌های آماری نشان دادند که استفاده از سطح دو درصد سرکه منجر به افزایش وزن نسبی بورس فابرسيوس و وزن نسبی طحال شد ( $p < 0.05$ ). همچنین استفاده از آنزیم فیتاز در جیره، وزن نسبی بورس فابرسيوس پرندگان را افزایش داد ( $p < 0.05$ ). تأثیر تیمارهای آزمایشی روی وزن تیموس و تیتر نیوکاسل معنی‌دار نبود ( $p > 0.05$ ). طحال، بورس و تیموس به عنوان بخشی از سیستم ایمنی قابل توجه‌اند. این سیستم مسئول تولید سلول‌هایی

مقاومت و تأثیر مثبت در تحریک سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی  
Ghahri, ShivaZad, Farhumand, Egbal, and  
Liu, Ru, Cowieson, Li, and .Najafzadeh, 2007)  
(در سال ۲۰۰۸ گزارش کردند که استفاده از آنزیم فیتاز  
منجر به افزایش قدرت سیستم ایمنی می‌شود.

(Deans, 2000). همچنین برای تقویت سیستم ایمنی طیور،  
اسیدهای آلی می‌توانند علاوه بر کاهش عوامل بیماری‌زای  
خوارک از طریق کاهش pH روده، میکرووارگانیسم‌های مضر را  
کاهش و میکرووارگانیسم‌های مفید را افزایش دهند و به عبارتی  
باعث حذف رقبهای باکتری‌های بیماری‌زا از طریق کاهش  
حساسیت نسبت به بیماری‌ها شوند و در نهایت باعث افزایش

جدول ۴- تأثیر سرکه، آنزیم فیتاز و اثر متقابل آن‌ها بر سیستم ایمنی جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

تیتر نیوکاسل	* وزن طحال	* وزن تیموس	* وزن بورس	تیمارها
۱/۸۵	۰/۹ <sup>b</sup>	۰/۴۶	۰/۲۰ <sup>b</sup>	سرکه (%) A <sub>1</sub>
۱/۶۰	۰/۱۲ <sup>a</sup>	۰/۴۵	۰/۲۳ <sup>a</sup>	A <sub>2</sub>
(FTU)				
۱/۷۵	۰/۱۱	۰/۴۵	۰/۱۹ <sup>b</sup>	B <sub>1</sub>
۱/۷۰	۰/۱۰	۰/۴۶	۰/۲۳ <sup>a</sup>	B <sub>2</sub>
۰/۱۱	۰/۲	۰/۱۲	۰/۰۳	Pooled SEM
سطح احتمال				
۰/۱	۰/۰۲	۰/۲	۰/۰۰۳	سرکه
۰/۲۲	۰/۲	۰/۸	۰/۰۲	آنزیم فیتاز
۰/۱۲	۰/۰۷	۰/۰۸	۰/۳۶	سرکه × فیتاز

<sup>a,b</sup>اندیس‌های نامشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهاست ( $p < 0.05$ ) . گرم به ازای صد گرم وزن زنده

A1 و A2: سرکه صفر و دو درصد B1 و B2: آنزیم فیتاز صفر و ۵۰۰ واحد

به صورت چربی در محوطه بطی ذخیره شده است. Shabani ۲۰۱۱ در سال Fath, R. Najafi, and GH. Najafi, گزارش کردند که راندمان لاشه، وزن‌های نسبی سینه و ران تحت تأثیر اسیدهای آلی قرار نگرفتند. آن‌ها همچنین اظهار داشتند که با انجام مقایسات متعامد، کاهش معنی‌داری در وزن نسبی چربی محوطه بطی در تیمارهای دریافت کننده اسیدهای آلی نسبت به گروه شاهد مشاهده گردید.

نتایج تأثیر سرکه، آنزیم فیتاز و اثر متقابل آن‌ها بر بازده لاشه و وزن نسبی اجزای لاشه در جدول ۵ گزارش شده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها نشان دادند که استفاده از آنزیم فیتاز باعث افزایش میزان چربی محوطه بطی گردید ( $p < 0.05$ ). در حالی که افزودن سرکه به تنهایی یا به همراه آنزیم فیتاز تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات لاشه نداشت ( $p > 0.05$ ).

به نظر می‌رسد افزودن آنزیم فیتاز با افزایش چشمگیر قابلیت هضم مواد مغذی (Aydin et al, 2010)، موجب افزایش انرژی آزاد شده از جирه غذایی شده است. از آنجایی که در این تحقیق آنزیم به صورت سرکه<sup>۲</sup> استفاده شده لذا انرژی مازاد بر نیاز حیوان

<sup>2</sup> Over the top

## جدول ۵- تأثیر سرکه، اسید سیتریک، آنزیم فیتاز و اثرات متقابل آن‌ها بر ویژگی‌های لاشه جوجه‌های گوشتی در ۴۲ روزگی

تیمارها	*بازده لاشه	*چربی محوطه بطنی	**سینه	**ران	**بال
سرکه (%)					
A <sub>1</sub>	۷۴/۴۸	۱/۴۵	۳۴/۱۲	۲۸/۷۴	۱۰/۰۲
A <sub>2</sub>	۷۴/۴۹	۱/۳۵	۳۴/۰۸	۲۸/۹۷	۱۰/۲۳
فیتاز (FTU)					
B <sub>1</sub>	۷۴/۲۸	۱/۲۸ <sup>b</sup>	۳۳/۹۷	۲۸/۸۴	۱۰/۲۳
B <sub>2</sub>	۷۴/۶۹	۱/۵۱ <sup>a</sup>	۳۴/۲۳	۲۸/۸۷	۱۰/۰۲
Pooled SEM	۰/۳۶	۰/۰۳	۰/۵۴	۰/۳۲	۰/۰۸
سطح احتمال					
سرکه	۰/۳۲	۰/۲۹	۰/۷۱	۰/۹۳	۰/۰۷
آنزیم فیتاز	۰/۳۸	۰/۰۱	۰/۸۶	۰/۳۹	۰/۱۷
سرکه × فیتاز	۰/۴۷	۰/۳۲	۰/۷۳	۰/۰۶	۰/۴۰

<sup>a-b</sup> آندیس‌های نامتشابه در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای A<sub>1</sub> و A<sub>2</sub>: سرکه صفر و دو درصد B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub>: آنزیم فیتاز صفر و ۵۰۰ واحد

## نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های حاوی دو درصد سرکه طبیعی انگور بهترین عملکرد را داشتند. همچنین افزودن سرکه به جیره توانست سطح چربی‌های مضر خون را به صورت معنی‌داری کاهش دهد. با توجه به اینکه مطالعات اندکی در رابطه با تأثیر سرکه طبیعی انگور مخصوصاً همراه با آنزیم فیتاز صورت گرفته، لازم است تا تحقیقات بنیادی بیشتری در زمینه موجود انجام گیرد تا مکانیسم‌های اصلی تغییر چربی‌های سرم و بهبود عملکرد توسط اسیدهای آلی وجود یا عدم وجود تداخل اثر بین تیمارهای مورد مطالعه بیشتر روشن شود.

## منابع

- Abdel-Fattah, S. A., EI-Mednay, M. H., and Abdul-Azeem, V. (2008). Thyroid activity of broiler chickens fed supplemental organic acids. *International of poultry science*, 7:215-222.
- Abdo, M., and Zeinb, A. (2004). Efficacy of acetic acid in improving the utilization of low protein-low energy broiler diets. *Egypt Poultry Science*, 24: 123-141.
- Aydin, A., Pekel, A. Y., Issa, G., demirel, G., and Patterson, P. H. (2010). Effect 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. *Journal of Applied Poultry Research*, 19,422-431.
- Broiler nutrition specification. (2007). Ross 308 Broiler Nutrition-specification. Aviagen Company, Scotland.
- Dorman, H. J. D., and Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Applied Microbiology*, 88(2): 308-316.
- Abdel – Azeem, F., El-Hommosany, Y. M., and 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 of Rabbit Science*, 10: 121-145.

- Elson, C. E., and Qureshi, A. A. (1995). Coupling the cholesterol and tumor-suppressive actions of palm oil to the impact of its minor constituents on 3-hydroxy-3-ethylglutaryl coenzyme A reductase activity. *Prostag Leukot Ess*, 52: 205-208.
- Fushimi, T., Suruga, K., and Oshima, Y. (2006). Dietary acetic acid reduces serum Cholesterol and triacylglycerols in rats fed a cholesterol-rich diet. *Journal of British Nutrient*, 95:916-924.
- Ghahri, H., Shivaazad, M., Farhumand, P., Egbal, J., and Najafzadeh, M. (2007). study the Effect of organic acids on performance of broiler chicks. *Pajouhesh&Sazandegi*, No 77 pp: 26-33.
- Griggs, J. P., and Jacob, J. P. (2005). Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *Journal of Applicate Poultry Research*, 14:750-756.
- Gunal, M., Yayli, G., Kaya, O., Karahan, N., and Sulak, O. (2006). The effect of antibiotic growth promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal microflora and tissue of broilers. *International Journal of Poultry Science*, 5:149-155.
- Han, Y. M., Roneker, K .R., Pond, W .G., and Lei, X. G. (1998). Adding wheat middling's, microbial phytase and citric acid to corn-soybean meal diets for growing pigs may replace inorganic phosphorus supplementation. *Journal of Animal Science*, 76: 2649-2656.
- Johnston, CS., and Gaas, CA. (2006). Vinegar: Medicinal uses and antiglycemic effect. *Med G en Med*. 8:61.
- Katanbaf, M. N., Dunnington, E. A., and Siegel, P. B. (1989). Restricted feeding in early and late-feathering chickens. Growth and physiological responses. *Poultry Science*, 68: 344-351.
- Klaver, F. A. M., and Van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile Salt-deconjugating activity. *Applicate of Envirmen Microbial*, 59:1120-1124.
- Liu, N., Ru, Y. J., Cowieson, A. J., Li, F. D., and Cheng, X. CH. (2008). Effect of phytat and phytase on the performance and immune function on broilers fed nutritionally margarin diets. *Journal of Poultry Science*, 87: 1105-1111.
- Mohan, B., Kadirvel, R., Nataragen, A., and Bhaskaran, M. (1996). Effect of probiotic supplementation on growth, nitrogen utilization and serum cholesterol in broilers. *Journal of Poultry Science*, 37: 395-401.
- Murry, B. E.(1991). New aspects of antimicrobial resistance and the resulting therapeutic dilemmas. *Journal of Infection Dises*, 163:1185-1194.
- Nourmohammadi, R., Hosseini, S. M., Saraee, H., and Arab, A. (2011). Plasma thyroid hormone concentrations and pH values of some GI-tract segments of broilers fed on different dietary citric acid and microbial phytase levels. *Journal of Animal Veterinary Science*, 6:1-6.
- Qadyanloo, B., Rahimi, Sh., and Karimi Torshizi, M. A. (2009). Effect of organic acids and formaldehyde on morphology of broiler intestine and salmonella reduction in feed. *Journal of Veterinary Research*, 64, 3:215-220.
- Ramarao, S. V., Reddy, M. R., Raju, M. V. L. N., and Panda, A. K. (2004). Growth, nutrient utilization and immune competence in broiler chicken fed probiotic, gut acidifier and antibacterial componds, *Indian Journal of Poultry Science*. 39:2. 125-130.
- Ravindran, V., Selle, P. H., and Bryden, W. L. (1999). Effect of phytase supplementation, individually and in combination with glycanase on the nutritive value of wheat

- and barley. *Journal of Poultry Science*, 78:1588-1595.
- Reddy, N. R., Sathe S. K., and Salunkhe, D. K. (1982). Phytates in legumes and cereals. *Advances in Food Chemistry*, Academic Press, New York, 1-92.
- Ricke, S.C.(2003). Perspective on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials, *Poultry Science*. 82: 632-639.
- Ros, E. (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol. Dietary and pharmacological inhibition or reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis*, 51: 357-379.
- Rotter, B.A., Friesen, O. D., Guenter, W., and Marllet, R. (1990). Influence of enzyme supplementation on the bioavailable energy of barley. *Poultry Science*, 69(7): 1174-1181.
- Santoso, U., Tanaka, K., and Ohatani, S. (1995). Effect of dried *Bacillus subtilis* culture on growth, body composition and hepatic lipogenic enzyme activity in female broiler chicks. *Journal of British Nutrient*, 74:523-529.
- SAS. 2005. SAS User's Guide. Statistics. Version 9.12. Edn. SAS Institute Inc.
- Shabani Fath, A. A., Najafi, R., and Najafi, Gh. (2011). Effects of antibiotic growth promoter replacement with organic acids, on small intestinal morphology, performance and carcass characteristics of broiler chickens. *Iranian Journal of Animal Science Research*, 22: 113-124.
- Shahbazi, P., and Maleknia, N. (1992). General biochemistry. Tehran. Univercity Press. 53lp. (In Persian)
- Shahidi, F., McDonald, J., Chandrasekara, A., and Zhong, Y. (2008). Phytochemicals of foods, beverages and fruit vinegars:chemistry and health effects. *Asia Pac. Journal of Clinical Nutrient*, 17(Suppl 1):380-382.
- Snyder, D., Marquadt, W., Mallinson, E., Savage, P., and Allen, C. (1984). Rapids serological profiling by enzyme linked immunosorbent assay. III. Simultaneous measurement of antibody titers to infectious bronchitis virus, infectious bursal disease and Newcastle disease virus in a single serum dilution. *Avian Dieses*. 28:12-24.
- Taherpour, K., Moravej, H., Shivazad, M., Adibmoradi, M., and Yakhchali, B. (2009). Effects of dietary probiotic, prebiotic and butyric acid glycerides on performance and serum composition in broiler chickens. *African Journal*. 8 (10) 3229-2334.
- Van Immerseel, F., Smet, I. D.E., De Buck, J., Meulemans, G., Haesebrouck, F., and Ducatelle, R. (2002). Development of a chickn ceacial epithelial cell model to study in vitro *Salmonella* epithelium interactions. *International symposium salmonella and salmonellosis*. Ploufragan. France.
- Ziae, H., Karimi Torshizi, M.A., Bashtani, M., Naeemipour, H., and Zeinali1, A. (2009). Efficiency evaluation of antibiotic growth promoter's alternatives on immune response and some blood metabolites in broiler chickens. *Journal of Agriculther Science Naturient*, Vol. 16(Special issue 2).

▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪ ▪