وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعـــــــة الزاويـــــة

ادارة الدراسات العليا والتدريب

كلية العلوم – قسم الاحياء

شعبة علم الحيوان

تأثير المعززات الحيوية وحمض الهيوميك على المناعة: الطيور نموذجا

Effect of Probiotics and Humic Acid on Immunity: Gallus gallus (G. gallus) as a Model

إعـــداد الطالبة

فوزية نورالدين العربي حفيظة

إشـــراف

أ.د. عبدالوهاب محمد كمون
استاذ امراض الدواجن
كلية الطب البيطري
جامعة طرابلس

أ.د. الطيب حسن العزومي
استاذ علم البكتيريا
كلية التقنية الطبية
جامعة الزاوية

قدمت هذه الرسالة استكمالا لمتطلبات الاجازة العالية (الماجستير) بتاريخ 2024/3/21م
بقسم الاحياء كلية العلوم جامعة الزاوية

الاقـــــــرار

أقر أنا **فوزية نورالدين العربي حفيظة** بأن ما اشتملت عليه الرسالة إنما هو نتاج جهدي الخاص، باستثناء ما تمت الإشارة إليه حيثما ورد، وأن هذه الرسالة ككل أو أي جزء منها لم يقدم من قبل لنيل أي درجة علمية، أو بحث علمي لدى أي مؤسسة تعليمية أو بحثية أخرى، وللجامعة حق توظيف الرسالة أو الأطروحة والاستفادة منها مصدراً مرجعيا للمعلومات، لأغراض الاطلاع أو الإعارة أو النشر بما لا يتعارض وحقوق الملكية الفكرية المقررة بالتشريعات النافذة.

التوقيع:_____

التاريخ:3/21/ 2024م

الاهـــــداء

إلهي بك يطمئن قلبي فلا يطيب الليل إلا بشكرك ولا يطيب النهار إلا بطاعتك فلا تجعلني من الذين نسوا الله فانساهم انفسهم ..... الله جل جلاله.

الى من اصلي عليه صلاة فتصعد وتهبط بعشرة امثالها ، الى نبي الرحمة ونور العالمين وسيد الاولين والاخرين ..... سيدنا محمد صلى الله عليه وسلم.

الى من تحت اقدامها آخر امنياتي وفوق رأسها اجمل محطات القبل امي وهل بعد امي تنطق الجمل الى نبراس الامل ..... امي الغالية.

الى من وهبني مجدا واسما احمله وافتخر به ..... ابي الغالي.

الى رفيق دربي الى من ينافس الغيث في العطاء الى من ساندني وشجعني وتحمل معي مشاق مسيرتي البحثية ..... زوجي الغالي.

الى سندي في الحياة الى شموعي التي تنير طريقي ..... ابنائي وبناتي.

الى زملائي وزميلاتي وعائلتي الكريمة وكل من كان لهم اثر على حياتي والى كل من احبهم قلبي ونسيهم قلمي ..... اهدي هذا العمل العلمي المتواضع.

فوزية نورالدين العربي حفيظة

شكر وتقدير

يا طالب العلم لاتبغي به بدلا فقد ضفرت ورب اللوح والقلم

قال رسول الله صل الله عليه وسلم (من لا يشكر الناس لا يشكر الله)

لك الحمد حتي ترضى ولك الحمد اذا رضيت ولك الحمد بعد الرضى ونشهد ان لا اله الا الله وحده لاشريك له تعضيما لشأنه. ونشهد ان سيدنا ونبينا محمد عبده ورسوله الداعي الي رضوانه صلي الله عل يه وعلي اله واصحابه واتباعه وسلم ، بعد شكرالله سبحانه وتعالي علي توفيقه لنا ، لاتمام هذه الرسالة ، اتقدم بجزيل الشكر والتقدير وبأخلص ايات الاحترام الي منهل العلم والعطاء الي من كاد ان يكون رسولا. المشرف الاول الاستاذ الدكتور/ عبدالوهاب محمد كمون. والمشرف الثاني الاستاذ الدكتور/ الطيب حسن العزومي.

كما اتقدم بوافرالشكر والامتنان الي الدكتور/ الهادي سعد عريبي. هؤلاء الذين أنارو لي الطريق بعلمهم الغزير وتوجيهاتهم السديدة وكان لارشاداتهم القيمة الفضل الاكبر في انجاز هذه الرسالة.

كما اتقدم بوافر امتناني الي البروفسور علي ادم بحر (بجامعة دوملوبينار بتركيا) لمساعدته في تصوير الشرائح كما اشكر الدكتور على المعيوفي (شركة المراعي البيطرية) لتمكيني من تحليل العينات بمختبر الشركة.

كما اتقدم بالشكر الي جامعة الزاوية ، كلية العلوم واخص بالذكر قسم علم الحيوان برئاسة الدكتور/ عبدالعال الطويل . د/ فكري ابوشوفة . والاستاذ / البشير. وجميع اعضاء هيئة التدريس والفنيين بالقسم. وقسم الدراسات العليا برئاسة الدكتور/ نوري لامين كشلاف.

فوزية نورالدين العربي حفيظة

قائمة المحتويات

العـــــــــــنوان	الصفحة
1. المقدمـــــــــــــــة	1
2. اهداف الدراسة	4
3. الدراسات السابقة	5
1.3. استخدام المضادات الحيوية كمحفزات للنمو	5
2.3. استخدام المعززات الحيوية (البروبيوتك) كمحفزات للنمو	8
3.3. استخدام حمض الهيوميك واملاح الهيومات كمحفزات للنمو	12
4. المواد وطرق العمل	16
1.4. الحيوانات المستخدمة في التجربة	16
2.4. تصميم التجربة	16
3.4. قياسات التجربة	19
1.3.4. وزن الجسم الحي	19
2.3.4. عدد النافق	19
3.3.4. قياس المناعة	20
1.3.3.4. المناعة الخلطية (الاجسام المضادة)	20
2.3.3.4. المناعة الخلويـــــــــــــــة	24
3.3.3.4. نسبة وزن الاعضاء اللمفاوية (الطحال وجراب فابريشيوس) الى وزن الجسم	27
4.3.4. تحديد عدد خلايا الدم البيضاء التفريقي (DLC)	27
5.3.4. قياس طول الخملات واتساع تجويف جريبات الأمعاء	27
4.4. التحليل الاحصائي	29
5. النتائج	30
1.5. وزن الجسم الحي	30
2.5. عدد النافق	30
3.5. قياس المناعة	31
1.3.5. المناعة الخلطية (الاجسام المضادة)	31
2.3.5. المناعة الخلويـــــــــــــــة	31
3.3.5. نسبة وزن الاعضاء اللمفاوية (الطحال وجراب فابريشيوس) الى وزن الجسم	38
4.5. تحديد عدد خلايا الدم البيضاء التفريقي (DLC)	39
5.5. قياس طول الخملات واتساع تجويف جريبات الامعاء	40
6. المناقشة	49
7. الاستنتاجات	56
8. التوصيات	57
9. المراجع	58

قائمة الجداول

رقم الجدول	العـــــــنوان	رقم الصفحة
1	توزيع الطيور على المجموعات وفترة المعاملة وعدد الطيور لكل مجموعة.	18
2	تركيبة وتركيز الخليط من المعززات الحيوية (البروبيوتيك) والمضادات الحيوية وحمض الهيوميك المستعملة في التجربة.	19
3	التغيرات التدريجية الأسبوعية في وزن جسم دجاج اللحم للمجموعة الضابطة ومجموعات التجربة الأخرى.	33
4	عدد الطيور النافقة التي تم تسجلها لكل المجموعات من عمر يوم وحتي نهاية التجربة.	34
5	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على عيارية الأجسام المضادة لفيروس النيوكاسل في دجاج اللحم في الأيام 7 و 27 و 42 من التجربة.	35
6	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على سمك الجلد في دجاج اللحم بعد 24 و 48 و 72 ساعة من تحسيس الجلد لمادة داينيتروبنزين DNCB لقياس المناعة الخلوية.	37
7	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على نسبة وزن الأعضاء اللمفاوية (الطحال وجراب فابريشيوس) الى وزن الجسم في يوم 27 و42 من التجربة.	42
8	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على عدد خلايا الدم البيضاء التفريقي لمجموعات التجربة بعمر 27 و 42 يوم.	42
9	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على طول الخملات وقطر جريبات الاثنى عشر عند عمر 42 يوم.	43
10	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على طول الخملات وقطر جريبات الصائم عند عمر 42 يوم.	43

قائمة الاشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1	احدى مجموعات التجربة (مجموعة البروبيوتيك)	18
2	وزن الطيور عند نهاية التجربة باستخدام ميزان الكتروني	20
3	طريقة اجراء اختبار منع التلازن الدموي لعينات مصل الدم	24
4	تمييز الطيور المستخدمة لقياس المناعة الخلوية باستخدام حلقة بلاستيكية	25
5	تحسيس جلد الفخذ الايمن موضعيا للطيور المستخدمة في قياس المناعة الخلوية	26
6	قياس سمك الجلد باستخدام القدمة ذات الورنية	26
7	قياس وزن الطحال باستخدام ميزان حساس	28
8	تجهيز عينات الامعاء لعملية التمرير والتقطيع والصبغ بعد حفظها في الفورمالين	28
9	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على وزن الجسم الحي عند نهاية التجربة	34
10	اجمالي النافق الذي تم تسجيله لكل المجموعات عند نهاية التجربة	35
11	نتيجة اختبار منع التراص الدموي لتحديد عيا رية الاجسام المضادة لفيروس مرض النيوكاسل	36
12	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على عيارية الأجسام المضادة لفيروس مرض النيوكاسل في دجاج اللحم عند نهاية التجربة	36
13	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على سمك الجلد في دجاج اللحم بعد 48 ساعة من تحسيس الجلد لمادة DNCB.	37
14	تأثير البروبيوتيك وحمض الهيوميك على نسبة وزن الطحال/وزن الجسم في يوم 27.	38
15	يبين خلايا لمفاوية مختلفة الاحجام بالاضافة الى تجمع من الصفائح الدموية	39
16	يبين خلايا الهيتروفيل التي تتميز بوجود حبيبات حامضية التفاعل	40
17	مقطع عرضي للاثنى عشر يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة للمجموعة الضابطة. مقياس 200 ميكروميتر.	44
18	مقطع عرضي للاثنى عشر يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة البروبيوتيك. مقياس 200 ميكروميتر.	44
19	مقطع عرضي للاثنى عشر يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة المضادات الحيوية. مقياس 200 ميكروميتر.	45
20	مقطع عرضي للاثنى عشر يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة حمض الهيوميك أ. مقياس 200 ميكروميتر.	45
21	مقطع عرضي للاثنى عشر يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة حمض الهيوميك ب. مقياس 200 ميكروميتر.	46

22	مقطع عرضي للصائم يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة للمجموعة الضابطة. مقياس 200 ميكروميتر.	**46**
23	مقطع عرضي للصائم يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة البروبيوتيك. مقياس 200 ميكروميتر.	**47**
24	مقطع عرضي للصائم يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة المضادات الحيوية. مقياس 200 ميكروميتر.	**47**
25	مقطع عرضي للصائم يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة حمض الهيوميك أ. مقياس 200 ميكروميتر.	**48**
26	مقطع عرضي للصائم يبين طول الخملات وقطر الجريبات في دواجن اللحم التابعة لمجموعة حمض الهيوميك ب. مقياس 200 ميكروميتر.	**48**

Abbreviations الاختصارات

ت	الجملة بالانجليزي	ترجمة الجملة بالعربي	اختصار الجملة
.1	Major histocompatibility complex	معقد التوافق النسيجي	MHC
.2	B cells (B lymphocytes)	الخلايا البائية او الخلايا اللمفاوية B	BC
.3	T cells (T lymphocytes)	الخلايا التائية او الخلايا اللمفاويةT	TC
.4	Bursa of Fabricius	جراب او كيس فابريشيوس	B
.5	Thymus gland	الغدة الثيموسية او الزعترية	T
.6	Haemagglutination test	اختبار التراص الدموي	HA
.7	Haemagglutination inhibition test	اختبار تثبيط التراص الدموي	HI
.8	Phosphate buffered saline	محلول ملحي بالفوسفات	PBS
.9	Dinitrochlorobenzen	ثنائي نيتروكلوروبنزين	DNCB
.10	Analysis of variance	تحليل التباين	ANOVA
.11	Analsis of covariance	تحليل التباين المشترك	ANCOVA

الملخص

اجريت هذه الدراسة لتحديد تأثير أهم المعززات الحيوية (كالبكتيريا النافعة *Bacillus subtilis* و *Lactobacillus acidophilus* والخميرة *Saccharomyces cerevisiae*) والحمض العضوي (حمض الهيوميك وملح هيومات الصوديم Sodium humate salt ، Humic acid) على الاستجابة المناعية لدواجن اللحم وتقييم قدرة الجهاز المناعي. وكذلك دراسة امكانية استخدام المعززات الحيوية وحمض الهيوميك كبدائل للمضادات الحيوية في الأسبوع الأول فقط من العمر لدواجن اللحم وكذلك خلال فترة 42 يوم متواصلة من التربية.

استخدم في هذه التجربة 300 كتكوت من دواجن اللحم سلالة روص (Ross) بعمر يوم وتم تقسيمها عشوائيا الى خمس مجموعات بواقع 60 كتكوت لكل مجموعة. المجموعة الأولى (المجموعة الضابطة – G1) أعطيت ماء وعلف فقط، والمجموعة الثانية (G2) أعطيت خليط من البروبيوتيك والمجموعة الثالثة (G3) أعطيت خليط من المضادات الحيوية اما المجموعة الرابعة (مجموعة حمض الهيوميك أ) (G4) والخامسة (مجموعة حمض الهيوميك ب) (G5) فقد تم اعطاؤها حمض الهيوميك لمدة أسبوع فقط (الأسبوع الأول من العمر) للمجموعة الرابعة ولمدة 42 يوم للمجموعة الخامسة. تم قياس وزن الجسم وعدد النافق الأسبوعي وقياس المناعة بعد تحصين الطيور بكل المجموعات ضد مرض النيوكاسل وقياس عدد خلايا الدم البيضاء التفريقي وطول الخملات وقطر الجريبات للاثني عشر والصائم.

أظهرت النتائج انخفاضا معنويا ($P<0.05$) في اوزان الطيور بمجموعة المضادات الحيوية في اليوم السابع مقارنة بالمجموعة الضابطة والمجموعات الاخرى واستمر هذا الانخفاض حتى نهاية التجربة بينما كانت الاوزان في المجموعات الأخرى متساوية تقريبا حتى نهاية التجربة. لوحظ ارتفاع

في عدد النافق خلال الأسبوع الثاني في كل المجموعات ولكن كان الارتفاع معنويا ($P<0.05$) في مجموعة المضادات الحيوية كما لوحظ ان نافق مجموعة حمض الهيوميك ب كان اقل معنويا. ولوحظ من خلال التحليل الاحصائي لاجمالي النافق في نهاية التجربة وجود ارتفاع معنوي لنافق مجموعة المضادات الحيوية كما انخفض النافق معنويا في مجموعة حمض الهيوميك ب. فيما يخص المناعة الخلطية، كانت هناك زيادة كبيرة في عيارية الأجسام المضادة لفيروس مرض النيوكاسل لمجموعة البروبيوتيك (8.4±0.51) في اليوم 27. ومع ذلك، في اليوم 42، كانت عيارية الاجسام المضادة أعلى بشكل ملحوظ في مجموعة حمض الهيوميك ب (4.20±0.20) التي أعطيت الحمض باستمرار حتى نهاية التجربة. وكانت عيارية الاجسام المضادة منخفضة جدًا في مجموعة المضادات الحيوية (2.80±0.37). وفيما يخص المناعة الخلوية، أظهر سمك الجلد لمجموعة حمض الهيوميك ب (2.348±0.068) زيادة معنوية مقارنة بمجموعتي البروبيوتيك والمضادات الحيوية بعد 24 ساعة من تحسيس الجلد لمادة Di Nitro Chlorobenzene (DNCB) . بعد 48 ساعة ، كانت السماكة لا تزال أعلى بشكل معنوي في مجموعة حامض الهيوميك ب (2.331±0.046) مقارنة بالمجموعات الأخرى باستثناء المجموعة الضابطة. علاوة على ذلك، كان سمك جلد مجموعة المضادات الحيوية (1.497±0.297) أقل بكثير من المجموعة الضابطة و مجموعة حمض الهيوميك ب. لم تكن هناك فروق معنوية في نسبة وزن جراب فابريشيوس / وزن الجسم (٪) بين جميع المجموعات في اليوم 27 و 42. بينما كانت نسبة وزن الطحال / وزن الجسم (٪) اعلى معنوياً في مجموعة البروبيوتيك (0.113±0.022) ومجموعة المضادات الحيوية (0.111±0.014) في اليوم 27. اما في اليوم 42 من التجربة، فقد كان وزن الطحال / الجسم (٪) أقل بشكل ملحوظ في مجموعة المضادات الحيوية (0.091±0.006). لم تكن هناك فروق ذات دلالة إحصائية في تعداد خلايا الدم البيضاء التفريقي بين المجموعات المختبرة في هذه التجربة. تم تسجيل زيادة معنوية في طول خملات الاثنى عشر لمجموعة

البروبيوتيك (1546.66±119.83 ميكروميتر) ومجموعة حمض الهيوميك أ (1459.00±38.27 ميكروميتر). و أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في طول خملات الصائم لمجموعة حمض الهيوميك أ (2409.33±82.08 ميكروميتر). وأظهرت النتائج أيضا وجود انخفاض معنوي في قطر جريبات الصائم لمجموعة حمض الهيوميك ب (69.00±2.88 ميكروميتر). كما أظهرت النتائج وجود زيادة معنوية في النسبة بين طول الخملات وقطر الجريبات للصائم لمجموعة حمض الهيوميك ب (28.94±1.15).

بينت هذه الدراسة ان حمض الهيوميك له تأثيرات إيجابية للرفع من قدرة واستجابة الجهاز المناعي (الخلطي والخلوي) عندما يعطى يوميا لدجاج اللحم حتى سن التسويق.

Abstract

This study was conducted to determine the effect of the most important probiotics (the beneficial bacteria *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus* and yeast *Saccharomyces cerevisiae*) and organic acids (humic acid, and sodium humate salt) on the immune response of broilers (G. Gallus) and to evaluate the response of the immune system, as well as to study the possibility of using probiotics and humic acid as alternatives to antibiotics in the first week of life for broilers.

In this experiment, 300-day-old Ross broiler chicks were used, and they were randomly divided into five groups, 60 chicks for each group. The first group (G1) (control group) was given water and feed only, the second group (G2) was given a mixture of probiotics, the third group (G3) was given a mixture of antibiotics, and the fourth group (G4) and fifth group (G5) were given humic acid for a week only (the first week of life) (G4) and 42 days (G5), respectively. Body weight, weekly mortality rate, and immune response were measured after vaccinating birds of all groups against Newcastle disease. Differential white blood cell count, villi length, and crypts diameter of the duodenum and jejunum were also measured.

The results showed a significant decrease ($P<0.05$) in the weights of the birds in the antibiotic group (G3) on the seventh day compared to the control group and the other groups, and this decrease continued until the end of the experiment, while the weights in the other groups were almost equal until the end of the experiment.

An increase in mortality was observed during the second week in all groups, but the increase was significant ($P<0.05$) in the antibiotic group (G3). It was also noted that the mortality of the G5 group was significantly ($P<0.05$) less.

Regarding humoral immunity, there was a significant increase ($P<0.05$) in the antibody titer of the G2 (8.4 ± 0.51) on day 27. However, on day 42, the antibody titer was significantly higher ($P<0.05$) in the G5 group (4.20 ± 0.20). The antibody titer was very low in the G3 (2.80 ± 0.37). With regard to cellular immunity, the skin thickness of the G5 group (2.348 ± 0.068) showed a significant increase ($P<0.05$) compared to the G2 and G3 groups after 24 hours of sensitizing the skin to DNCB. After 48 hours, the thickness was still significantly higher in the G5 group (2.331 ± 0.046) compared to the other groups except the control group. Moreover, the skin thickness of the G3 (1.497 ± 0.297) was significantly less ($P<0.05$) than that of the control group and the G5 group.

There were no significant differences in the ratio of bursa weight/body weight (%) between all groups on day 27 and 42. While the ratio of spleen weight/body weight (%) was significantly higher ($P<0.05$) in the G2 group (0.113 ± 0.022) and the G3 (0.113 ± 0.022). 0.111 ± 0.014) on day 27. On day 42 of the experiment, the spleen/body weight (%) was significantly lower ($P<0.05$) in the G3 group (0.091 ± 0.006).

There were no significant differences in differential white blood cell counts between the groups tested in this experiment.

A significant increase ($P<0.05$) in the length of the duodenal villi was recorded for the G2 group (1546.66 ± 119.83 μm) and the G4 group (1459.00 ± 38.27 μm). The results showed that there was a significant increase ($P<0.05$) in the length of jejunum villi of the G4 group (2409.33 ± 82.08 μm). The results also showed that there was a significant decrease ($P<0.05$) in the diameter of the jejunal crypts of the G5 group (69.00 ± 2.88 μm). The results also showed a significant increase ($P<0.05$) in the ratio between the length of the villi and the diameter of the jejunal crypts for the G5 group (28.94 ± 1.15).

This study showed that humic acid and sodium humate has positive effects to increase the ability and response of the immune system (humoral and cellular) when it is given daily to broiler chickens until the age of marketing.