Animal Production Research

Vol. 14, No. 4, 2025 (1-15)
doi: 10.22124/ar.2025.31136.1909
eISSN: 2538-6107 pISSN: 2252-0872

University of Guilan

RESEARCH PAPER **OPEN ACCESS**

Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract of Iranian native poultry on hatchability, immune response, and growth performance in broilers

M. Ghanaatparast-Rashti[1], M. Mottaghitalab[2]*, M. Royan[3], R. Seighalani[3]

1. Iran Silk Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran
2. Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran
3. Animal Biotechnology Research Institute, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rasht, Iran

(Received: 11-07-2025 – Revised: 05-08-2025 – Accepted: 06-08-2025 – Available online: 03-09-2025)

Abstract

Introduction: Modern industrial poultry production removes the natural relationship between day-old chicks and hens. Consequently, the establishment of gut microbiota largely depends on the bacteria present in the hatchery and barn environment. On the other hand, chicks may be exposed to pathogenic agents while still at the hatchery, during hatching, sex determination, vaccination, and transportation, even before consuming their first feed. Since the initial contact with microbes might involve pathogenic bacteria, introducing beneficial bacteria into the gastrointestinal tract of chicks can help reduce the risk of pathogen settlement. The primary colonization of beneficial microbes is not only crucial for competing against pathogenic bacteria but also plays a significant role in stimulating factors associated with the growth and maturation of the immune system. Additionally, in the agricultural industries, the use of antibiotic growth promoters (AGPs) in animal diets has been reduced or even eliminated due to concerns regarding bacterial antibiotic resistance and antibiotic residues in animal products. As a result, several alternatives to AGPs have appeared in the poultry market. One of the many alternatives that are currently being investigated is the use of probiotics. Probiotics are defined as a "live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its intestinal microbial balance". Among the probiotics used in poultry, *Lactobacillus* isolates have been particularly valued for their positive effects on gut health. Furthermore, *Lactobacillus* naturally dominates the gastrointestinal tract of poultry. The beneficial effects of these bacteria occur through various mechanisms, including competitive exclusion, maintenance of protective intestinal barriers, and immune system enhancement. Probiotics can upregulate the expression of immune-related genes such as cytokines, interferons, and interleukins, which directly or indirectly increase the serum levels of immunoglobulins in response to antigens. Ideally, the best way to avoid the need for drugs is to prevent pathogen proliferation as early as possible. It has been commonly assumed that microbial colonization occurs after hatching in poultry; however, scientific evidence suggests that live bacteria may be present in the intestine in small quantities even before hatching. One favorable method of probiotic administration is the *in ovo* injection of probiotics into the amniotic sac at the late stage of embryonic development. This approach can facilitate the early establishment of beneficial bacteria in the gastrointestinal tract to create an environment that prevents pathogen colonization. Therefore, the objective of this study was to evaluate *in ovo* administration as a method for delivering some *Lactobacillus* isolates derived from the gut microbiota of Iranian native poultry to the intestines of broiler chicks before hatching and assess their effects on hatchability, immune system development, serum metabolites, and growth performance.

* Corresponding author: mmotaghi@guilan.ac.ir

CC BY

Materials and methods: To investigate the effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* isolates of Iranian native poultry in broilers, on day 18th of incubation, 672 embryonated eggs (Ross 308 strain) were assigned into 24 experimental units, in a completely randomized design with six treatments and four replicates (28 eggs per replicate). The hatched chicks, based on the same division as the *in ovo* injection stage, were raised for six weeks. Experimental treatments included: 1. *In ovo* injection of physiological saline (saline 9%; negative control), 2. *In ovo* injection of physiological saline (saline 9%) and antibiotic growth promoter (avilamycin) in the diet (positive control), 3. *In ovo* injection of *Lactobacillus salivarius* isolate Pls2 (MH595986; 10^5 CFU/egg), 4. *In ovo* injection of *Lactobacillus reuteri* isolate Plr6 (MF686483; 10^5 CFU/egg), 5. *In ovo* injection of *Lactobacillus reuteri* isolate Plr4 (MF686463; 10^5 CFU/egg), and 6. *In ovo* injection of *Lactobacillus reuteri* isolate Plr2 (MG547731; 10^5 CFU/egg). Percent of hatchability was calculated as the percent of healthy hatched chicks from fertile eggs. To evaluate the immune response of the broilers, hemagglutination assay and hemagglutination inhibition methods were separately used to measure the antibody titers against sheep red blood cells (SRBC) and Newcastle disease virus (NDV), respectively, and were expressed as the $\log_2$. To measure glucose, triglyceride, and total cholesterol from serum, a spectrophotometric method *via* liquiform kits was used. Important growth performance metrics, such as body weight gain, feed intake, feed conversion ratio, and European Production Efficiency Factor (EPEF), were evaluated throughout the entire rearing period. Results are reported as means, and differences among treatments were compared using the Tukey test, and significance was determined at $P<0.05$.

Results and discussion: *In ovo* injection of *Lactobacillus,* isolates had no negative effect on hatchability ($P>0.05$). *In ovo* injection of *Lactobacillus* isolates and positive control groups showed lower feed conversion ratio compared to the negative control group ($P<0.05$). The EPEF in the positive control group and *in ovo* administered *Lactobacillus* isolates was higher than the negative control group ($P<0.05$). Among the *lactobacilli* used, *in ovo* injection of Plr2 showed similar EPEF to the positive control group ($P>0.05$). Broiler dietary supplementation of antibiotic growth promoter and *in ovo* injection of Plr4 and Plr2 increased total and secondary antibody titer against SRBC compared to the negative control group ($P<0.05$). The positive control group and *in ovo* injection of Plr2 showed higher antibody titers against NDV than the negative control group ($P<0.05$). *In ovo* injection of Pls2, Plr6, and Plr4 increased serum glucose compared to control groups ($P<0.05$). *In ovo* injection of Plr4 decreased the triglyceride concentration of serum compared to the control groups at 42 days of age ($P<0.05$). *In ovo* injection of the *Lactobacillus* isolates reduced the cholesterol concentration of serum in broilers ($P<0.05$).

Conclusions: In general, the injection of *Lactobacillus* isolates used in this study, particularly Plr4 and Plr2, at the late embryonic stage as appropriate microbial compounds, may improve broiler growth performance without adversely affecting hatchability and by positively influencing the immune response and serum metabolites.

Keywords: Immune response, *In ovo* injection, Broiler, Growth performance, *Lactobasillus*

Ethics statement: This study was conducted with the full consideration of animal welfare and the approval of this study was granted by the Ethics Committee of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII).

Data availability statement: The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of interest: The authors declare no conflicts of interest.

Funding: The authors are grateful to the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North region branch (ABRII) and Ramsar Toyoor for the financial support of this project.

Acknowledgment: The authors thank the Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran-North region branch (ABRII) and Mr. Ali Lamtar Mohammadi, Managing Director of Ramsar Toyoor, for providing the necessary facilities and financial support to conduct this project.

How to cite this article:

Ghanaatparast-Rashti, M., Mottaghitalab, M., Royan, M., & Seighalani, R. (2025). Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract of Iranian native poultry on hatchability, immune response, and growth performance in broilers. *Animal Production Research*, *14*(4), 1-15. doi: 10.22124/ar.2025.31136.1909

تحقیقات تولیدات دامی

سال چهاردهم/شماره چهارم/زمستان ۱۴۰۴ (۱۵-۱)

Animal Production Research

دانشگاه گیلان

مقاله پژوهشی

اثر تزریق درون تخم‌مرغی جدایه‌های لاکتوباسیلوس از دستگاه گوارش طیور بومی ایران بر قابلیت جوجه‌درآوری، پاسخ ایمنی و عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی

معین قناعت پرست رشتی[۱]، مجید متقی طلب[۲*]، مریم رویان[۳]، رامین صیقلانی[۳]

۱- مرکز تحقیقات ابریشم کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

۲- گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان

۳- پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، رشت، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۴/۲۰ – تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۵/۱۴ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۵/۱۵ – تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۴/۰۶/۱۲)

چکیده

برای بررسی اثر تزریق درون تخم‌مرغی جدایه‌های لاکتوباسیلوس طیور بومی ایران بر قابلیت جوجه‌درآوری، پاسخ ایمنی و عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی، در روز ۱۸ دوره جوجه‌کشی، ۶۷۲ عدد تخم‌مرغ دارای جنین (سویه راس ۳۰۸) به ۲۴ واحد آزمایشی شامل شش تیمار و چهار تکرار (۲۸ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار) در قالب طرح کاملاً تصادفی تقسیم شدند. تیمارهای مرحله پرورش عبارت بودند از جوجه‌های تفریخ شده از تخم‌مرغ‌های: ۱- تزریق سرم فیزیولوژیک (سالین ۹٪، شاهد منفی)، ۲- تزریق سرم فیزیولوژیک (سالین ۹٪) به‌همراه آنتی‌بیوتیک محرک رشد (آویلامایسین) در جیره (شاهد مثبت)، ۳- تزریق جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس Pls2، ۴- تزریق جدایه لاکتوباسیلوس روتری Plr6، ۵- تزریق جدایه لاکتوباسیلوس روتری Plr4 و ۶- تزریق جدایه لاکتوباسیلوس روتری Plr2. هر یک از جدایه‌ها به‌مقدار 10^5 CFU برای تزریق در هم تخم‌مرغ مورد استفاده قرار گرفت. تزریق جدایه‌های لاکتوباسیلوسی، اثر منفی بر قابلیت جوجه‌درآوری نداشت ($P>0/05$). تزریق جدایه‌های لاکتوباسیلوسی موجب کاهش ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<0/05$). شاخص کارآیی تولید اروپایی در گروه تزریق جدایه‌های لاکتوباسیلوسی بیشتر از گروه شاهد منفی بود ($P<0/05$). تزریق Plr4 و Plr2 موجب افزایش عیار آنتی‌بادی کل اولیه و ثانویه علیه سلول‌های گلبول قرمز گوسفندی در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<0/05$). تزریق جدایه‌های لاکتوباسیلوسی موجب کاهش غلظت کلسترول سرم خون جوجه‌های گوشتی شد ($P<0/05$). استنتاج نهایی این است که تزریق لاکتوباسیلوس‌های مورد استفاده در این تحقیق به‌ویژه Plr4 و Plr2، در مراحل انتهایی جنینی به‌عنوان ترکیب میکروبی مناسب، بدون اثر منفی بر قابلیت جوجه‌درآوری ارزیابی شده و می‌توانند از راه اثرگذاری مفید بر پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های خونی موجب بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی شوند.

واژه‌های کلیدی: پاسخ ایمنی، تزریق درون تخم‌مرغی، جوجه گوشتی، عملکرد رشد، لاکتوباسیلوس

* نویسندهٔ مسئول: mmotaghi@guilan.ac.ir

doi: 10.22124/ar.2025.31136.1909

مقدمه

در تولید صنعتی طیور، رابطه بین جوجه یک روزه و مرغ مادر حذف شده و بنابراین، تشکیل جمعیت میکروبی دستگاه گوارش، اغلب به باکتری‌های موجود در محیط جوجه‌کشی و محل پرورش وابسته است (Lutful-Kabir, 2009). از طرف دیگر، جوجه‌های تولیدی ممکن است حین تفریخ، تعیین جنسیت، واکسیناسیون، انتقال و حتی پیش از مصرف اولین خوراک با عوامل بیماری‌زا مواجه شوند (Hedlund et al., 2019). با توجه به چنین احتمالی، وارد کردن باکتری‌های مفید پروبیوتیکی در دستگاه گوارش جوجه در مرحله قبل از تفریخ می‌تواند خطر آثار عوامل بیماری‌زا را کاهش دهد. اهمیت استقرار و تکثیر سویه‌های میکروبی مفید اولیه تنها از جهت جلوگیری از رشد و غلبه باکتری‌های بیماری‌زا از راه حذف رقابتی نبوده، بلکه تحریک عوامل مرتبط با رشد و بلوغ سیستم ایمنی به‌وسیله آنها نیز بسیار مهم است (Lutful-Kabir, 2009). به‌علاوه، در صنعت تولید حیوانات مزرعه‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک-های محرک رشد در جیره به‌دلیل نگرانی‌های ناشی از مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها و نیز باقیماندن آنها در محصولات، با چالش جدی مواجه شده و ممنوع اعلام شده است (Menconi et al., 2011; Bohlool et al., 2024). جایگزین‌های زیادی برای آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در صنعت طیور معرفی شده است که در بین آنها توجه به پروبیوتیک‌ها به‌دلیل اهمیت و توانایی آنها در ارتقای سلامت طیور به‌طور گسترده‌ای افزایش یافته است (Alagawany et al., 2018).

در بین پروبیوتیک‌های استفاده شده در طیور، جدایه لاکتوباسیلوس به‌علت سودمندی آن بر سلامتی دستگاه گوارش، به‌خصوص روده، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. به‌علاوه، لاکتوباسیلوس‌ها به‌طور طبیعی به‌عنوان باکتری غالب در دستگاه گوارش طیور زندگی می‌کنند (Duan et al., 2021). اثر این باکتری‌ها از راه روش‌های متفاوتی انجام می‌شود که عبارتند از: حذف رقابتی، حفظ سدهای محافظتی در روده و بهبود عملکرد سیستم ایمنی (Bermudez-Brito et al., 2012). پروبیوتیک‌ها می‌توانند موجب افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سیستم ایمنی مانند سایتوکین‌ها، اینترفرون‌ها و اینترلوکین‌ها شوند که به‌صورت مستقیم یا غیرمستقیم تولید ایمونوگلوبولین‌های M و Y سرم خون را در پاسخ به آنتی‌ژن‌ها افزایش می‌دهند (Brisbin et al., 2011).

بهترین شیوه برای اجتناب از استفاده از داروها، جلوگیری از تکثیر عوامل بیماری‌زا در اسرع وقت است (Lutful-Kabir, 2009). در طیور این‌طور فرض شده است که تکثیر و استقرار میکروبی پس از تفریخ اتفاق می‌افتد، با این حال، شواهد علمی وجود دارد که باکتری‌ها می‌توانند در مقدار اندک در روده جوجه‌ها پیش از تفریخ نیز وجود داشته باشند (Kim et al., 2011; De Oliveira et al., 2014). استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌صورت تزریق در کیسه آمنیونی تخم‌مرغ-های دارای جنین از جمله روش‌هایی است که می‌تواند جایگزینی زودهنگام باکتری‌های مفید را در دستگاه گوارش تسهیل کند (Wilson et al., 2019).

هدف از این مطالعه، بررسی تزریق درون تخم‌مرغی به‌عنوان روشی برای رساندن جدایه‌های مختلف باکتری‌های لاکتوباسیلوس از دستگاه گوارش طیور بومی ایران به روده جوجه‌های گوشتی در مراحل انتهایی جنینی و آثار آن بر قابلیت جوجه‌درآوری، سیستم ایمنی، فراسنجه‌های خونی و عملکرد رشد است.

مواد و روش‌ها

تخم‌مرغ‌ها، فرآیند جوجه‌کشی و تیمارهای آزمایشی: در این آزمایش، ۷۲۰ عدد تخم‌مرغ بارور قابل جوجه‌کشی از یک گله مرغ مادر گوشتی تجاری (سویه راس ۳۰۸) با سن ۳۸ هفته تهیه شده و پیش از آغاز دوره جوجه‌کشی به‌مدت دو روز در شرایط تجاری ذخیره شدند (De Oliveira et al., 2014). تخم‌مرغ‌ها توزین و در محدوده ۱۰ درصد وزن میانگین (۰/۲۴±۵۹/۱۶ گرم) به‌صورت تصادفی به ۲۴ گروه با توزیع وزن مشابه تقسیم شدند. سپس، تخم‌مرغ‌ها در دستگاه تخم‌گیر (Petersime, Zulte, Belgium) با دمای ۳۷/۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۶ درصد قرار گرفتند (Vieira et al., 2005). در روز ۱۵ دوره جوجه‌کشی، همه تخم‌مرغ‌ها نوربینی شده تا تخم‌مرغ‌های ترک‌دار، بدون نطفه یا حاوی جنین مرده، مشخص و حذف شوند (Kornasio et al., 2011). سپس، در روز ۱۸ دوره جوجه-کشی، ۶۷۲ تخم‌مرغ حاوی جنین به ۲۴ واحد آزمایشی شامل شش تیمار و چهار تکرار (۲۸ عدد تخم‌مرغ در هر تکرار) در قالب طرح کاملاً تصادفی تقسیم شدند و تزریق درون تخم‌مرغی انجام شد. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱-

تزریق سرم فیزیولوژیک (سالین ۹٪، شاهد منفی)، ۲- تزریق سرم فیزیولوژیک (سالین ۹٪) به‌همراه استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد (۱۰۰ میلی‌گرم در کیلوگرم آویلامایسین با خلوص ۱۰ درصد؛ ماکسیوت، شرکت داروسازی وتاک، ایران) در جیره (شاهد مثبت) در مرحله پرورش، ۳- تزریق جدایه بومی لاکتوباسیلوس سالیواریوس *Lactobacillus salivarius* NABRII58;) Pls2 MH595986) (۱۰^{۵} CFU در هر تخم‌مرغ)، ۴- تزریق جدایه بومی لاکتوباسیلوس روتری Plr6 (*Lactobacillus reuteri* ABRIG23; MF686483) (۱۰^{۵} CFU در هر تخم-مرغ)، ۵- تزریق جدایه بومی لاکتوباسیلوس روتری Plr4 (*Lactobacillus reuteri* ABRIG3; MF686463) (۱۰^{۵} CFU در هر تخم‌مرغ) و ۶- تزریق جدایه بومی لاکتوباسیلوس روتری Plr2 (*Lactobacillus reuteri* ABRIIN35; MG547731) (۱۰^{۵} CFU در هر تخم‌مرغ).

جدایه‌های لاکتوباسیلوس: یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس جداسازی شده از اردک بومی آمل، مازندران *Lactobacillus salivarius* NABRII58;) Pls2 MH595986) و سه سویه لاکتوباسیلوس روتری جداسازی شده از مرغ بومی اشنویه، ارومیه Plr2 (*Lactobacillus reuteri* ABRIIN35; MG547731)، مرغ بومی ماسال، گیلان *Lactobacillus reuteri* ABRIG3;) Plr4 MF686463) و مرغ بومی رودبار، گیلان Plr6 (*Lactobacillus reuteri* ABRIG23; MF686483) مورد استفاده در این تحقیق، حاصل از یک رویه غربالگری به-منظور یافتن باکتری‌های با قابلیت استفاده به‌عنوان پروبیوتیک طی فرآیند جداسازی جدایه‌های پروبیوتیکی از دستگاه گوارش مرغ‌های بومی شمال و شمال غربی ایران در پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری هستند (Ahmadi et al., 2023). به‌طور خلاصه، جدایه‌های لاکتوباسیلوس پس از تکثیر جداگانه در محیط کشت MRS مایع در ۳۷ درجه سلسیوس و در شرایط بی‌هوازی کشت شدند و سلول‌های باکتریایی به‌وسیله سانتریفوژ (۵۰۰۰ دور در دقیقه و به‌مدت ۱۵ دقیقه) جداسازی شده و مایع رویی خارج شد و خمیر حاصل از هر یک از سویه‌های لاکتوباسیلوسی به‌صورت جداگانه و به روش خشک کردن انجمادی، خشک شدند (Ahmadi et al., 2023). پس از تعیین غلظت باکتری‌های موجود در پودر باکتریایی خشک شده هر یک از جدایه‌ها به‌مقدار ۱۰^{۵} CFU برای تزریق در هم تخم‌مرغ مورد استفاده قرار گرفت.

شیوه تزریق درون تخم‌مرغی: در فرآیند تزریق، مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول‌های حاوی لاکتوباسیلوس‌ها از سوراخی روی قسمت پهن تخم‌مرغ به‌صورت دستی و با استفاده از سوزن شماره ۲۳ در مایع آمنیونی در عمق ۱۷ میلی‌متر تزریق شد (Ghanaatparast-Rashti et al., 2018). به‌منظور مطابقت با شرایط تزریق درون تخم‌مرغی تجاری در سن ۱۸ روز جوجه‌کشی، سوراخ ایجاد شده روی تخم‌مرغ‌ها پس از تزریق پر نشد (Zhang et al., 2018). سپس، تخم‌مرغ‌ها به دستگاه جوجه‌گیر منتقل شده و در شرایط استاندارد تجاری (دمای ۳۶/۸ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد) قرار گرفتند (Vieira et al., 2005).

پرنده‌ها، جیره و مدیریت پرورش: درصد قابلیت جوجه-درآوری بر اساس تعداد جوجه‌های خارج شده از تخم‌مرغ-های بارور محاسبه شد. از جوجه‌های خارج شده در هر تکرار، ۱۸ جوجه (۹ مرغ و ۹ خروس) به‌صورت تصادفی انتخاب، توزین و به مزرعه تجاری منتقل شدند. وزن بدن و خوراک مصرفی به‌صورت هفتگی و تلفات به‌صورت روزانه ثبت شدند. داده‌های جمع‌آوری شده مربوط به افزایش وزن و متوسط خوراک مصرفی برای محاسبه ضریب تبدیل خوراک استفاده شدند. شاخص کارآیی تولید اروپایی برای کل دوره پرورش (۱ تا ۴۲ روزگی) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Huff et al., 2013):

شاخص کارآیی تولید اروپایی= وزن بدن (کیلوگرم) ×درصد ماندگاری × ۱۰۰ /ضریب تبدیل × طول مدت آزمایش (روز)

جوجه‌های تفریخ شده در ۲۴ جایگاه (۱۲۰ × ۱۰۰ سانتیمتر) به‌مدت ۴۲ روز پرورش یافتند. هر جایگاه تا پایان هفته اول پرورش به یک دانخوری سینی و سپس، تا پایان دوره پرورش به یک دانخوری سطلی با ظرفیت ۱۵ کیلوگرم و همچنین، سه آبخوری پستانکی در کل دوره پرورش مجهز بود. طی ۷ روز اول، جوجه‌ها در دمای ۳۳ درجه سلسیوس پرورش یافتند و سپس، دما به‌صورت تدریجی به ۲۲ درجه سلسیوس در ۲۱ روزگی رسید و تا پایان دوره پرورش در ۴۲ روزگی به‌صورت ثابت حفظ شد. نوردهی ۲۴ ساعته طی دو روز اول اعمال شد و سپس، ۲۳ ساعت نور و یک ساعت تاریکی تا ۴۲ روزگی مورد استفاده قرار گرفت. شدت نور در دو روز اول، ۲۰ لوکس بود و سپس، شدت نور تا پایان دوره

پرورش، ۵ لوکس استفاده شد. دسترسی به خوراک و آب تازه در دوره آزمایش به‌صورت آزاد بود. جیره آغازین (۱ تا ۱۰ روزگی) به‌صورت کرامبل استفاده شد و برای دوره‌های رشد (۱۱ تا ۲۴ روزگی) و پایانی (۲۵ تا ۴۲ روزگی)، جیره‌ها به‌شکل پلت مورد استفاده قرار گرفتند. جیره‌های بر پایه ذرت و سویا بر اساس توصیه راس ۳۰۸ (Ross Broilers Manual, 2014) فرموله شدند (جدول ۱).

پاسخ‌های ایمنی و فراسنجه‌های خونی: در روزهای ۲۶ و ۳۳ به دو قطعه پرنده (مرغ و خروس) از هر جایگاه، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون گلبول قرمز گوسفند (SRBC) ۷ درصد شسته شده در بافر فسفات استریل، از راه سیاهرگ بال تزریق شد (Mohiti-Asli & Ghanaatparast-Rashti, 2017). سپس، ۷ روز بعد از هر بار تزریق گلبول قرمز (روزهای ۳۳ و ۴۰)، از راه سیاهرگ بال همان پرنده‌ها حدود دو میلی‌لیتر خون گرفته شد. پس از نگهداری به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق، با دور ۵۰۰۰ و به‌مدت ۳ دقیقه سانتریفوژ شده، سرم جدا و تا زمان اندازه‌گیری عیار آنتی‌بادی‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. برای تعیین عیار آنتی‌بادی تولید شده علیه SRBC از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده شده و نتیجه پایانی به‌صورت لگاریتم بر مبنای دو ثبت شد (Peterson et al., 1999). برای اندازه‌گیری ایمونوگلوبولین‌های G و M به‌عنوان عوامل پاسخ به SRBC، ابتدا عیار آنتی‌بادی مقاوم به مرکاپتااتانول که در حقیقت IgG است به‌وسیله مرکاپتااتانول ۰/۰۵ مولار با روش آگلوتیناسیون تعیین شد. تفاضل این مقدار از پاسخ کل SRBC، آنتی‌بادی حساس به مرکاپتااتانول را مشخص می‌کند، که معرف IgM است (Peterson et al., 1999).

طبق برنامه واکسیناسیون رایج منطقه، همه پرنده‌ها در روزهای ۱۵ و ۲۹ پرورش علیه بیماری نیوکاسل (سویه لاسوتا) به‌صورت آشامیدنی واکسینه شدند. به‌منظور بررسی پاسخ آنتی‌بادی به بیماری نیوکاسل و اندازه‌گیری فراسنجه‌های خونی، در روز ۲۱ و ۴۲ دوره پرورش، دو پرنده (مرغ و خروس) از میانگین وزنی هر تکرار انتخاب شده و مقدار ۵ میلی‌لیتر خون از سیاهرگ بال آنها گرفته شد. نمونه‌های خونی گرفته شده، پس از نگهداری به‌مدت ۱۲ ساعت در دمای اتاق، با دور ۵۰۰۰ و زمان ۳ دقیقه سانتریفوژ شدند و سرم آنها جدا شد. سپس، عیار آنتی‌بادی علیه آنتی‌ژن ویروس بیماری نیوکاسل با روش هماگلوتیناسیون ممانعتی (Hemagglutination Inhibition) تعیین شد (Rajput et al., 2013). به‌علاوه، مقادیر گلوکز، تری‌گلیسرید و کلسترول کل موجود در سرم بلافاصله پس از جداسازی و با استفاده از روش اسپکتروفتومتری و کیت‌های تشخیصی تجاری شرکت پارس آزمون در طول موج ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر نتایج حاصل از درصد قابلیت جوجه‌درآوری، عملکرد رشد، پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های خونی با رویه GLM نرم افزار آماری SAS نسخه ۹/۳ (SAS Institute, 2011) در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه شد. مقایسه میانگین‌ها به‌وسیله آزمون توکی در سطح خطای نوع اول برابر با پنج درصد انجام شد.

نتایج و بحث

قابلیت جوجه‌درآوری: بر اساس نتایج تحقیق حاضر، تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها، اثر معنی‌داری بر قابلیت جوجه‌درآوری و وزن بدن جوجه‌های گوشتی در روز تفریخ نداشت ($P>0/05$، جدول ۲). نتایج منتشر شده از تحقیقات محققین دیگر در زمینه اثر تزریق درون تخم‌مرغی باکتری‌های پروبیوتیکی بر قابلیت جوجه‌درآوری محدود است. با این حال، نتایج برخی تحقیقات به آثار متفاوت تزریق باکتری‌ها بر قابلیت جوجه‌درآوری اشاره دارند (Majidi-Mosleh et al., 2016). محققان گزارش داده‌اند که تزریق لاکتوباسیلوس‌ها به کیسه آمنیون در روز ۱۸ دوره جنینی، اثر منفی بر قابلیت جوجه‌درآوری ندارد (Teague et al., 2017; Beck et al., 2019; Wilson et al., 2020; Alizadeh et al., 2021). برخی محققین نیز افزایش قابلیت جوجه‌درآوری پولت‌ها در پی تزریق درون تخم‌مرغی برخی لاکتوباسیلوس‌ها را گزارش کرده‌اند (Muyyarikkandy et al., 2023). این یافته‌ها نشان می‌دهند که باکتری‌های پروبیوتیکی بررسی شده در این تحقیق، بدون نگرانی از وجود اثر منفی بر قابلیت جوجه‌درآوری، قابل استفاده هستند. عدم تأثیر تزریق درون تخم‌مرغی باکتری‌های پروبیوتیکی بر وزن جوجه‌های گوشتی در روز تفریخ، مشابه نتایج محققان پیشین بود (Majidi-Mosleh et al., 2016; Teague et al., 2017). در مقابل، تحقیقات اخیر نشان دادند که تزریق درون تخم‌مرغی برخی لاکتوباسیلوس‌ها موجب افزایش وزن پولت‌ها در روز تفریخ می‌شود که این تفاوت‌ها

در مشاهدات می‌تواند به‌دلیل تزریق در روزهای مختلف تکامل جنینی، تفاوت در روش‌های مورد استفاده، محل تزریق، سویه باکتری پروبیوتیکی و نوع پرنده مورد استفاده باشد (Muyyarikkandy et al., 2023).

عملکرد رشد: نتایج مربوط به عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی در سه هفته اول و دوم دوره پرورش در جدول ۳ خلاصه شده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد در جیره جوجه‌های گوشتی (شاهد مثبت) موجب بهبود افزایش وزن در سه هفته اول و دوم پرورش در مقایسه با گروه تزریق درون تخم‌مرغی سرم فیزیولوژیک قابل تزریق (شاهد منفی) شد ($P<۰/۰۵$)، در حالی که استفاده از لاکتوباسیلوس‌ها در مراحل پایانی دوره جنینی اثری بر وزن جوجه‌های گوشتی در سه هفته اول و دوم پرورش نداشت ($P>۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها از راه کاهش خوراک مصرفی موجب بهبود ضریب تبدیل خوراک طی سه هفته نخست و دوم پرورش شد ($P<۰/۰۵$). به‌علاوه، نتایج بهبود ضریب تبدیل خوراک در سه هفته دوم پرورش مشابه مصرف آنتی‌بیوتیک محرک رشد در جیره بود ($P>۰/۰۵$).

جدول ۱- اجزا و ترکیب شیمیایی جیره‌های مورد استفاده در آزمایش (گرم در کیلوگرم)

Table 1. Ingredients and chemical composition of the diets used in the experiment (g/kg)

Ingredients (as fed basis)	Starter (1-10 d)	Grower (11-24 d)	Finisher (25-42 d)
Corn	515.14	526.44	550.38
Wheat	50.00	70.00	100.00
Soybean meal, 44% CP	372.41	335.05	280.51
Soybean oil	17.46	27.26	31.10
Monocalcium phosphate	14.48	13.88	12.36
Calcium carbonate	15.11	13.35	12.06
Common salt	2.32	2.48	2.50
L-Lysine HCl, 78%	2.47	1.96	1.91
DL-Methionine, 99%	3.07	2.61	2.35
L-Threonine, 98%	1.03	0.67	0.51
Vitamin premix[1]	2.50	2.50	2.50
Mineral premix[2]	2.50	2.50	2.50
Sodium bicarbonate	1.51	1.30	1.32
Total	1000	1000	1000
Calculated composition[3]			
Metabolizable energy, kcal/kg	2850	2950	3050
Crude protein, g/kg	218.62	204.60	185.86
Dig. Lysine, g/kg	12.16	10.94	9.72
Dig. Methionine, g/kg	6.02	5.41	4.95
Dig. Methionine + Cystine, g/kg	9.02	8.28	7.62
Dig. Threonine, g/kg	8.17	7.33	6.48
Calcium, g/kg	9.12	8.28	7.43
Available phosphorus, g/kg	4.56	4.35	3.90
Total phosphorus, g/kg	7.27	6.99	6.45
Sodium, g/kg	1.52	1.52	1.53
Potassium, g/kg	9.29	8.89	8.36
Chloride, g/kg	2.30	2.30	2.30

[1] Vitamin premix provided the following per kilogram of diet: vitamin A (*trans*-retinyl acetate), 10000 IU, vitamin D_3 (cholecalciferol), 5000 IU, vitamin E (DL- α-tocopherol acetate), 50 IU, vitamin K_3 (bisulfate menadione complex), 3 mg, thiamine (thiamine mononitrate), 3 mg, riboflavin, 9 mg, nicotinic acid, 50 mg, pantothenic acid (D-calcium pantothenate), 15 mg, vitamin B_6, 4 mg, D-biotin, 0.1 mg, folic acid, 2 mg, vitamin B_{12} (cyanocobalamin), 0.02 mg and choline (choline chloride), 1000 mg; [2] Mineral premix provided the following per kilogram of diet: iron ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), 55 mg, iodine ($Ca(IO_3)_2$), 1.3 mg, manganese ($MnSO_4 \cdot H_2O$), 120 mg, zinc (ZnO), 100 mg, copper ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), 16 mg, selenium (Na_2SeO_3), 0.3 mg; [3] Calculated nutrient content was based on ingredient composition data from NRC (1994).

جدول ۲- اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر قابلیت جوجه‌درآوری و وزن بدن جوجه‌های گوشتی در روز تفریخ
Table 2. Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* on hatchability and body weight of broilers on the day of hatch

Item	Egg weight (g)	Hatchability (%)	Body weight on day of hatch (g)
NC[1]	59.07	99.04	41.28
PC[2]	59.23	98.15	41.25
Pls2[3]	59.18	99.04	41.13
Plr6[4]	59.17	99.11	41.22
Plr4[5]	59.13	98.18	40.78
Plr2[6]	59.17	98.08	40.88
SEM[7] (n=4)	0.134	1.011	0.400
P-value	0.970	0.932	0.920

[1] Negative control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline; [2] Positive control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline and dietary supplementation of avilamycin as a growth promoter antibiotic; [3] *Lactobacillus salivarius* NABRII58 (MH595986); [4] *Lactobacillus reuteri* ABRIG23 (MF686483); [5] *Lactobacillus reuteri* ABRIG3 (MF686463); [6] *Lactobacillus reuteri* ABRIIN35 (MG547731); [7] SEM: Standard error of the means

جدول ۳- اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی ۱ تا ۲۱ و ۲۲ تا ۴۲ روزگی
Table 3. Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* on growth performance of broilers at 1 to 21 and 22 to 42 days of age

	1-21 days of age			22-42 days of age		
Item	BWG[1] (g/d)	ADFI[2] (g/d)	FCR[3] (g/g)	BWG (g/d)	ADFI (g/d)	FCR (g/g)
NC[4]	34.81[bc]	53.48[a]	1.537[a]	71.07[b]	151.93[a]	2.138[a]
PC[5]	41.75[a]	53.53[a]	1.282[c]	82.01[a]	159.35[a]	1.945[b]
Pls2[6]	34.25[c]	48.31[c]	1.411[b]	69.89[b]	133.40[b]	1.907[b]
Plr6[7]	34.71[bc]	48.26[c]	1.391[b]	70.64[b]	133.54[b]	1.891[b]
Plr4[8]	35.22[bc]	50.33[bc]	1.430[b]	70.42[b]	133.84[b]	1.901[b]
Plr2[9]	36.85[b]	52.45[ab]	1.424[b]	74.66[b]	137.56[b]	1.842[b]
SEM[10] (n=4)	0.549	0.665	0.0205	1.332	3.054	0.0267
P-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

[a-c] Means within a column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)
[1] Body weight gain; [2] Average daily feed intake; [3] Feed conversion ratio; [4] Negative control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline; [5] Positive control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline and dietary supplementation of avilamycin as a growth promoter antibiotic; [6] *Lactobacillus salivarius* NABRII58 (MH595986); [7] *Lactobacillus reuteri* ABRIG23 (MF686483); [8] *Lactobacillus reuteri* ABRIG3 (MF686463); [9] *Lactobacillus reuteri* ABRIIN35 (MG547731); [10] SEM: Standard error of the means

جدول ۴ نتایج مربوط به عملکرد کل دوره پرورش را نشان می‌دهد. استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد در جیره جوجه‌های گوشتی (شاهد مثبت) موجب بالاترین افزایش وزن در مقایسه با سایر گروه‌های آزمایشی شد ($P<۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها منجر به کاهش خوراک مصرفی در مقایسه با شاهد منفی و مثبت شد ($P<۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها و نیز گروه شاهد مثبت، موجب کاهش ضریب تبدیل خوراک در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<۰/۰۵$). درصد تلفات در بین گروه‌های آزمایشی، اختلاف معنی‌داری نداشت ($P>۰/۰۵$). شاخص کارآیی تولید اروپایی در گروه شاهد مثبت و نیز تزریق لاکتوباسیلوس‌ها بیشتر از گروه شاهد منفی بود ($P<۰/۰۵$). در بین لاکتوباسیلوس‌هایی که در تزریق درون تخم‌مرغی مورد استفاده قرار گرفتند، گروه Plr2، شاخص کارآیی تولید اروپایی مشابه با گروه شاهد مثبت نشان داد ($P>۰/۰۵$). نتایج تحقیقات محدودی در زمینه بررسی آثار بلندمدت تزریق درون تخم‌مرغی باکتری‌های پروبیوتیکی مانند لاکتوباسیلوس‌ها بر عملکرد جوجه‌های گوشتی در دسترس است. در یک تحقیق، اثر تزریق درون تخم‌مرغی باکتری‌های پروبیوتیکی تا سن ۱۸ روزگی جوجه‌های گوشتی بررسی شده که حاکی از اثر مثبت بر بهبود عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی است (De Oliveira et al., 2014). نتایج بیشتر تحقیقات با بررسی اثر بلندمدت استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی در جوجه‌های گوشتی مربوط به استفاده از آنها در جیره است. بر این اساس، برخی محققان گزارش دادند که استفاده از پروبیوتیک‌های حاوی لاکتوباسیلوس روتری در جیره جوجه‌های گوشتی موجب بهبود عملکرد رشد از راه بهبود وزن بدن، کاهش خوراک

مصرفی و کاهش ضریب تبدیل خوراک می‌شود (Bhogoju et al., 2021; Melese et al., 2025)، در حالی که برخی دیگر اثر مثبت استفاده از لاکتوباسیلوس‌های روتری (Jaiswal et al., 2022; Tsega et al., 2024) و سالیواریوس (Tsega et al., 2024) در جیره جوجه‌های گوشتی را بر خوراک مصرفی و ضریب تبدیل خوراک گزارش نکردند. پروبیوتیک‌ها از مسیر تغییر ترکیب میکربیوتای دستگاه گوارش به نفع پرنده میزبان موجب بهبود عملکرد رشد می‌شوند (Pender et al., 2017). با توجه به عدم توسعه بهینه جمعیت میکروبی دستگاه گوارش طیور در سنین آغازین، استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی حتی پیش از تفریخ می‌توانند موجب استقرار باکتری‌های مفید شده، در نتیجه از راه حذف رقابتی باعث کاهش تکثیر، رشد و استقرار جمعیت میکروبی مضر شوند (Lutful-Kabir, 2009; Wilson et al., 2019). باکتری‌های پروبیوتیکی از راه افزایش جمعیت باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسیلوس‌ها در مجاری گوارشی طیور و تولید اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها موجب جلوگیری از تکثیر باکتری‌های بیماری‌زا همچون *اشریشیاکلی* و خنثی‌سازی سموم تولیدی آنها می‌شوند که نتیجه آن، بهبود عملکرد رشد پرنده از مسیر کاهش ضریب تبدیل خوراک است. به‌طور کلی، سلامت و عملکرد رشد طیور به جایگزینی و توسعه جمعیت میکروبی سالم و متعادل در دستگاه گوارش آنها مرتبط است (Pan & Yu, 2014). در مقابل یافته‌های این تحقیق، برخی محققان اثر معنی‌داری را بر عملکرد جوجه‌های گوشتی تا ۲۴ روزگی گزارش نکردند (Majidi-Mosleh et al., 2016). این تناقض‌ها در نتایج می‌تواند به‌دلیل استفاده از روش‌های متفاوت استفاده از پروبیوتیک‌ها، مقدار تراکم باکتری مصرفی، زنده‌مانی باکتری مورد استفاده و نوع آن‌ها باشد (Mountzouris et al., 2007; Bhogoju et al., 2021).

سیستم ایمنی: نتایج مربوط به اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر تولید آنتی‌بادی و عیار نیوکاسل جوجه‌های گوشتی در جدول ۵ نشان داده شده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد در جیره جوجه‌های گوشتی (شاهد مثبت) و تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها موجب افزایش عیار آنتی‌بادی کل اولیه علیه SRBC در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی Plr2 و Plr4 موجب افزایش عیار IgG اولیه در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<۰/۰۵$). در بین سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). جوجه‌های گوشتی درگروه شاهد مثبت و نیز با تزریق درون تخم‌مرغی Plr2 و Plr4، عیار آنتی‌بادی کل اولیه علیه SRBC بالاتری در مقایسه با گروه شاهد منفی نشان دادند ($P<۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی Plr2 و Plr4 موجب افزایش عیار IgG ثانویه در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<۰/۰۵$). عیار IgG ثانویه در بین سایر تیمارهای آزمایشی معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). عیار IgM در جوجه‌های گوشتی تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نداشت ($P>۰/۰۵$). استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد در جیره جوجه‌های گوشتی (شاهد مثبت) موجب افزایش عیار نیوکاسل در مقایسه با گروه شاهد منفی شد ($P<۰/۰۵$). عیار نیوکاسل در گروه‌های تزریق لاکتوباسیلوس‌ها مشابه گروه شاهد مثبت بود ($P>۰/۰۵$). به‌علاوه، در بین تیمارهای آزمایشی، تزریق درون تخم‌مرغی Plr2 موجب افزایش معنی‌دار عیار نیوکاسل در مقایسه با شاهد منفی در ۳۳ روزگی شد ($P<۰/۰۵$). در توافق با یافته‌های این پژوهش، محققان گزارش دادند که تزریق درون تخم‌مرغی پروبیوتیک‌های حاوی لاکتوباسیلوس‌های روتری و سالیواریوس در مراحل پایانی دوره جنینی موجب افزایش عیار IgG سرم خون شد (Alizadeh et al., 2020). همچنین، محققان گزارش دادند که استفاده از پروبیوتیک‌های حاوی لاکتوباسیلوس روتری در جیره طیور موجب افزایش عیار آنتی‌بادی کل (Gonmei et al., 2019; Mohsin et al., 2022) و IgG می‌شود (Mohsin et al., 2022; Chai et al., 2023). نتایج پژوهش‌ها در مورد اثر تزریق درون تخم‌مرغی باکتری‌های پروبیوتیکی بر عیار نیوکاسل در دسترس نیست، اما استفاده از باکتری پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس روتری در جیره طیور منجر به افزایش عیار نیوکاسل شد که این پاسخ ایمنی می‌تواند به جوجه‌های گوشتی کمک کند تا مقاومت بهتری در مواجهه با این بیماری داشته باشند (Melese et al., 2025). پروبیوتیک‌ها از مسیر افزایش پاسخ سلول‌های ایمنی T، موجب تحریک بیگانه‌خواری شده که منتج به افزایش ترشح IgG می‌شوند (Awais et al., 2019). نتایج تحقیقات نشان داده است که استفاده از باکتری‌های اسیدلاکتیکی در جیره طیور موجب تحریک تولید لنفوسیت‌ها، خصوصاً نوع B شده که نهایتاً منجر به تولید بیشتر آنتی‌بادی‌ها می‌شود (Apata, 2008). از طرف دیگر، باکتری‌های پروبیوتیکی

می‌توانند ویتامین‌های گروه B را تولید کنند که موجب تحریک پاسخ ایمنی خواهد شد (Lehman, 2014). بهبود سیستم ایمنی از راه تزریق درون تخم‌مرغی پروبیوتیک‌ها و استقرار هر چه زودتر جمعیت میکروبی مفید در دستگاه گوارش طیور موجب افزایش سلامتی کلی بدن طیور می‌شود. همین امر منجر به کاهش نیاز به استفاده از داروها بخصوص آنتی‌بیوتیک‌ها برای کاهش عفونت‌ها خواهد شد. علی‌رغم تعداد بالای مقالات منتشر شده در زمینه کارآیی پروبیوتیک‌ها در طیور، نحوه عمل پروبیوتیک‌ها در بهبود سیستم ایمنی طیور به‌خوبی قابل درک نیست. از این رو، درک بهتر عملکرد پروبیوتیک‌ها در مورد پاسخ ایمنی طیور در مواجه با عوامل بیماری‌زا نیازمند انجام تحقیق‌های بیشتر است (Pender et al., 2017).

فراسنجه های خونی: نتایج مربوط به اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی در جدول ۶ خلاصه شده است. استفاده از آنتی‌بیوتیک محرک رشد و تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها به‌جز Pls2 اثری بر غلظت گلوکز سرم خون جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی نداشت ($P>0/05$). در بین لاکتوباسیلوس‌های استفاده شده در این آزمایش، Pls2 موجب افزایش غلظت گلوکز سرم خون جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی در مقایسه با شاهد منفی شد ($P<0/05$).

جدول ۴- اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر عملکرد رشد جوجه‌های گوشتی ۱ تا ۴۲ روزگی

Table 4. Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* on growth performance of broilers at 1 to 42 days of age

Item	BW[1] (g)	BWG[2] (g/d)	ADFI[3] (g/d)	FCR[4] (g/g)	Mortality (%)	EPEF[5]
NC[6]	2264.69^{bc}	52.94^{bc}	102.71^{a}	1.940^{a}	1.56	273.80^{d}
PC[7]	2640.22^{a}	61.88^{a}	106.43^{a}	1.721^{b}	1.56	359.48^{a}
Pls2[8]	2227.98^{c}	52.07^{c}	90.86^{b}	1.745^{b}	0.00	304.13^{c}
Plr6[9]	2253.63^{bc}	52.68^{bc}	90.90^{b}	1.726^{b}	0.00	310.97^{bc}
Plr4[10]	2259.16^{bc}	52.82^{bc}	92.09^{b}	1.744^{b}	0.00	308.72^{bc}
Plr2[11]	2382.53^{b}	55.75^{b}	95.01^{b}	1.704^{b}	0.00	332.99^{ab}
SEM[12] (n=4)	33.506	0.793	1.509	0.0193	0.902	5.996
P-value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.564	0.001

[a-d] Means within a column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

[1] Body weight; [2] Body weight gain; [3] Average daily feed intake; [4] Feed conversion ratio; [5] European production efficiency factor; [6] Negative control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline; [7] Positive control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline and dietary supplentation of avilamycin as a growth promoter antibiotic; [8] *Lactobacillus salivarius* NABRII58 (MH595986); [9] *Lactobacillus reuteri* ABRIG23 (MF686483); [10] *Lactobacillus reuteri* ABRIG3 (MF686463); [11] *Lactobacillus reuteri* ABRIIN35 (MG547731); [12] SEM: Standard error of the means

جدول ۵- اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر عیار آنتی‌بادی‌ها و نیوکاسل سرم جوجه‌های گوشتی (لگاریتم بر مبنای دو)

Table 5. Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* on serum antibody and Newcastle titers (log_2) of broilers

	Primary (33 days of age)			Secondary (40 days of age)			NAT[1]	
Item	Total antibody	IgG	IgM	Total antibody	IgG	IgM	21 d	42 d
NC[2]	4.88^{c}	3.00^{b}	1.88	5.63^{b}	3.63^{b}	2.00	4.88^{b}	4.50^{b}
PC[3]	7.00^{ab}	4.38^{ab}	2.63	7.88^{a}	5.50^{ab}	2.38	6.63^{a}	6.13^{a}
Pls2[4]	7.25^{ab}	4.38^{ab}	2.88	7.38^{ab}	5.25^{ab}	2.13	5.50^{ab}	5.13^{ab}
Plr6[5]	6.50^{b}	4.25^{ab}	2.25	7.25^{ab}	5.00^{ab}	2.25	5.50^{ab}	5.13^{ab}
Plr4[6]	7.63^{ab}	5.00^{a}	2.63	8.38^{a}	6.63^{a}	1.75	5.38^{ab}	5.25^{ab}
Plr2[7]	7.88^{a}	5.50^{a}	2.38	8.75^{a}	7.25^{a}	1.50	6.38^{a}	5.63^{ab}
SEM[8] (n=8)	0.323	0.434	0.313	0.474	0.624	0.287	0.320	0.345
P-value	0.001	0.007	0.298	0.001	0.004	0.288	0.003	0.045

[a-c] Means within a column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

[1] Newcastle antibody titers; [2] Negative control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline; [3] Positive control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline and dietary supplementation of avilamycin as a growth promoter antibiotic; [4] *Lactobacillus salivarius* NABRII58 (MH595986); [5] *Lactobacillus reuteri* ABRIG23 (MF686483); [6] *Lactobacillus reuteri* ABRIG3 (MF686463); [7] *Lactobacillus reuteri* ABRIIN35 (MG547731); [8] SEM: Standard error of the means

تفاوت معنی‌داری در غلظت تری‌گلیسیرید سرم خون جوجه‌های گوشتی در بین گروه شاهد مثبت، منفی و تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها در سن ۲۱ روزگی وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). با این حال، تزریق درون تخم‌مرغی Plr2 موجب کاهش غلظت تری‌گلیسیرید سرم خون جوجه-های گوشتی در مقایسه با Pls2 شد ($P<۰/۰۵$). تفاوت غلظت کلسترول سرم خون جوجه‌های گوشتی در سن ۲۱ روزگی در بین گروه‌های آزمایشی معنی‌دار نبود ($P>۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی Pls2، Plr6 و Plr4 موجب افزایش غلظت گلوکز سرم خون در سن ۴۲ روزگی در مقایسه با گروه‌های شاهد منفی و مثبت شد ($P<۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی Plr4 موجب کاهش غلظت تری‌گلیسیرید سرم خون در سن ۴۲ روزگی در مقایسه با گروه‌های شاهد منفی و مثبت شد ($P<۰/۰۵$) و تفاوت معنی‌داری بین سایر گروه-ها مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌های مورد استفاده در این تحقیق موجب کاهش غلظت کلسترول سرم خون جوجه‌های گوشتی در سن ۴۲ روزگی در مقایسه با گروه‌های شاهد منفی و مثبت شد ($P<۰/۰۵$). در توافق با نتایج این پژوهش، محققان گزارش داده‌اند که استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس روتری در جیره جوجه‌های گوشتی منجر به افزایش غلظت گلوکز سرم خون می‌شود (Wang et al., 2019). پیشنهاد شده است که لاکتوباسیلوس روتری می-تواند از مسیر ترشح اندوگلوکاناز و اسیدهای آلی بر گلوکز و ترکیب چربی‌های خون طیور اثر بگذارد (Wang et al., 2019). به‌علاوه، محققین گزارش دادند که به‌دلیل افزایش فعالیت آنزیمی و ظرفیت جذب دستگاه گوارش در نتیجه استفاده از پروبیوتیک‌ها نیز غلظت گلوکز خون جوجه‌های گوشتی می‌تواند افزایش می‌یابد (Awad et al., 2009; Wang & Gu, 2010; Zou et al., 2022). در مقابل، محققین دیگری، اثر کاهشی گلوکز خون را در پی استفاده از پروبیوتیک‌ها در جیره جوجه‌های گوشتی گزارش کرده‌اند (Reuben et al., 2022). اختلافات مشاهده شده در نتایج بین پژوهش‌ها می‌تواند به‌دلیل تفاوت‌ها در نوع و مقدار پروبیوتیک‌های مورد استفاده باشد که دلیل اصلی نیاز برای انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه است (Zou et al., 2022).

در توافق با یافته‌های محققان پیشین، استفاده از باکتری-های پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس روتری در جیره جوجه‌های گوشتی می‌تواند موجب کاهش کلسترل (Chai et al., 2023; Melese et al., 2025) و تری‌گلیسیرید (Chai et al., 2023) سرم خون شود. نحوه عمل پروبیوتیک-ها در این زمینه کاملاً مشخص نیست، اما محققین احتمال می‌دهند که باکتری‌های پروبیوتیکی می‌توانند از راه وارد کردن کلسترول به دیواره سلولی خود، هیدرولیز نمک‌های صفراوی و ممانعت از فعالیت آنزیم هیدروکسی متیل گلوتاریل-کوآنزیم آ (آنزیم محدودکننده سرعت تولید کلسترول)، موجب کاهش ذخایر کلسترول بدن شوند (Kalavathy et al., 2003). پروبیوتیک‌ها از راه تولید آنزیم هیدرولاز موجب جدا کردن گلایسین یا تائورین از نمک‌های صفراوی در روده شده و در نتیجه از ساخت کلسترول جلوگیری می‌کنند. نمک‌های صفراوی بدون گلایسین یا تائورین در pH پایین، محلولیت اندکی دارند و کمتر از روده جذب شده و از راه مدفوع دفع شده و در نهایت، موجب کاهش کلسترول خون می‌شود (Alkhalf et al., 2010). بنابراین، اثر کاهنده کلسترول در پی استفاده از باکتری‌های پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس روتری در تغذیه مرغ گوشتی، می‌تواند پیامدهایی برای بهبود سلامت قلب و عروق، کیفیت گوشت، راندمان خوراک و به‌طور کلی، کارآیی و پایداری صنعت تولید مرغ گوشتی داشته باشد (Melese et al., 2025).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این تحقیق، تزریق درون تخم‌مرغی جدایه-های لاکتوباسیلوس روتری و سالیواریوس از دستگاه گوارش طیور بومی ایران که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند اثر منفی بر قابلیت جوجه‌درآوری نداشته و می‌تواند از راه اثرگذاری مفید بر پاسخ ایمنی و تغییر فراسنجه‌های خونی موجب بهبود عملکرد جوجه‌های گوشتی شوند. یافته‌های این تحقیق پیشنهاد می‌کند که تزریق درون تخم-مرغی جدایه‌های لاکتوباسیلوسی می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای مکمل‌سازی آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد در جیره مورد استفاده قرار گیرند. همچنین، در میان جدایه‌های مورد استفاده در این آزمایش، تزریق درون تخم-مرغی لاکتوباسیلوس روتری Plr4 (*Lactobacillus reuteri* ABRIG3; MF686463) و Plr2 (*Lactobacillus reuteri* ABRIIN35; MG547731) در مراحل پایانی دوره جنینی، آثار مفید بیشتری در مقایسه با سایرین بر عملکرد

رشد، پاسخ ایمنی و فراسنجه‌های خونی جوجه‌های گوشتی نشان دادند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از مدیریت و کارشناسان پژوهشکده بیوتکنولوژی جانوری رشت و آقای مهندس علی لمتر محمدی مدیر عامل محترم شرکت رامسر طیور بابت استفاده از امکانات آزمایشگاهی، مشاوره تخصصی و حمایت مالی از این طرح، کمال سپاسگزاری و تشکر را دارند.

جدول ۶- اثر تزریق درون تخم‌مرغی لاکتوباسیلوس‌ها بر فراسنجه‌های سرم جوجه‌های گوشتی (میلی گرم در دسی لیتر)

Table 6. Effect of *in ovo* injection of *Lactobacillus* on serum metabolites of broilers (mg/dL)

	21 days of age			42 days of age		
Item	Glucose	TG[1]	TCHO[2]	Glucose	TG	TCHO
NC[3]	189.64[b]	65.68[ab]	118.24	137.05[c]	73.27[a]	82.13[a]
PC[4]	191.01[b]	71.22[ab]	115.47	148.48[c]	75.84[a]	87.50[a]
Pls2[5]	211.90[a]	75.39[a]	117.67	256.98[a]	68.08[ab]	65.39[b]
Plr6[6]	204.01[ab]	69.76[ab]	119.29	274.09[a]	63.89[ab]	64.14[b]
Plr4[7]	186.55[b]	62.02[ab]	118.29	198.8[b]	53.82[b]	62.74[b]
Plr2[8]	190.04[b]	59.52[b]	109.36	169.77[bc]	65.17[ab]	67.83[b]
SEM[9] (n=8)	4.941	3.446	5.112	8.395	8.395	3.292
P-value	0.004	0.021	0.763	0.001	0.002	0.001

[a-c] Means within a column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

[1] Triglyceride; [2] Total cholesterol; [3] Negative control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline; [4] Positive control: *In ovo* injection of 0.9% sterile saline and dietary supplementation of avilamycin as a growth promoter antibiotic; [5] *Lactobacillus salivarius* NABRII58 (MH595986); [6] *Lactobacillus reuteri* ABRIG23 (MF686483); [7] *Lactobacillus reuteri* ABRIG3 (MF686463); [8] *Lactobacillus reuteri* ABRIIN35 (MG547731); [9] SEM: Standard error of the means

فهرست منابع

Ahmadi, R., Mottaghitalab, M., Royan, M., & Seighalani, R. (2023). The effect of *Lactobacillus reuteri* isolated from gastrointestinal tract of Iranian native poultry on growth performance, carcass characteristics, blood parameters and immune response of broiler chickens. *Research on Animal Production*, *13*(38), 38-48. doi: 10.52547/rap.13.38.38 [In Persian]

Alagawany, M., Abd El-Hack, M. E., Farag, M. R., Sachan, S., Karthik, K., & Dhama, K. (2018). The use of probiotics as eco-friendly alternatives for antibiotics in poultry nutrition. *Environmental Science and Pollution Research*, *25*(11), 10611-10618. doi: 10.1007/s11356-018-1687-x

Alizadeh, M., Bavananthasivam, J., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Alqazlan, N., & Sharif, S. (2021). *In ovo* and oral administration of probiotic *Lactobacilli* modulate cell-and antibody-mediated immune responses in newly hatched chicks. *Frontiers in Immunology*, *12*(12), 664387. doi: 10.3389/fimmu.2021.664387

Alizadeh, M., Shojadoost, B., Astill, J., Taha-Abdelaziz, K., Karimi, S. H., Bavananthasivam, J., & Sharif, S. (2020). Effects of *in ovo* inoculation of multi-Strain *Lactobacilli* on cytokine gene expression and antibody-mediated Immune responses in chickens. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*(105), 1-11. doi: 10.3389/fvets.2020.00105

Alkhalf, A., Alhaj, M., & Al-Homidan, I. (2010). Influence of probiotic supplementation on blood parameters and growth performance in broiler chickens. *Saudi Journal of Biological Sciences*, *17*(3), 219-225. doi: 10.1016/j.sjbs.2010.04.005

Apata, D. F. (2008). Growth performance, nutrient digestibility and immune response of broiler chicks fed diets supplemented with a culture of *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *88*(7), 1253-1258. doi: 10.1002/jsfa.3214

Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S., & Böhm, J. (2009). Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance, organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*, *88*(1), 49-56. doi: 10.3382/ps.2008-00244

Awais, M. M., Jamal, M. A., Akhtar, M., Hameed, M. R., Anwar, M. I., & Ullah, M. I. (2019). Immunomodulatory and ameliorative effects of *Lactobacillus* and *Saccharomyces* based probiotics on pathological effects of eimeriasis in broilers. *Microbial Pathogenesis*, *126*, 101-108. doi: 10.1016/j.micpath.2018.10.038

Beck, C. N., McDaniel, C. D., Wamsley, K. G., & Kiess, A. S. (2019). The potential for inoculating *Lactobacillus* animalis and *Enterococcus faecium* alone or in combination using commercial *in ovo* technology without negatively impacting hatch and post-hatch performance. *Poultry Science*, *98*(12), 7050-7062. doi: 10.3382/ps/pez441

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *61*(2), 160-174. doi: 10.1159/000342079

Bhogoju, S., Khwatenge, C. N., Taylor-Bowden, T., Akerele, G., Kimathi, B. M., Donkor, J., & Nahashon, S. N. (2021). Effects of *Lactobacillus reuteri* and *Streptomyces coelicolor* on growth performance of broiler chickens. *Microorganisms*, *9*(6), 1341. doi: 10.3390/microorganisms9061341

Bohlool, Z., Hashemi, S. R., Sadeghi, A., Jafari, S. M., Heidari, M., & Seifdavati, J. (2024). Evaluation of probiotic properties of predominant lactic acid bacteria isolated from the gastrointestinal tract and reproductive system of Ross 308 broiler breeders. *Animal Production Research*, *12*(4), 37-49. doi: 10.22124/AR.2024.24901.1775 [In Persian]

Brisbin, J. T., Gong, J., Orouji, S., Esufali, J., Mallick, A. I., Parvizi, P., & Sharif, S. (2011). Oral treatment of chickens with *Lactobacilli* influences elicitation of immune responses. *Clinical and Vaccine Immunology*, *18*(9), 1447-1455. doi: 10.1128/CVI.05100-11

Chai, C., Guo, Y., Mohamed, T., Bumbie, G. Z., Wang, Y., Zeng, X., & Sun, W. (2023). Dietary *Lactobacillus reuteri* Sl001 improves growth performance, health-related parameters, intestinal morphology and microbiota of broiler chickens. *Animals*, *13*(10), 1690. doi: doi.org/10.3390/ani13101690

De Oliveira, J. E., Van der Hoeven-Hangoor, E., Van de Linde, I. B., Montijn, R. C., & Van Der Vossen, J. M. B. M. (2014). *In ovo* inoculation of chicken embryos with probiotic bacteria and its effect on posthatch *Salmonella* susceptibility. *Poultry Science*, *93*(4), 818-829. doi: 10.3382/ps.2013-03409

Duan, A. Y., Ju, A. Q., Zhang, Y. N., Qin, Y. J., Xue, L. G., Ma, X., & Yang, S. B. (2021). The effects of *in ovo* injection of synbiotics on the early growth performance and intestinal health of chicks. *Frontiers in Veterinary Science*, *8*, 658301. doi: 10.3389/fvets.2021.658301

Ghanaatparast-Rashti, M., Mottaghitalab, M., & Ahmadi, H. (2018). *In ovo* feeding of nutrients and its impact on post-hatching water and feed deprivation up to 48 hr, energy status and jejunal morphology of chicks using response surface models. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, *102*(2), e806-e817. doi: 10.1111/jpn.12838

Gonmei, G., Sapcota, D., Saikia, G. K., Deka, P., Mahanta, J. D., Kalita, N., & Talukdar, J. K. (2019). Studies on immune response to Newcastle disease virus in broiler chickens fed with *Lactobacillus reuteri* PIA16 isolated from the gut of indigenous chicken of Assam, India. *Veterinary World*, *12*(8), 1251. doi: 10.14202/vetworld.2019.1251-1255

Hedlund, L., Whittle, R., & Jensen, P. (2019). Effects of commercial hatchery processing on short-and long-term stress responses in laying hens. *Scientific Reports*, *9*(1), 2367. doi: 10.1038/s41598-019-38817-y

Huff, G. R., Huff, W. E., Jalukar, S., Oppy, J., Rath, N. C., & 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. doi: 10.3382/ps.2012-02787

JaiswaL, S. K., Tomar, S., Saxena, V., & Uniyal, S. (2022). Supplementation of *Lactobacillus reuteri* isolated from red jungle fowl along with mannanoligosaccaride improves growth performance, immune response and gut health in broiler Chicken. *Indian Journal of Animal Sciences*, *93*(6), 572-577. doi: 10.21203/rs.3.rs-1645541/v2

Kalavathy, R., Abdullah, N., Jalaludin, S., & Ho, Y. W. (2003). Effects of *Lactobacillus* cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. *British Poultry Science*, *44*(1), 139-144. doi: 10.1080/0007166031000085445

Kim, G. B., Seo, Y. M., Kim, C. H., & Paik, I. K. (2011). Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers. *Poultry Science*, *90*(1), 75-82. doi: 10.3382/ps.2010-00732

Kornasio, R., Halevy, O., Kedar, O., & Uni, Z. (2011). Effect of *in ovo* feeding and its interaction with timing of first feed on glycogen reserves, muscle growth, and body weight. *Poultry Science*, *90*(7), 1467-1477. doi: 10.3382/ps.2010-01080

Lehman, D. C. (2014). Biochemical identification of gram-negative bacteria. Textbook of iagnostic Microbiology-E-Book. 182 p.

Lutful-Kabir, S. M. (2009). The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, *10*(8), 3531-3546. doi: 10.3390/ijms10083531

Majidi-Mosleh, A., Sadeghi, A. A., Mousavi, S. N., Chamani, M., & Zarei, A. (2017). Ileal MUC2 gene expression and microbial population, but not growth performance and immune response, are influenced by *in ovo*

injection of probiotics in broiler chickens. *British Poultry Science*, *58*(1), 40-45. doi: 10.1080/00071668.2016.1237766

Melese, K., Alemu, T., & Desalegn, A. (2025). Probiotic effects of *Lactobacillus reuteri* and *Pediococcus pentosaceus* on growth performance, blood biochemistry, and antibody response in broiler chickens. *Brazilian Journal of Microbiology*, *56*(2), 1333-1343. doi: 10.1007/s42770-024-01593-7

Menconi, A. A., Wolfenden, A. D., Shivaramaiah, S., Terraes, J. C., Urbano, T., Kuttel, J., & Tellez, G. (2011). Effect of lactic acid bacteria probiotic culture for the treatment of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in neonatal broiler chickens and turkey poults. *Poultry Science*, *90*(3), 561-565. doi: 10.3382/ps.2010-01220

Mohiti-Asli, M., & Ghanaatparast-Rashti, M. (2017). Feeding antioxidant vitamin and vegetable oils to broilers: vitamin E reduced negative effect of soybean oil on immune response and meat lipid oxidation. *Animal Production Science*, *58*(10), 1829-1836. doi.org/10.1071/AN16677

Mohsin, M., Zhang, Z., & Yin, G. (2022). Effect of probiotics on the performance and intestinal health of broiler chickens infected with *Eimeria tenella*. *Vaccines*, *10*(1), 97. doi: 10.3390/vaccines10010097

Mountzouris, K. C., Tsirtsikos, P., Kalamara, E., Nitsch, S., Schatzmayr, G., & Fegeros, K. (2007). Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science*, *86*(2), 309-317. doi: 10.1093/ps/86.2.309

Muyyarikkandy, M. S., Mathew, E., Kuttappan, D., & Amalaradjou, M. A. (2023). Research Note: *In ovo* and in-feed probiotic supplementation improves layer embryo and pullet growth. *Poultry Science*, *102*(12), 103092. doi: 10.1016/j.psj.2023.103092

Pan, D., & Yu, Z. (2014). Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, *5*(1), 108-119. doi: 10.4161/gmic.26945

Pender, C. M., Kim, S., Potter, T. D., Ritzi, M. M., Young, M., & Dalloul, R. A. (2017). *In ovo* supplementation of probiotics and its effects on performance and immune-related gene expression in broiler chicks. *Poultry Science*, *96*(5), 1052-1062. doi: 10.3382/ps/pew381

Peterson, A. L., Qureshi, M. A., Ferket, P. R., & Fuller, J. C. (1999). Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β-hydroxy-β-methylbutyrate. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, *21*(2), 307-330. doi: 10.3109/08923979909052765

Rajput, N., Naeem, M., Ali, S., Zhang, J. F., Zhang, L., & Wang, T. (2013). The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poultry Science*, *92*(5), 1177-1185. doi: 10.3382/ps.2012-02853

Reuben, R. C., Sarkar, S. L., Ibnat, H., Roy, P. C., & Jahid, I. K. (2022). Novel mono-and multi-strain probiotics supplementation modulates growth, intestinal microflora composition and haemato-biochemical parameters in broiler chickens. *Veterinary Medicine and Science*, *8*(2), 668-680. doi: 10.1002/vms3.709

Ross. (2014). Ross 308 Broiler Nutrition Specifications. First edition. Ross Broiler Ltd., Scotland, UK.

SAS Institute. (2011). SAS User's Guide. Version 9.3. SAS Institute Inc., Cary, NC, USA.

Teague, K. D., Graham, L. E., Dunn, J. R., Cheng, H. H., Anthony, N., Latorre, J. D., & Tellez, G. (2017). *In ovo* evaluation of FloraMax®-B11 on Marek's disease HVT vaccine protective efficacy, hatchability, microbiota composition, morphometric analysis, and *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens. *Poultry Science*, *96*(7), 2074-2082. doi: 10.3382/ps/pew494

Tsega, K. T., Kagira, J. M., Tessema, N. B., & Mekuria, S. A. (2024). Effects of *Lactobacillus* probiotics supplemented with concentrate feed on growth performance, carcass characteristics, and caecal microflora of RIR chickens. *Cogent Food & Agriculture*, *10*(1), 2311959. doi: 0.1080/23311932.2024.2311959

Vieira, S. L., Almeida, J. G., Lima, A. R., Conde, O. R. A., & Olmos, A. R. (2005). Hatching distribution of eggs varying in weight and breeder age. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *7*(2), 73-78. doi: 10.1590/S1516-635X2005000200002

Wang, L., Feng, Y., Zhang, X., & Wu, G. (2019). Effect of probiotic *Lactobacillus reuteri* XC1 coexpressing endoglucanase and phytase on intestinal pH and morphology, carcass characteristics, meat quality, and serum biochemical indexes of broiler chickens. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *48*, e20180273. doi: 10.1590/rbz4820180273

Wang, Y., & Gu, Q. (2010). Effect of probiotic on growth performance and digestive enzyme activity of Arbor Acres broilers. *Research in Veterinary Science*, *89*(2), 163-167. doi: 10.1016/j.rvsc.2010.03.009

Wilson, K. M., Rodrigues, D. R., Briggs, W. N., Duff, A. F., Chasser, K. M., & Bielke, L. R. (2019). Evaluation of the impact of *in ovo* administered bacteria on microbiome of chicks through 10 days of age. *Poultry Science*, *98*(11), 5949-5960. doi: 10.3390/poultry4020015

Wilson, K. M., Rodrigues, D. R., Briggs, W. N., Duff, A. F., Chasser, K. M., Bottje, W. G., & Bielke, L. R. (2020). Impact of *in ovo* administered pioneer colonizers on intestinal proteome on day of hatch. *Poultry Science*, *99*(3), 1254-1266. doi: 10.1016/j.psj.2019.10.017

Zhang, H., Elliott, K. E. C., Durojaye, O. A., Fatemi, S. A., & Peebles, E. D. (2018). Effects of *in ovo* administration of L-ascorbic acid on broiler hatchability and its influence on the effects of pre-placement holding time on broiler quality characteristics. *Poultry Science*, *97*(6), 1941-1947. doi: 10.3382/ps/pey040

Zou, Q., Fan, X., Xu, Y., Wang, T., & Li, D. (2022). Effects of dietary supplementation probiotic complex on growth performance, blood parameters, fecal harmful gas, and fecal microbiota in AA+ male broilers. *Frontiers in Microbiology*, *13*, 1088179. doi: 10.3389/fmicb.2022.1088179