

۲۵۰ کیلو کالری انرژی در کیلوگرم) که به وسیله اشعه گاما به میزان ۵ مگاواراد استریل شده بود، در اختیار آنها قرار گرفت. آزمایش‌های میکروبی در ظروف مزبور طبق روش‌های استاندارد انجام گرفت (واکتر ۸۱۹۵۹).

میکرو ارگانیسم ها اشربیاکلی (۱۵۰-۰) از مؤسسه تحقیقات فیزیک و شیمی و سالمونلاتیفی موریوم (۵۵-L) از مؤسسه ملی بهداشت حیوانی تهیه شده بود. پنجم سویه لاکتوپاسیل از محتویات روده کور جوجه‌های بالغ در آزمایشگاه نگارنده‌گان جدا گردید.

محیط‌ها و روش‌های کشت

مواد باکتریایی از محیط آبگوشت غیرهوازی گیفو (GAM) که در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ ساعت کشت شده بود، تهیه گردید. محیط‌های غیرانتخابی اگار خوندار جگر (BL) و اگار خوندار تریپتوسوسی (TS) بودند. محیط‌های انتخابی عبارت بودند از: اگار مانیتول لیزین کریستال ویوله سیز درخشان (MLCB) برای سالمونلاتیفی موریوم، اگاری اکسی کلات هیدروژن سولفید لاکتوز (DHL) برای اشربیاکلی یا آنتروبیاکتریاسه، اگار انتخابی لاکتوپاسیل (LBS) برای لاکتوپاسیل‌ها، محیط آبگوشت گیفو با جنتامایسین (۲۵ میکروگرم در میلی لیتر) و اگار انتخابی بیفید و باکتریوم (BS) برای بیفید و باکتریوم، اگار کلستریدیوم و لشی (CW) با کانامایسین برای کلستریدیوم، اگار تاروکلات سیز درخشان (NBGT) با نشومایسین برای باکتریویتیدهای و اگار دکستروز سیب زمینی (PD) برای قارچ‌ها. اگارهای MLCB و TS DHL و خوندار به صورت هوایی و یقه محیط‌ها به صورت غیرهوازی کشت داده شدند.

فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های دوروزه و بالغ محتویات روده کور چهار جوجه دو روزه و چهار جوجه بالغ (۷ ماهه) جمع اوری و وزن گردید و به ۹۹ حجم (Wt/Vol) با فر فسفات نمکی (PBS) استریل اضافه گردید. یک میلی لیتر از این سوسپانسیون با ۹ میلی لیتر PBS استریل رفیق شد. هرمنوونه به طور سریال تا ۱۰ برابر رفیق گردید. از هر قرت، ۱/۰ میلی لیتر بر روی هریک از محیط‌های TS، BL، LBS، CW، BS، DHL و NBGT پخش گردید و سپس پرگه‌های رشدیافته شناسایی گردیدند (بوچانان و گیبونز ۱۹۷۴-۹). تعداد باکتری‌ها به صورت ۱۰^۱-۱۰^۱ واحدهای تشکیل دهنده پرگه در یک گرم از محتویات روده کور مشخص گردید. حد قابل تشخیص در این روش ۳ در ۱۰^۱ بود. دو آزمایش به طور مستقل انجام گردید.

طرح‌های آزمایشی تغییر فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های عاری از جرم که محتویات عادی روده کور به آنها خورانده شده است:

محتویات روده کور ده جوجه دو روزه یا چهار جوجه بالغ مخلوط شده و صد برابر با PBS رفیق گردید. یک میلی لیتر از سوسپانسیون رفیق شده به هریک از دوازده جوجه هشت روزه عاری از میکروب خورانده شد. در

نقش فلور میکروبی روده در پیشگیری از کلونیزاسیون سالمونلا در جوجه‌های عاری از جرم

ترجمه: دکتر غلامرضا مؤذنی جولا و دکتر امین درخشان فر اعضاي مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام فارس

نقش احتمالی فلور میکروبی روده در پیشگیری از کلونیزاسیون سالمونلاها در روده کور جوجه‌های عاری از جرم برسی گردید. در محتویات روده کور جوجه‌های تازه تفریخت شده (دو روزه) در مقایسه با جوجه‌های بالغ (هفت ماهه) تعداد اشربیاکلی بیشتر و تعداد لاکتوپاسیل کمتر بود. به جوجه‌های عاری از جرم که قبل از محتویات روده کور جوجه‌های تازه تفریخت شده و یا طیور بالغ خورانده شده بود، به طریق خوراکی سالمونلاتیفی موریوم داده و در روز بعد تعداد سالمونلاتیفی موریوم در روده کور آنها شمارش گردید. فلور میکروبی طیور بالغ در مقایسه با فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه در پیشگیری از کلونیزاسیون سالمونلاتیفی موریوم تأثیر بیشتری داشت. به جوجه‌های عاری از جرم که اشربیاکلی، لاکتوپاسیل و یا مخلوطی از هردو داده شده بود بطریقه خوراکی سالمونلاتیفی موریوم داده شد. از نظر شدت مهار کردن کلونیزاسیون سالمونلاتیفی موریوم، ابتدا مخلوط اشربیاکلی و لاکتوپاسیل و پس از آن اشربیاکلی و سپس لاکتوپاسیل‌ها قرار دارند. اشربیاکلی ممکن است نقش مهارکننده رقابتی را فقط در جوجه‌های دو روزه داشته باشد. در حالی که لاکتوپاسیل‌ها نقش نسبی در جوجه‌های بالغ دارند.

مقدمه

الودگی سالمونلاتی فراورده‌های طیور بعنوان یک منبع بالقوه مسمومیت غذائی در انسان حائز اهمیت است. اقدامات مختلفی برای پیشگیری از الودگی سالمونلاتی فراورده‌های طیور انجام شده است. برای حذف و یا کاهش عفونت‌های سالمونلاتی روده، استفاده از اثر رقابتی فلور میکروبی غیر بیماری زا مورد بررسی قرار گرفته است (نوری و راتالا ۱۹۷۳-۲، راتالا و نوری ۱۹۷۳، اسنوبنیوس ۳ و همکاران ۱۹۷۶). در جوجه‌ها بیشترین تلفات سالمونلوز طی دو هفت‌پس از تفریخت اتفاق می‌افتد (ویلیامز ۴) حساسیت جوجه‌ها تازه تفریخت شده به کلونیزاسیون سالمونلاتی بروی محاط و ایجاد عفونت از جوجه‌های بالغ بیشتر است. حساسیت زیاد جوجه‌های تازه تفریخت شده به آلودگی سالمونلاتی از راه خوراکی به مقاومت کم فلور میکروبی روده در مقابل پاتوژن‌های مذکور نسبت داده می‌شود.

مقاومت در مقابل الودگی سالمونلاتی را با خوراندن سوسپانسیون مدفعی یا محتویات روده کور جوجه‌های بالغ به جوجه‌های حاوی جنین زنده را به آرامی با محلول ۲ درصد کلرید جوجه در ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه شسته و به کمک سبد پر از محلول ۱ درصد کلرید جیوه به ظروف پلاستیکی استریل منتقل شدند. به جوجه‌ها پس از اینکه از تخم بیرون آمدند آب استریل داده شد و غذای پایه (شامل ۲۰ درصد پروتئین خام و

اشریشیاکلی در فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه زیاد و در فلور جوجه‌های بالغ کم بود. در جوجه‌های عاری از جرمی که فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه به آنها خورانده شده بود، تعداد لاکتوپاسیل‌ها و بیفید و باکتریوم‌ها در طول زمان نوسانی نداشتند. تعداد اشریشیاکلی در روز دوم و چهارم پس از خوراندن محتویات روده به حداقل رسید اما در روز ششم کاهش یافت. باکتریوئیدها دو روز پس از خوراندن محتویات روده کور در حد ضعیفی کلوبینزه شده، ولی به تدریج تعداد آنها افزایش یافت. در طیور عاری از جرمی که فلور میکروبی جوجه‌های بالغ به آنها خورانده شده بود، تعداد زیادی لاکتوپاسیل‌ها و بیفید و باکتریوم‌ها در فلور میکروبی جوجه‌های دو بالاخه باکتریوئیدها دو روز پس از خوراندن محتویات

انواع پرگنهای لاکتوپاسیل مشاهده شد. باکتریوئیدها و بیفید و باکتریوم‌ها در جوجه‌های دو روزه همواره به خوبی کلوبینزه نمی‌شدند. تعداد کمی از کلستریدیوم‌ها و قارچ‌ها نیز شناسائی گردیدند که ارقام مربوط به آنها نشان داده شده است.

کلوبینزاسیون فلور میکروبی روده کور جوجه‌های عاری از جرمی که محتویات روده کور جوجه‌های دو روزه پس از خوراندن محتویات روده کور در حد ضعیفی کلوبینزه شده، ولی به مدت شش روز پس از آنکه محتویات روده کور جوجه‌های دوروزه و بالاخ به طیور تحت آزمایش خورانده شد، مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۱). تعداد لاکتوپاسیل‌ها و بیفید و باکتریوم‌ها در فلور میکروبی جوجه‌های دوروزه کم و در فلور جوجه‌های بالغ زیاد بود. بعکس، تعداد

هریک از روزهای دو، چهار و شش پس از خوراندن سوسپانسیون، چهار جوجه به روش جابجایی مهربه‌های گردن کشته شدند و از محتویات روده کور آنها نمونه برداری و سپس برای یافتن فلور میکروبی آزمایش شد.

حذف رقابتی سالمونلاتیفی موریوم به وسیله فلور میکروبی روده کور ده جوجه دو روزه یا چهار جوجه

بالغ مخلوط شد و صد برابر با PBS رفیق گردید و یک میلی لیتر از سوسپانسیون به هریک از بیست و دو جوجه هشت روزه عاری از میکروب خورانده شد. چهار روز پس از خوراندن محتویات، به هر پرنده 10^4 یا 10^8 واحد تشکیل دهنده پرگنه به ازای هر میلی لیتر (CFU/ml) ۱۰ سالمونلاتیفی موریوم خورانده شد. پنج یا شش ساعت پس از خوراندن سالمونلاتیفی موریوم کالبدگشائی گردیدند. سوسپانسیون‌های روده کور ببروی محیط آکار MLCB با روش مشابه بالا پخش شد و سپس پرگنهای رشدیافته شمارش گردید.

حذف رقابتی سالمونلاتیفی موریوم در جوجه‌های عاری از جرمی به وسیله اشریشیاکلی یا لاکتوپاسیل‌ها جوجه‌های هشت روزه عاری از میکروب به سه گروه تقسیم شدند. به جوجه‌های گروه دوم سوسپانسیون حاوی اشریشیاکلی، به جوجه‌های گروه سوم مخلوطی از سوسپانسیون‌های حاوی اشریشیاکلی و پنج گونه از لاکتوپاسیل خورانده شد. هر سوسپانسیون غلظتی در حدود 10^8 CFU باکتری به ازای هر میلی لیتر پیدا نمود. یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتری به هر پرنده خورانده شد. آزمایشاتی با روش قیلی (به جز در مورد سالمونلاتیفی موریوم که با غلظت 10^4 CFU به کار رفت) برای مشخص کردن حذف رقابتی سالمونلاها انجام گردید.

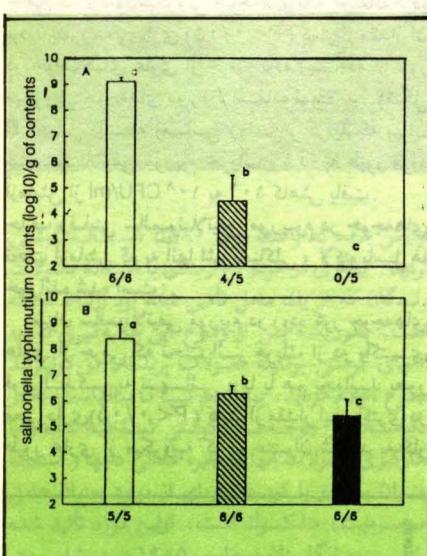
تحلیل آماری

ارقام مربوط به شمارش سالمونلاتیفی موریوم توسط آزمون t داشتگویی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (استندکور و کوچران ۱۹۸۰) برای معنی دار بودن روابط آماری می‌باشند $P < 0.05$.

نتایج

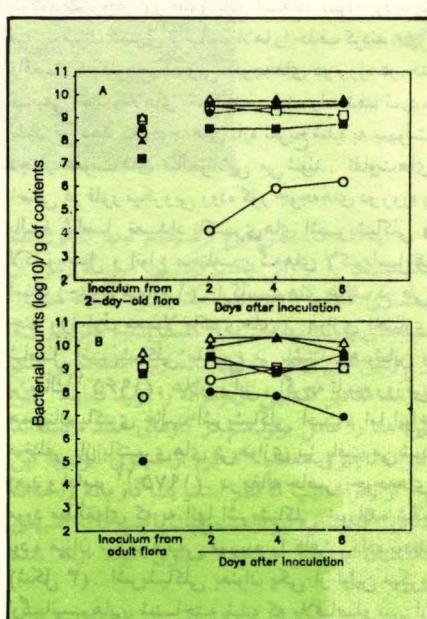
بررسی فلور میکروبی روده کور:

اجزای تشکیل دهنده فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های دو روزه و بالغ در جدول ۱ درج شده است. اما تحلیل آماری به دلیل تفاوت‌هایی که در تعداد باکتری‌های آزمایشات وجود داشته و همچنین به دلیل آنکه در برخی نمونه‌ها تعداد باکتری‌ها کمتر از حد قابل شناسایی بود، انجام نگردیده است. تنها اشریشیاکلی و لاکتوپاسیل‌ها در طی آزمایش‌ها از روند مشابهی پیروری کرده‌اند مقادیر اشریشیاکلی در فلور جوجه‌های بالغ کمتر از فلور جوجه‌های دو روزه و مقادیر لاکتوپاسیل‌ها در فلور جوجه‌های بالغ بیش از فلور جوجه‌های دوروزه بود. در فلور جوجه‌های بالغ نسبت به فلور جوجه‌های دو روزه گوناگونی بیشتری از نظر



شکل ۲:

میزان سالمونلاتیفی موریوم در محتویات روده کور جوجه‌های عاری از میکروب (مستطیل سفید) و جوجه‌های دوروزه (مستطیل هاشورزده) به آنها محتویات روده کور جوجه‌های دوروزه (مستطیل سفید) و یا جوجه‌های بالغ (مستطیل سیاه) خورانده شده است. طیور مذکور ۱۰⁴ CFU/ml سالمونلاتیفی موریوم (A) یا 10^8 CFU/ml (B) از این باکتری دریافت کرده بودند (B). خطوط عمودی انحراف میان را نشان می‌دهند. شکل مقاومت ستون‌های رسم شده پیانگر تفاوت معنی دار آنهاست ($P < 0.05$). اعداد محور افقی تعداد طیور را که بیش از 10^3 باکتری بر حسب گرم محتویات روده کور به ازای تعداد پرنده‌گان مورد آزمایش داشته‌اند، نشان می‌دهند.



شکل ۱:

تفیر فلور میکروبی در روده کور جوجه‌های عاری از جرمی که محتویات روده کور جوجه‌های دوروزه (A) یا جوجه‌های بالغ (B) به آنها خورانده شده است. علاوه بر کار رفته عبارتند از اشریشیاکلی (●)، بیفید و باکتریوم‌ها (■)، لاکتوپاسیل‌ها (▲)، باکتریوئیدها (○)، باکتری‌های هوازی گرم مثبت (□) و شمارش کلی باکتری‌ها (△). در هر روز کالبدگشائی چهار قطعه از پرنده‌گان بررسی می‌شوند.

جدول ۱- باکتری‌های اصلی تشکیل دهنده فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های دو روزه و بالغ					
آزمایش ۲	آزمایش ۱	آزمایش ۲	آزمایش ۱	Total counts	Bacteroides spp
۹/۶۶	۹/۷۱	۱۰/۰۲	۹/۹۷(۱)	۲>	Bifidobacterium spp
۹/۰۰	۹/۶۱	۹/۴۹		۸/۳۰	Latobacillus spp
۹/۰۰	۸/۴۸	۳>		۳/۶۰	Escherichia coli
۹/۳۴	۸/۸۳	۴/۵۹		۹/۸۷	Gram- Positive aerobes
۴/۸۷	۸/۱۶	۹/۷۱		۹/۰۲	
۸/۶۰	۳>	۹/۳۴			

۱۹۸۳، ویناک و همکاران ۱۹۸۵). در مطالعه حاضر، مخلوطی از پنج باکتری در جوجه‌های عاری از جرم در مقایسه با جوجه‌های شاهد موجب کاهش معنی داری در میزان سالمونلاها شده است. با این وجود، از آنجا که توانایی لاکتوباسیل در کاهش سالمونلاها محدود است، به نظر نمی‌رسد که لاکتوباسیل‌ها نقش مهمی در رقابت با سالمونلاهای موجود در فلور میکروبی طیور بالغ داشته باشند. طیور منوفلور عاری از جرم با استفاده از باکتریوئیدها یا بیفید و باکتریوم‌ها قادر به مهار کلونیزاسیون سالمونلا نبوده‌اند (فوکاتا و همکاران ۱۹۸۹). البته تعداد دیگری از باکتری‌ها نیز ممکن است در حذف رقابتی سالمونلاها دخالت داشته باشند.

همچنانکه در شکل‌های شماره A-۱ و B-۱ نشان داده شده است در جوجه‌های عاری از جرمی که محتویات روده کور جوجه‌های دوروزه به آنها خورانیده شده با افزایش سن تعداد باکتری‌های اشریشیاکلی کاهش یافته و در مقابل میزان باکتریوئیدها زیاد شده و این موضوع نشان می‌دهد که فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های عاری از جرم به تدریج و با افزایش سن به طرف فلور میکروبی طیور بالغ تکامل می‌یابد. دو روز پس از خورانیدن محتویات روده کور طیور بالغ به جوجه‌های تحت آزمایش، تعداد باکتری‌های اشریشیاکلی زیاد بوده و بعداً به تدریج با افزایش سن کاهش یافته و در همین حال باکتریوئیدها رویه افزایش بودند. این ارقام و اطلاعات نشان می‌دهد که فلور میکروبی روده کور در جوجه‌های عاری از جرم شبیه به فلور میکروبی جوجه‌های تازه تفریخت شده بوده که تدریجاً و با گذشت زمان به شکل فلور میکروبی طیور بالغ درآمده است.

زیرنویسها

- 1-Gnotobiotic chickens.
- 2-Nurmi and Rantala.
- 3-Snoeyenbos et al.
- 4-Williams.
- 5-Lloyd et al
- 6-Weinack et al
- 7-Bailey
- 8-Wagner
- 9-Buchanan and Gibbons
- 10-Colony forming unit
- 11-Huhtanen and Pensack
- 12-Mead and Adams
- 13-Coloe
- 14-Barrow and Tucker
- 15-Fukata et al
- 16-Watkins and Miller

منبع مورد استفاده:

Ghosh, R.C., H.V.S. chauhan and S.Roy (1990) Immunosuppression in broilers under experimental Aflatoxicosis. The British veterinary Journal. Vol. 146- No. 5, PP. 457- 462.

رفته‌اند، بوده است (شکل ۳). به ترتیب مخلوطی از اشریشیاکلی و لاکتوباسیل‌ها، اشریشیاکلی و یا لاکتوباسیل‌ها کمترین تعداد سالمونلاتیفی موریوم را بدست داده‌اند.

بحث

جوچه‌های عاری از جرمی که به طریقه خوارکی، مقدار کمی به اندازه 10^4 CFU/ml به ازاء هرپرنده، از محتویات روده کور جوجه‌های بالغ دریافت داشته باشد، به طرز واضحی و بطور رقابتی موقوف به حذف سالمونلاها شدند (شکل‌های ۲-A و ۲-B). از طرفی، جوجه‌هایی که محتویات روده کور جوجه‌های دو روزه را دریافت داشته بودند، نسبت به آنها که از محتویات روده کور طیور بالغ استفاده نموده بودند به مراتب میزان کمتری از سالمونلاها را حذف کردند. این واقعیت که فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه در حد ضعیفی سالمونلاهای خورانیده، شده را حذف نمود، نشان می‌دهد که جوجه‌های تازه تفریخت شده به سهولت دچار اعفونت‌های سالمونلاتیفی می‌شوند. تفاوت‌های اصلی در فلور میکروبی روده کور جوجه‌های دو روزه و بالغ شامل تعداد باکتری‌های اشریشیاکلی و لاکتوباسیل و انواع مختلف پرگنهای لاکتوباسیل‌ها است (جدول شماره ۱). ارگانیسم‌های غالب در طی چند روز اول معمولاً باکتری‌های بی‌هوایی اختیاری شامل اشریشیاکلی مذکور می‌باشند (هوتاین و پن ساک ۱۹۶۵). علاوه براین، اگرچه تا سه روزگی همچنان باکتری غالب اشریشیاکلی است، اما انواع مختلفی از باکتری‌های بی‌هوایی نیز یافت می‌شود (مید و آدامس ۱۹۷۵). در مطالعه حاضر، جوجه‌های مورد مطالعه‌ای که به آنها اشریشیاکلی خورانده شده بود، میزان سالمونلاتیفی موریوم را کاهش داده بودند (شکل ۳). اشریشیاکلی بعنوان یکی از اولین میکرو ارگانیسم‌های شناخته شده که بلافاصله پس از تفریخت شدن جوجه‌ها، در مقیاس وسیعی در روده آنها کلونیزه می‌شود (کوله ۱۳ ۱۹۸۴) و قادر به حذف سالمونلاها است (بارو و توکر ۱۹۸۶، فوکاتا و همکاران ۱۹۸۹). اشریشیاکلی، نقش اساسی در حذف سالمونلاها در تمام سنین جوجه‌ها را ندارد، چرا که جوجه‌های تازه تفریخت شده‌ای که تعداد زیادی از این باکتری را نیز دارند به مراتب کمتر از جوجه‌های بالغی که از مقدار کمی اشریشیاکلی برخوردارند قادر به کاهش و حذف سالمونلاها هستند. چنین به نظر می‌رسد که اشریشیاکلی تنها در جوجه‌های تازه تفریخت شده نقش رقابتی مهمی در مقابل سالمونلاها بر عهده دارد. اشریشیاکلی و سالمونلا هردو متعلق به خانواده یکسانی از آنتروباکتریا هستند. باکتریهای مذکور برای مستقر ساختن خود در روده طیور یا یکدیگر رقابت می‌نمایند.

گزارش شده که در جوجه‌های عاری از جرمی که تنها با یکسویه از لاکتوباسیل‌ها تعذیبه شده‌اند، کاهش سالمونلاهای روده باریک در حد ضعیفی رخ داده است (استوینبوس و همکاران ۱۹۷۹، واتکینز و میلر ۱۶)

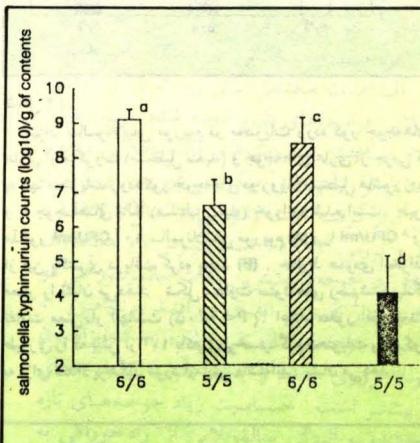
روده کور به خوبی کلونیزه شده و پس از آن نیز افزایش یافته‌است. فلور روده کور جوجه‌های عاری از جرم که محتویات رقیق شده روده کور خورانده همیشه منعکس کننده وضعیت فلور میکروبی اولیه نیست.

حذف رقابتی سالمونلاتیفی موریوم در جوجه‌هایی که محتویات روده کور به آنها خورانده شده است:

صرف‌نظر از تفاوت‌هایی که در میزان سالمونلاتیفی موریوم خورانده شده به جوجه‌های عاری از جرم داشته، تعداد این باکتری‌ها در محتویات روده کور طیور مذکور که تحت تأثیر فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه بوده‌اند به طور معنی داری ($P < 0.05$) کمتر از مقادیر این باکتری‌ها در جوجه‌های عاری از جرم بوده است (شکل ۲A). علاوه براین میزان سالمونلاتیفی موریوم در محتویات روده کور جوجه‌های عاری از جرمی که از فلور میکروبی جوجه‌های بالغ استفاده کرده بودند بطور معنی داری ($P < 0.05$) کمتر از مقدار آن در جوجه‌های عاری از جرمی بوده است که از فلور میکروبی جوجه‌های دو روزه استفاده نموده‌اند. (شکل ۲B) این رابطه زمانی روشن‌تر گردید که میزان سالمونلاتیفی موریوم خورانده شده به طیور مورد آزمایش از 10^8 CFU/ml به 10^4 کاهش یافته.

حذف رقابتی سالمونلاتیفی موریوم در جوجه‌های تحت آزمایش که به آنها اشریشیاکلی و لاکتوباسیل‌ها خورانده شده است:

میزان سالمونلاتیفی موریوم در روده کور جوجه‌های عاری از جرمی که تحت اثر هریک از دو باکتری فوق الذکر به تنهایی و یا با هم بوده‌اند بطور معنی داری ($P < 0.05$) کمتر از مقدار این باکتری در طیور عاری از میکروب که به عنوان شاهد به کار



شکل ۳:

میزان سالمونلاتیفی موریوم در محتویات روده کور جوجه‌های عاری از میکروب (مستطیل مغذی) و در جوجه‌های عاری از میکروبی که به آنها اشریشیاکلی (مستطیل هاشورزده در سمت چپ) و یا لاکتوباسیل‌ها (مستطیل هاشورزده در سمت راست) و یا مخلوط هردو (مستطیل سیاه) خواهند شد. خطوط عمودی انحراف از میار را شان می‌دهند. شکل مقایسه ستون‌های رسم شده بیانگر تفاوت معنی دار آنهاست ($P < 0.05$). اعداد مدور افقی تعداد طیوری را که بیش از 10^3 باکتری پرحسب گرم محتویات روده کور به ازای تعداد طیور مورد آزمایش داشته‌اند، نشان می‌دهد.