جداسازی و شناسایی باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری در تخم مرغهای قابل جوجه کشی

دکتر غلامعلی کلیدری[1]* دکتر حبیب پورآخوند درزی[2] دکتر غلامرضا هاشمی تبار[3]

دریافت مقاله: ۱۲ تیرماه ۱۳۸۳
پذیرش نهایی: ۴تیرماه ۱۳۸۴

هدف: بررسی میزان آلودگی باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری و شناسایی آنها در تخم مرغهای قابل جوجه کشی.

طرح: مطالعه‌آینده نگر طولی.

حیوانات: ۱۲۰عدد تخم مرغ قابل جوجه کشی و ۳۰ قطعه جوجه یک روزه‌گوشتی.

روش: الف) نمونه‌گیری از تخم مرغهای قابل جوجه کشی وجوجه یک روزه در ۵ مرحله مختلف‌شامل بلافاصله بعد از تخمگذاری، قبل از ضد عفونی، بعد از ضدعفونی، قبل از انتقال ازستر به هچر و جوجه‌های یکروزه. ب) کشت، جداسازی وشناسایی باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی‌هوازی اختیاری در پوسته، زرده تخم مرغ وکیسه زرده.

تجزیه وتحلیل آماری: آزمون فیشر.

نتایج: میزان آلودگی پوسته در مرحلهٔ بلافاصله بعد از تخم‌گذاری ۹۶/۶۶ درصد، قبل از ضد عفونی ۱۰۰درصد، در مرحلهٔ بعد از ضد عفونی ۱۰۰درصد، در مرحلهٔ چهارم ۹۰درصد ومیزان آلودگی زرده در مرحله بعد از ضد عفونی ۳/۳ درصد ودر بقیه مراحل منفی ومیزان آلودگی کیسهٔ زردهٔ جوجهٔ یک روزه ۶/۶درصد بود. از پوسته‌گونه‌های مختلف باسیلوس و استافیلوکوکوس جداگردید که فراوانی باکتری باسیلوس سرئوس ۴۴/۱۵درصد، باسیلوس سابتیلیس ۶۴/۱۶درصد، باسیلوس پلی میکزا ۷/۴ درصد، باسیلوس کوآگلنس ۲/۵درصد، باکتری استافیلوکوکوس ارئوس ۵/۸درصد و استافیلوکوکوس ساپروفیتیوکوس ۱۰درصد، بود. فراوانی استافیلوکوکوس‌ساپروفیتیوکوس در زرده و کیسه زرده به ترتیب ۳/۳درصد و ۶/۶درصد بود.

نتیجه‌گیری: منشاء اصلی آلودگی باکتریایی زرده و ایجاد عفونت کیسه زرده، آلودگی پوسته تخم مرغ می‌باشد. در روش آماری با استفاده از تست فیشر اختلاف معنی داری در میزان آلودگی در مراحل مختلف وجود نداشت. لذا وجود آلودگی در مراحل مختلف نمایانگر این است که روشهای معمول جمع آوری، پاکسازی وضدعفونی تخم مرغهای قابل جوجه کشی تاثیر چندانی در کاهش میزان آلودگی نداشته وباکتری می تواند در طی دوره انکوباسیون وارد زرده تخم مرغ شده وسبب ایجاد عفونت کیسه زرده در جوجه‌ها و تلفات در روزهای اولیه پرورش شود. مجله دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۱۳۸۵، دوره ۶۱، شماره ۲، ۱۱۸-۱۱۵.

واژه‌های کلیدی: تخم مرغ قابل جوجه کشی، باکتریهای گرم مثبت، جوجه کشی.

عفونت کیسه زرده یکی از متداولترین علل تلفات جوجه‌ها در اولین هفته زندگی می‌باشد. عامل بیماری از طریق ناف التیام نیافته، پوسته تخم مرغ آلوده و گاهی از طریق زرده باعث ایجاد عفونت و تلفات در جوجه‌ها می‌گردد.

۱) گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۲) دانش آموخته دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
۳) گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد- ایران.
*) نویسنده مسؤول: kalidari@um.ac.ir

Isolation and Identification of Facultative Aerobic-Anaerobic Gram-Positive Bacteria in Hatching Eggs

Kalidari, GH.A.[1], Pourakhond darzi, H.[2], Hashemitabar, GH.R.[3]

[1]Department of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. [2]Graduated from the School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran. [3]Department of pathobiology, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad-Iran.

Objective: To detect and isolate the Gram-positive aerobic and facultative -anaerobic bacteria in hatching eggs.

Design: Prospective longitudinal study.

Animals: One hundered and twenty eggs from the broiler breeder stock and hatchery and 30 new-hatched chicks.

Procedure: Bacteiological studies were done in five different developing stages: immediately after laying, before and after disinfecting, before moving from setter to hatcher and from new hatched chicks. Furthermore, two different samples were taken from the shell and the yolk of each egg. Eggs were washed with Nutrient-Broth Media, stored in 37°C for 24 hours and finally transferred to blood agar containing potassium telorite. Yolk samples were directly transferred to blood agar containing potassium telorite. This process was repeated similarly for those samples from yolk sac of 18-day-old embryos and newborn chicks.

Statistical analysis: Exact fisher test.

Results: The contamination rate of eggshells in different stages were 96.66%, 100%, 100% and 90% ,respectively. *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. polymixa* and *B. coagulans* were isolated in 44.15%, 64.16%, 7.4% and 2.5% of cases, respectively. *Staphylococcus aureus* and *S. saprophyticus* were isolated from one yolk (3.3%) and tow yolk sacs (6.6%). Any bacteria was isolated from yolk sac of 18 - day- old embryos.

Clinical implications: The source of such contamination is mostly related to eggshells. In spite of routine managing programs in breeder stocks (such as selection, cleaning, and disinfection of eggs) it dose not effect to reduce Gram positive bacteria on egg shells and contamination of eggs in setter.Hence, yolk sac infection occurs and causes mortality in chicks. ***J.Fac.Vet.Med. Univ. Tehran. 61,2:115-118,2006.***

Keyword: hatching egg, hatchery, Gram-positive bacteria.

Corresponding author's email:kalidari@um.ac.ir

اجرام باکتریایی دخیل در عفونت کیسه زرده عمدتا باکتری

جدول ۱- باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری جداشده بلافاصله بعد از تخمگذاری.

نوع نمونه	تعدادموارد مثبت	فراوانی (درصد)	انواع باکتری‌های جداشده
پوسته	۱۹	۶۳	*Bacillus subtilis*
پوسته	۱۸	۶۰	*Bacillus cereus*
پوسته	۵	۱۶	*Bacillus polymixa*
	۴	۱۳/۳	*Staphylococcus saprophyticus*
زردهٔ	۰	۰	--

اشریشیاکولی بوده که به تنهایی یا همراه با سایر باکتری‌ها از جمله باسیلوس سرئوس، استافیلوکوک، پزودوموناس، پروتئوس، کلستریدیا، باعث ایجادعفونت کیسه زرده می‌شوند. با توجه به موارد فوق الذکر چنانچه بتوان با ارائه توصیه‌های بهداشتی و ضدعفونی تخم مرغ در مراحل مختلف جوجه کشی، خطر نفوذ آلودگی از طریق پوسته تخم مرغ را کم کرد، عفونت کیسه زرده نیز به حداقل خواهد رسید(۷، ۶، ۱).

مواد و روش کار

در این تحقیق از تخم مرغهای قابل جوجه کشی مزرعهٔ مرغ مادر گوشتی و کارخانهٔ جوجه کشی، در پنج مرحلهٔ شامل:

بلافاصله بعد از تخمگذاری، قبل از ضد عفونی، بعد از ضدعفونی، قبل از انتقال از ستر به هچر و جوجه‌های یکروزه، نمونه گیری انجام شد، که در هر مرحله ۳۰ نمونه، مجموعاً ۱۲۰ نمونه تخم مرغ و ۳۰ نمونه جوجهٔ یکروزه جمع‌آوری گردید. تخم مرغها به طور مجزا در هر مرحله از نظر میزان آلودگی پوسته و زرده مورد بررسی قرار گرفتند.

آماده سازی نمونه‌ها: ابتدا هر تخم مرغ با استفاده از دستکش در داخل کیسهٔ پلاستیکی استریل قرار داده می‌شد، سپس با پنج تا ده میلی لیتر از محیط کشت استریل شده نیتریت براساس سطح پوسته تخم مرغ شستشو داده می‌شد، به طوری که سطح آن کاملاً تمیز شود. سپس محلول شستشوی به دست آمده داخل لوله‌های آزمایش استریل ریخته و در داخل انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده می‌شد، برای بررسی زرده، ابتدا پوسته با الکل ۷۰ درصد ضد عفونی و از زرده‌ها به طور مستقیم با آنس تحت شرایط استریل نمونه برداری می‌شد.

در تخم مرغ ۱۸ روزه، پس از خارج کردن جنین و قرار دادن آنها داخل پلیت استریل کیسهٔ زرده را شناسایی و سپس سطح کیسهٔ زرده را با اسکالپل

جدول ۳- باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری جداشده بعد از ضدعفونی.

نوع نمونه	تعدادموارد مثبت	فراوانی (درصد)	انواع باکتری‌های جداشده
پوسته	۲۵	۸۳/۳	*Bacillus subtilis*
پوسته	۶	۲۰	*Bacillus cereus*
پوسته	۱	۳/۳	*Bacillus polymixa*
پوسته	۴	۱۳/۳	*Staphylococcus saprophyticus*
پوسته	۵	۱۶/۶	*Staphylococcus aureus*
زردهٔ	۱	۳/۳	*Staphylococcus saprophyticus*

جدول ۲- باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری جداشده قبل از ضد عفونی.

نوع نمونه	تعدادموارد مثبت	فراوانی (درصد)	انواع باکتری‌های جداشده
پوسته	۲۶	۸۶/۶	*Bacillus subtilis*
پوسته	۹	۳۰	*Bacillus cereus*
پوسته	۳	۱۰/۳	*Bacillus polymixa*
پوسته	۴	۱۳/۳	*Staphylococcus saprophyticus*
پوسته	۲	۶/۶	*Staphylococcus aureus*
زردهٔ	۰	۰	--

سوزانده و با آنس استریل از محتویات کیسهٔ زرده‌ها نمونه برداری انجام می‌شد

کشت: نمونه‌ها پس از آماده سازی به محیط کشت بلاد آگار تلوریت دار انتقال داده می‌شد. پس از سپری شدن دورهٔ انکوباسیون نتیجه را قرائت نموده و با استفاده از محیطهای تفریقی سایر مراحل شناسایی انجام می‌گرفت(۴، ۳، ۲).

در مورد کیسهٔ زردهٔ جنین یکروزه بعد از کالبد گشایی ابتدا سطح کیسهٔ زرده را با تیغهٔ داغ اسکالپل استریل نموده و با آنس استریل از کیسهٔ زرده نمونه برداری صورت می‌گرفت و به محیط بلاد آگار تلوریت دار انتقال داده تا دورهٔ انکوباسیون را طی کرده و پس از آن به شناسایی باکتریها پرداخته می‌شد(۱۳، ۹، ۸).

نتایج

در این تحقیق از ۱۲۰ پوسته و زردهٔ تخم مرغ قابل جوجه کشی مرغ مادر نژاد گوشتی در مراحل مختلف و ۳۰ قطعه جوجهٔ یک روزه نمونه گیری به عمل آمده و پس از کشت و شناسایی نتایج زیر بدست آمد.

میزان آلودگی پوسته در مرحلهٔ بلافاصله بعد از تخم گذاری ۹۶/۶۶ درصد، قبل از ضد عفونی ۱۰۰درصد، در مرحلهٔ بعد از ضد عفونی ۱۰۰درصد، در مرحلهٔ چهارم ۹۰درصد و میزان آلودگی زرده در مرحله بعد از ضد عفونی ۳/۳ درصد و در بقیه مراحل منفی و میزان آلودگی کیسهٔ زردهٔ جوجهٔ یک روزه ۶/۶درصد بود(جداول ۵و۴و۳و۲و۱).

بحث

باکتریهای گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری که در این تحقیق از پوسته، زرده و کیسه زرده جدا سازی شدند، شامل گونه‌های مختلف باسیلوس و گونه‌های مختلف استافیلوکوکوس بود فراوانی باکتری باسیلوس

جدول ۴- باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری جداشده از ۳۰ نمونه در مرحلهٔ چهارم(تخم مرغهای ۱۸ روزه).

نوع نمونه	تعدادموارد مثبت	فراوانی (درصد)	انواع باکتری‌های جداشده
پوسته	۷	۲۳/۳	*Bacillus subtilis*
پوسته	۲۰	۶۶/۶	*Bacillus cereus*
پوسته	۳	۱۰	*Bacillus coagulans*
کیسه زردهٔ	۰	۰	---

جدول۵- باکتری گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری جدا شده از ۳۰ نمونه کیسه زرده جوجه یک روزه.

نوع نمونه	تعداد موارد مثبت	فراوانی	انواع باکتری‌های جدا شده
کیسه زردهٔ	۲	۶/۶درصد	*Staphylococcus saprophyticus*

سرئوس ۴۴/۱۵درصد در پوسته‌ها بوده که این میزان توسط مالدین و همکاران درسال۱۹۹۹، ۳۲/۴۶درصد گزارش شده است و توسط فولر و همکاران درسال۱۹۶۷، ۳۷/۱۹درصد بوده است.

فراوانی باکتری استافیلوکوکوس ارئوس ۵/۸۳درصد بود که این میزان توسط مالدین و همکاران ۲/۳۶درصد و توسط فولر و همکاران ۲/۵۴درصد گزارش شده است.. در این تحقیق فراوانی استافیلوکوک ساپروفیتیکوس ۱۰درصد بود.

فراوانی باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس پلی میکزا و باسیلوس کوآگلنس به ترتیب ۶۴/۱۶درصد ۷/۴و ۲/۵ درصد بوده است که با گزارشات مالدین و همکاران و فولر و همکاران همخوانی دارد (۱۰، ۸).

باسیلوس‌ها به طور طبیعی در مدفوع وجود دارند، آلودگی پوسته تخم مرغ از طریق مدفوع در بالا بردن میزان جداسازی این دسته از باکتریها حائز اهمیت است.

در تحقیق سویر و همکارانش درسال۱۹۷۳ نیز باسیلوس‌ها بویژه باسیلوس سرئوس و سابتیلیس جدا شده است که فراوانی باسیلوس سرئوس جدا شده از پوسته برابر ۱۶/۴۶درصد بوده است(۱۴).

درمرحله بلافاصله بعد از تخم گذاری ۹۶/۶۶درصد پوسته تخم مرغها از نظر آلودگی به باکتریهای گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری مثبت بوده‌اند. در این مرحله مهمترین منبع آلودگی تخم مرغ، مدفوع مرغ است. سایر منابع آلوده کننده شامل: دستگاه تولید مثل مرغ، گرد و غبار، پوشال بستر و دستهای کارگران جمع آوری کنندهٔ تخم مرغ است که وجود میزان زیاد باکتری در این مرحله می تواند ناشی از موارد فوق باشد که با تحقیقات مایز و همکاران درسال ۱۹۸۳ مطابقت دارد(۱۱).

از آنجا که هیچگونه عملیات تمیز کردن و ضد عفونی بر روی تخم مرغ انجام نگرفته است، آلودگی پوسته بسیار بالاست. عدم وجود باکتری در داخل زرده نیز بعلت وجود سدهای فیزیکی، شیمیایی در تخم مرغ است و باکتری‌ها هنوز فرصت کافی برای نفوذ بداخل تخم مرغ و آلوده کردن محتویات آنرا پیدا نکرده‌اند. بورد(۱۹۹۴) نیز در تحقیقاتش از زرده و سفیدهٔ تخم مرغ‌های تازه گذاشته شده باکتری جدا نکرد(۵).

درمرحله قبل از ضد عفونی ۱۰۰ درصد کل پوسته تخم مرغها از نظر آلودگی باکتریایی گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری مثبت بودندو از هیچیک از زرده تخم مرغ‌ها باکتری جدا نگردید.

در شرایط عادی در مزرعه مرغ مادر پس از جمع آوری تخم مرغ، عمل تمیزکردن یاسمباده کشیدن روی تخم مرغ‌ها صورت می‌گیرد که با این عمل مدفوع و پوشال چسبیده به تخم مرغ تا حد امکان پاک شده و تخم مرغ‌های خیلی کثیف و با شکل و اندازه غیر طبیعی حذف می‌شوند. این عمل باعث کاهش بار آلودگی موجود بر روی پوسته می‌شود، وجود آلودگی ۱۰۰درصد نشاندهنده عدم پاکسازی مناسب پوسته و افزایش بار میکروبی می‌باشد. در تحقیق کالنک و همکاران درسال۱۹۹۷ تأثیر سمباده خشک در کاهش بار آلودگی ذکر شده است (۶).

در مرحله بعد از ضد عفونی ۱۰۰درصد پوسته تخم مرغها از نظر آلودگی باکتریایی گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری مثبت بودند و از زرده تخم مرغ استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس به فراوانی ۳/۳درصد جدا شد. در این مرحله تخم مرغ‌ها توسط گاز فرمالدئید، ضد عفونی می‌گردند که این عمل باعث کاهش بسیار شدید آلودگی پوسته تخم مرغ می‌گردد. همانطور که کالنک و همکارن درسال۱۹۹۷ نشان دادندگاز دادن زود هنگام تخم مرغ‌ها باعث کاهش ۹۹/۸ درصدی باکتریهای موجود بر روی پوسته تخم مرغ‌ها می‌شود و اما روی اسپور باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری تأثیری کمتری دارد. لذا در این مرحله میزان آلودگی باکتری‌های گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری بالاست(۶).

در مرحله قبل از انتقال از ستر به هچر ۹۰درصد پوسته تخم مرغها از نظر آلودگی به باکتریهای گرم مثبت هوازی و بی هوازی اختیاری مثبت بودند واز هیچیک از کیسه‌های زرده جنین‌های ۱۸ روزه باکتری جدا نگردید. تخم مرغها قبل از اینکه به این مرحله برسند در مزرعه مرغ مادر ضد عفونی اولیه روی آنها صورت می‌گیرد و بعد در کارخانه جوجه کشی توسط گاز فرمالدئید دوباره ضد عفونی شده و آنگاه در ستر چیده می‌شوند. این عمل باعث حذف میکروارگانیسم هایی می‌شود که به هر علت از ضدعفونی مرحله قبل عبور کرده‌اند ولی با این حال چندان تأثیری روی اسپور باکتری‌های مربوطه ندارد لذا بار آلودگی در این مرحله باز هم بالا بوده ولی نسبت به مرحله قبل یک کاهش ۱۰درصد را بخوبی نشان می‌دهد (۶).

در روش آماری با استفاده از تست فیشر اختلاف معنی داری در میزان آلودگی در مراحل مختلف وجود ندارد. لذا وجود آلودگی در مراحل مختلف نمایانگر این است که روشهای معمول جمع آوری، پاکسازی و ضدعفونی تخم مرغهای قابل جوجه کشی تاثیر چندانی در کاهش میزان آلودگی نداشته و باکتری می تواند در طی دوره انکوباسیون وارد زرده تخم مرغ شده و سبب ایجاد عفونت کیسه زرده در جوجه‌ها و تلفات در روزهای اولیه پرورش گردد.

References

۱. اکبری، ع.، شجاع دوست، ب.، کلیدری، غ.، مدیریت و بهداشت جوجه کشی. چاپ اول ۱۳۷۵. ص ۱۴ تا ۱۶، ص ۲۱ تا ۲۴، ص ۳۹ تا ۴۳، ص ۵۱ تا ۶۲، ص ۷۷ تا ۱۰۵، ص ۱۲۲ تا ۱۲۶.

2. APHA. Standard methods for the examination of dairy products. 16th ed. American public Health Association. Washington. DC. 1993.
3. Arhienbuwa F.E., Adler H.E., Wiggis A.D.(1980) A method of surveillance for bacteria on the shell of turkey eggs. Vet Dis. 59: 1, 28-33.
4. Board R.G, Fuller R.(1994) Microbiology of the Avian Egg. Firth edition. J Appl Bacteriol. PP. 1-22, 25-40, 139-143.
5. Board R.G.(1969) The microbiology of the hen's egg. Avian Appl Microbiol. 11: 245-281.
6. Calnek B.W., Barnes H. J.(1997) Disease of poultry. 10th edition. Iowa State University press Ames, Iowa, USA. PP. 97-121.
7. Carter T.A., Gentry R.F., Bressker G.O.(1973) Bacterial contamination of hatching eggs and chicks produced by broiler breeders housed in litter-stat and sloping floor management systems. Poul Sci. 52:2226-2236.
8. Fuller R., Williams D.J. Jayne.(1967) The origin of bacteria recovered from the peritoneum and yolk sac of healthy chickens. Bri Poul Sci. 159-163.
9. Furuta K., Maruyama S.(1981) Bacterial contamination on eggs during incubation and hatching and of fluff of newly hatched chicks. Bri Poul Sci. 22: 247-254.
10. Mauldin. JM.(1999) Reducing contamination of hatching Eggs. Poul Digest. PP. 38-44.
11. Mayes F.I., Takeballi M.(1983) A microbial contamination of the hen's egg: a review. J Food Protec. 46. No. 12: 1092-1098.
12. Sara D.R.L., Char N.L., Rao M.R.K.(1985) A comprehensive study on bacterial flora isolated from yolk sac infection (omphalitis) in chicks. Indian J Poul Sci. 2: 4, 262-266.
13. Seviour Elizabeth M.,Sykes Felicity R., Board R.G.(1972) A microbiological survey of the incubated eggs of chickens and waterfowl. Bri Poul Sci. 13: 549-556.