دراسة بعض التأثيرات الحيوية لبكتريا *Enterococcus faecium* كمعزز حيوي في افراخ الدجاج البياض 1- وزن الطير والتغيرات المرضية في الأكياس الهوائية و ألأمعاء

عماد جواد خماس امجد حسين عليوي

فرع الامراض- كلية الطب البيطري – جامعة بغداد

الخلاصة

لغرض معرفة تأثير بكتريا *Enterococcus faecium* كمعزز حيوي في افراخ الدجاج البياض تم اعطاء هذه الجرثومة بالعلف وبجرعة 1.5 غم/كغم علف حيث يحتوي 1 كغم على (5×10^{11} CFU) ومن اليوم الأول وحتى نهاية التجربة التي دامت 57 يوما . استخدم 150 فرخا بعمريوم واحد ذكور وقسمت الى خمسة مجاميع كل مجموعة 30 فرخا . اعطيت المجموعة الأولى المعزز الحيوي فقط مع العلف واعطيت المجموعة الثانية المعزز الحيوي وعرضت الأفراخ الى جهد بيئي من حرارة عالية وقلة تهوية اما المجموعة الثالثة فقد اعطيت المعزز الحيوي اضافة الى كلورتتراسيكلين بالعلف واعطيت المجموعة الرابعة المعزز الحيوي ثم خمجت ببكتيريا الأشريكيا القولونية بعمر 21 يوما . اما المجموعة الخامسة فقد اعطيت علف اعتيادي وكمجموعة سيطرة.

بينت النتائج ان اعطاء بكتيريا (*Enterococcus faecium*) كانت ذات تأثير مهم معنويا في زيادة معدلات الاوزان للمجاميع التي اعطيت المعزز الحيوي وخاصة خلال الأسابيع الاخيرة من التجربة . وكان مستوى التضبيب للاكياس الهوائية قليل في المجاميع التي اعطيت المعزز الحيوي مقارنة بمجموعة السيطرة . كما ادى اعطاء المعزز الحيوي الى زيادة طول زغابات الأمعاء وقلة الأنسلاخات في الأسابيع الأخيرة من التجربة كما كان هناك مقاومة للخمج ببكتيريا اشريكيا القولون.

Study of some Impact Of Enterococcus faecium As Probiotic On Chick 1- Body Weight And Pathological Changes In Air Sacs And Intestine

Emad J.khamas and Amjad H.Elaywe

Dept. of pathology-college of Vet.Med-Baghdad university

SUMMARY

To investigate the impact of *Enteococcus faecium* as probiotic in layer chicks, this bacteria was given in feed at a dose rate of 1.5 gm per kg feed, each kg of feed contained 5×10^{11} cfu along the period of the study (57 days). 150 one day old males were divided into five groups, 30 males each. The 1st group was given the probiotic only in the feed, the 2nd group was given the probiotic and exposed to high temperature and bad ventilation as a stress, and the third group was given the probiotic with chlortetracycline in feed while the fourth group was

given the probiotic and then infected with *E. coli* on 21 day of age and the fifth group was given feed with out probiotic as the control group. The results showed that there was increase in body weight especially in the last weeks of the experiment. Turbidity of the air sacs was mild in the four group compared with control. Intestinal villi became elongated due to using of probiotic and there was less sloughing compared with control, and those groups showed resistance toward *E. coli* infection. .

المقدمة

يعرف المعزز الحيوي(probiotic) بأنه احد المنتجات المصنعة والمتكونة من احياء مجهرية مفيدة معزولة من الفلورا المعوية في القناة الهضمية للدجاج البالغ(1)

ومن فوائد استعمال المعزز الحيوي : تحسين الأداء الأنتاجي لإفراخ اللحم (2) المحافظة على الفلورا المعوية الأعتيادية عن طريق القيام بعمليتي الأقصاء التنافسي والتضاد (3) وتحسين الأيض عن طريق زيادة فعالية الأنزيمات الهاضمة وتخفيض الفعالية الأنزيمية للبكتريا الضارة مثل تقليل انتاج الامونيا الناتجة عن طريق انزيم اليوريز المايكروبي (4) كما ان استعمال المعزز الحيوي يثبط نمو واستيطان جراثيم الأشريكيا القولونية (5) والسالمونيلا وجراثيم Compylobacter (6).

استهدف البحث دراسة تأثير جراثيم *Enterococcus faecium* المحضرة صناعيا على اوزان أفراخ الدجاج البياض , اضافة الى اجراء . اختبار التحدي بجراثيم الأشريكيا القولونية (*E. coli*) الضارية ودراسة مدى قدرة التعرض المايكروي المبكر بجراثيم *Ent.faecium* على جرائيم الاشريكيا القولونية وتأثيرها في الخمج بالمرض التنفسي المزمن كما استهدف البحث دراسة نسجية للأمعاء واحتمال تأثرها سلبا .

المواد وطرائق العمل

جلب 150 فرخ ذكور بياض (ISA BROWN)عمر يوم واحد وبمتوسط وزن 32.5 غم لكل فرخ من الشركة العراقية للإنتاج وتسويق اللحوم / الغالبية , وتمت التجربة في وحدة تجارب فرع الأمراض في كلية الطب البيطري / جامعة بغداد . استمرت التجربة 57 يوما . اعطى المعزز الحيوي مع العلف الذي اعطى بصورة حرة (*ad libidum*) على طول فترة التجربة.

قسمت الأفراخ الى خمسة مجاميع وبواقع 30 فرخا للمجموعة . ثم خلط العلف بالمعزز الحيوي المحتوي على (*Ent. faecium*) وبجرعة 1.5غم معزز لكل كغم علف .

المجموعة الأولى اعطيت علف معامل بالمعزز على طول فترة التجربة .

المجموعة الثانية اعطيت علف معامل بالمعزز على طول فترة التجربة وعرضت الى جهد بيئي حيث درجة المحرار ما بين 32 –40 درجة مئوية وقلة التهوية حيث غطي الموضع بالنيلون.

المجموعة الثالثة اعطيت علف معامل بالمعزز الحيوي على طول ايام التجربة مضاف اليه كلورتتراسايكلين بنسبة غرام واحد لكل كغم علف .

المجموعة الرابعة اعطيت علف معامل بالمعزز الحيوي على طول ايام التجربة ثم خمجت بجراثيم اشريكيا القولون بعمر 21 يوم عن طريق القصبةالهوائيةمن خلال انيوب مطاطي شعري.

المجموع الخامسة اعطيت علف غير معامل بالمعزز الحيوي وهي مجموعة السيطرة ثم وزنت الافراخ اسبوعيا , تم قتل طيرين كل اسبوع لإجراء فحص عتمة الكيس الهوائي وكذلك اخذ عينات لإمعاء الافراخ لغرض التقطيع النسجي .

استخم المنتج الصناعي (Biomin® IMBO) الحاوي على بكتيريا *Enterococcus faecium* وبمعيار 5×10^{11} وحدة مكونة للمستعمرات لكل واحد كيلو غرام وبجرعة 1– 5 . 1غم /كغم علف اما بكتريا الاشريكا القولونية فقد استخدمت العزلة المرضية78-0 وبجرعة خمجية 10×1.26^{-8} مل/وحدة مكونة للمستعمرات وحسب (7) وذلك لإجراء اختبار التحدي يوم 21 من التجربة حيث اعطي 0.1 مل عن طريق القصبة الهوائية .

النتائج

بينت نتائج معدل الأوزان للاسبوع الأول تفوقا معنويا للمجموعة الرابعة ($p<0.05$) عن باقي المجاميع وبقيت هكذا حتى الأسبوع الرابع وكانت اقل قيمة للمجموعة الأولى وبفرق معنوي $p<0.05$.

كذلك سجلت المجموعة الثالثة اعلى قيمة بين المجاميع في الأسبوع الرابع وحافظت على هذه الزيادة الحاصلة لحين نهاية التجربة وبفرق معنوي عن بقية المجاميع $p<0.01$ و $p<0.05$ (جدول 1) .

وقد قيس درجة عتامة الكيس الهوائي حيث سجلت المجموعة الثالثة اقل نسبة اما اعلى نسبة عتامة فكانت في المجموعة الثانية والمجموعة الخامسة (جدول 2) واعلى مستوى للتضبيب كان في الاسبوع الثامن واقل مستوى في الاسبوع الرابع.

جاءت نتائج الفحص النسيجي متماثلة من حيث تأثير المجموعة والأسبوع حيث لوحظ في المجاميع الخمس خلال الأسبوع الثاني تغلظ الزغابات بالاضافة الى وجود انسلاخات في تجويف الأمعاء مع وجود بكتيريا . في حين لوحظ في الأسبوع الرابع التحسن الواضح من خلال قلة الأنسلاخات مع استطالة الزغابات وانعدام البكتيريا خاصة في المجموعة الثانية والثالثة في حين بقيت نفس الصورة للأسبوع الثاني

على المجاميع الأولى والرابعة والخامسة واستمرت هذه الصورة للمجموعة الخامسة الى الأسبوع السادس بينما تحسنت الصورة لبقية المجاميع من حيث استطالة الزغابات وقلة الانسلاخات وانعدام البكتيريا

جدول(1): معدل الأوزان (غم)

	المتوسطات ± الخطأ القياسي						
المجموعة الأسبوع	الاولى	الثانية	الثالثة	الرابعة	الخامسة	مستوى المعنوية ($p<0.05$)	مستوى المعنوية ($p<0.01$)
الاول	50.00 ± 6.37 B	56.00 ±3.53 AB	61.73 ±3.51 AB	67.40 ± 4.86 A	58.40 ± 2.58 AB	*	NS
الثاني	118.80 ± 5.34 A	111.20 ± 6.67 A	121.60 ± 6.60 A	118.60 ± 5.24 A	110.60 ± 9.17 A	*	NS
الثالث	161.60 ± 9.14 AB	115.80 ± 4.61 B	173.80 ± 3.96 AB	177.80 ± 6.27 A	170.60 ± 5.91 AB	*	NS
الرابع	262.80 ± 15.20 A	244.20 ± 5.07 A	280.00 ± 15.33 A	257.20 ± 11.23 A	243.40 ± 18.24 A	*	NS
الخامس	324.60 ± 9.35 AB	312.80 ± 6.25 B	364.40 ± 15.45 A	334.60 ± 30.79 AB	323.20 ± 9.77 AB	*	NS
السادس	505.00 ± 18.25 AB	431.40 ± 18.77 B	533.60 ± 19.41 A	430.80 ± 29.34 B	494.40 ± 36.91 AB	*	**
السابع	614.40 ± 13.47 B	537.60 ± 15.93 C	648.80 ± 5.39 A	562.60 ± 11.16 C	605.60 ± 6.85 B	*	**
الثامن	745.8 ± 26.06 AB	706.0 ± 22.20 B	819.6 ± 27.24 A	722.2 ± 17.37 B	706.8 ± 37.78 B	*	**

- الارقام تمثل المعدل ± الخطا القياسي
- الحروف المختلفة تمثل وجود فرق معنوي (C,B,A) .
- معدل القيم من الاعلى الى الاسفل حسب تسلسل الحروف (C,B,A).
- الاشارة * تمثل فرقاً معنوياً على مستوى ($p<0.05$).
- الاشارة ** تمثل فرقاً معنوياً على مستوى ($p<0.01$) .
- الاشارة NS تمثل عدم وجود فرق معنوي .

جدول(2): بيان فحص عتامة الكيس الهوائي

اسبوع مجموعة	الرابع	السادس	الثامن
الاولى	+	++	++
الثانية	++	++	++
الثالثة	–	–	+
الرابعة	+	+	++
الخامسة	++	++	+

– عدم وجود عتامة

+ عتامة بسيطة ++ عتامة شديدة

المناقشة

ان المجاميع التي استخدمت المعزز الحيوي شهدت تحسن في معدل الوزن والتي سجلت فرقا معنويا ($p<0.05$) وحتى الاسبوع الخامس بما في ذلك المجموعة الرابعة التي استعمل فيها جرثومة*E. coli* كأختبار تحدي خلال اليوم 21من التجربة (جدول 1) . وبالرغم من وجود اختلافات في نتائج البحوث وكذلك الأنواع المستخدمة من المعززات الحيوية وطرائق اعطائها فقد اتفق على ان هنالك زيادة معنوية في وزن الجسم الحي , وهذا ما وجده (8) بأن اعطاء مستحضرات التعرض المايكروي في وقت مبكر يؤدي الى ادامة توازن مايكروي مثالي للاحياء المجهرية في القناة الهضمية . لقد بين (2) ان تأثير التعرض المايكروي يكون مهما وفعالا خلال 25يوما الاولى من عمر الطير ويتدنى هذ التأثير بعد 49 يوما وذلك بسبب استقرار الفلورا المعوية داخل القناة الهضمية . سجلت المجموعة الثالثة اعلى النتائج ومن الأسبوع الرابع وحتى نهاية التجربة والتي كانت معاملة بالمعزز الحيوي والمضاد الجرثومي والمستخدم كمعزز للنمو وهذا ما وجده ايضا (9) . اكد (10) ان الخلل الحاصل في التوازن الجرثومي الحاصل من جراء ارتفاع درجات الحرارة كعامل مجهد يؤدي بدوره الى اضطرابات في هرمونات الجسم ومن اهمها هرمون كورتكوستيرويد , واكده ايضا (11) الذي بين ان الزيادة الحاصلة في تراكيز الهرمونات الناتجة من الاضطرابات (الأجهاد الحراري) تؤدي الى تحطيم النبيت المعوي الطبيعي الذي يغطى الطبقة المخاطية للقناة الهظمية والذي يؤدي بدوره الى خلل في التوازن الجرثومي والذي يمكن معالجته او الوقاية منه بزيادة جرعات البكتريا (المعزز الحيوي) التي تعمل على التوازن الميكروي وادامة النبيت المعوي.

كانت المجموعة الثالثة هي اقل حالات عتامة للأكياس الهوائية عن باقي المجاميع وذلك لإن المجموعة الثالثة كانت معاملة بالمعزز الحيوي و المضاد الحياتي كلورتتراسايكلين الذي يعد مضادا حياتيا واسع

الطيف وله تأثير في جرثومة الاشريكيا القولونية (12). وجاءت النتيجة هذه مطابقة لما جاء به (13) والذي استخدم جرثومة *Ent. faecium*. بينت نتيجة المجموعة الرابعة وجود فرق مهم عن باقي المجاميع (الاولى والثانية والخامسة) بالرغم من اجراء اختبار التحدي بعمر 21يوما بجرثومة (*E. coli*) بالاضافة الى ان المجموعة تعامل بالمعزز الحيوي (*Ent. faecium*) وذلك للتاثير الارتباطي لجرثومة (*Ent. faecium*) تجاه اشريكيا القولون .

اعلى مستوى للعتامة كان في المجموعة الثانية ومجموعة السيطرة دون حدوث حالة التهاب الاكياس الهوائية وقد يرجع السبب الى تقليل اعداد جراثيم الأشريكيا القولونية بسبب التضاد (Antagonism) مع جراثيم (*Ent. faecium*) . وكان مستوى التضبب اقل في الاسبوع الرابع . وهذه النتائج توضح التأثير الايجابي لبكتريا *Ent. faecium* في تقليل الاسباب المتعددة لإحداث مرض التهاب الاكياس الهوائية والقابلية التثبيطية لجراثيم الاشريكيا القولونية التي تعد العامل الرئيسي في احداث المرض . وتعزى اسباب هذه النتائج الى مجموعة التأثيرات الناتجة من بكتيريا حامض اللاكتيك حيث ان عملية التثبيط . قد تعزى الى الانخفاض السريع في الاس الهيدروجيني وبالتالي الى تقليل نمو الجراثيم ولاسيما بكتيريا القولون (14) وجد (15) ان الزيادة في انتاج الحامض من بكتيريا حامض اللاكتيك سوف تزيد من القابلية التثبيطية والتي تعمل على زيادة طور السكون (Lag phase) للجراثيم الحساسة للحامض والمتواجدة في نفس الوسط من جراثيم العصيات اللبنية كما ان للحامض تأثيرات اخرى داخل الخلية الجرثومية الحساسة للأحماض مثل التأثير في عمليات الأنتقال للمواد الغذائية داخل الخلية وكذلك عملية الفسفرة التأكسدية (Oxidative phosphorelation) فتعمل على تعطيلها . وقد تعمل ألية التنشيط من خلال انتاج بيروكسيد الهيدروجين من قبل بكتيريا حامض اللبنيك الذي يؤثر في الجراثيم المرضية عن طريق فعله المؤكسد الشديد عليها او من خلال التأثير المحطم للقواعد التركيبية الجزيئية لبروتينيات الخلية الجرثومية (16) .

اما تأثير التعرض الميكروي في التكوين النسجي لبطانة الأمعاء فليس هناك تأثير واضح للمعزز الحيوي في بداية اعطاءه (17) وان تأثيره الأيجابي يكون بين 28–49 يوما بعد اعطاءه لذا فأن اعداد البكتيريا يتناسب مع مدى التوازن الميكروي داخل الأمعاء فيكون في زيادة في حالة حدوث خلل في التوازن الميكروي وقلة في حالة التوازن الميكروي من النوع المتواجد بصورة حرة في القناة الهضمية وان هذا النوع مدى جيله (Generation time) اكبر من الاقصاء او الابتعاد بسبب الحركة الدودية للقناة الهضمية ويكون محافظا على التوازن الميكروبي (18) لذا فأن المؤشر لعدم التوازن في ميكروبيا القناة الهضمية هو تواجد البكتيريا وهذا ما استمر على المجاميع الاولى والرابعة خلال الأسبوع الرابع في حين ظهرت النتائج للمجموعتين الثانية والثالثة جيدة خلال الأسبوع الرابع والتي قد ترجع الى عدة عوامل (بيئة وتغذية

وميكروية) التي اشارااليها (19) .اما نتائج الأسبوعين السادس والثامن فقد كانت مكونة من استطالة في الزغابات وتضخمها وقلة الانسلاخات لبطانة الامعاء مع قلة اعداد البكتيريا والتي اتفقت مع (20) الذي لاحظ عند اعطاء *L. reuteri* يؤدي الى تحفيز المناعة غير النوعية ضد المسببات المرضية مثل زيادة طول الزغابات وزيادة في عمق الخبأ في القناة الهضمية. ومن خلال هذه النتائج ظهر التأثير الأمثل لـ*Ent. faecium* في البطانة الداخلية للأمعاء والقناة الهضمية بصورة عامة وخاصة خلال الأسابيع الاخيرة من التجربة التي تظهر حالات التوازن الميكروي فيها .

المصادر

1. Reuter G (2001) Probiotics: Possibilities and limitations of their application in food, animal feed, and in pharmaceutical preparations for man and animals Ber. Mun. Tier. Woch., 114 (11-17) : 410-419
2. Jin L Z,WHO W, Abdulah N and Jalaludin S(1997). Probiotics in poultry: Modes of actions. World's Poultry Sci . J., 53:351-368 .
3. Jin, L Z, Ho Y W,.Ali A M, Abdulla N, and .Jalalaudin S,(1996b} Effect of adherent lactobacillus spp . on invitro adherence of salmonella to the intestional epithelial cells of chickens . J. App1. Bacteriol., 81 : 206-221.
4. Jin L Z,.Ho W H,.Abdullah N and Jalaludin S, (1996a}. Influence of dried
5. *Bacillus subtilis* and Lactobacilli cultures on intestinal microflora and performance in broiler Asian Australian J. of Anim. Sci. 9:397-404 (Cited by Jin et al., 1997)
6. السامرائي؛علي كريم, (1993)تأثير العصيات اللبنية في اصابات الأكياس الهوائية في دجاج اللحم. رسالة ماجستير, كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.
7. Line J E, Baily J S,.Cox N A, and Jstren N,(1997) Yeast treatment to reduce salmonella and campylobacter poulation Associated with broiler chickens subjected to transport stress . Poultry Sci., 76: 1227-1231 .
8. Qin Z R,.Fukata T,.Baba E, and Arakawa A,{1995) Effect of lactase and lactobacillus acidophilus on the colonization of salmonella enteridis in chickes concurrently infected with Eiemerai tenella. Avian. Dis., 39: 548-553.
9. Edens F W, Parkhurst C R, Cassas I A and Dobragasz W J, (1997) Principls of Ex- ovo competitive exclusion and in –ovo administration of Lactobacillus reuteri. Poultry Sci ., 76: 169-179
10. Owings,W J,Reynolds D L, Hasiak R J, and Ferket P R, (1990) Influence of dietary supplementation with streptococcus faecium M-74 on brioler body weight and intestinal microbial colonization . Poultry Sci., 69:1257-1264.

11. Siegal H S, (1971) Adrenals stress and the environment. J. World pullt . sci ., 27:327-349
12. Leeson S, And Major D, (1990) as biotechnology gains monentum candian researchers study need for feed criteria. Feed Stuffs. (Cited by miles, 1998).
13. John H B, and Gross W B, (1997) Colibacillosis . In : Diseases of poultry . (ed by) Calnek, B.W.; H.J.Barnes; C.W. Beard; L.R. Mcdougald and Y.M. Salf. 10th Ed, Mosby-wolfe .p. 131-139.
14. Pantev A, Kabadjova P, Dalogalarrondo M. Haertle T,.Ivanoca I, Dousset X, Pervost H, and Chobert J M, (2002) Isolation and partial characterization of an antibacterial substance produce by Enterococcus faecium . Folia Microbiol , 47(4) 391-400. (Abstract).
15. Methner U, (2000) Administration of autochthonous intestinal microflora-A method to prevent salmonella infection in poultry. Dtsch. Tierarztl. Wochen. Schr, 107 (10): 402-408.
16. Tellez G, Peterone V M, Escorcia M, Morishita T Y, Cobb CF W, and Villasenor L, (2001) Evaluation of avian specific probiotic and S. Enteritidis, S. Typhimurium V.s. Heidelberg-specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of S. enteritidis in broiler. J. Food Prot. 64(3) 287-291
17. Mead G C, (2000).Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellosis and other food borne pathogens in poultry. A review. Vet. J., 159 (2) 111-123.
18. Mohan K O.R, and Christoper R J,(1998) The role at ladobaallus sporogenes (probiotic) as feed additives Poultry Guide ., 25:37-40.
19. Miles R D, (1993) Manipulation of microflora of the gastrointestinal tract: Natural ways to prevent colonization by pathogens. pp. 133-150. In: Biotechnology in the feed industry. Proc. Alltech's 9th Ann. Symp. T.P. L yons ,ed ., Alltech's Technical . Publications, Nicholasville, KY.
20. Savage D C, (1991) Gastrointestinal microbial ecology ; possible mode of action of Direct-fed microbials in animal production-Areview of the literature . In : Direct-fed microbials in Animal production-Areview of the literature . PP 11-81. National feed ingredients Association, West Des Moines, IA, U.S.A.
21. Dunham H I, .Williams C, Edens F W, Cassas L A, and Dobrogosz.W S, (1993) .Lactobacillus reuteri immunomodulation of stressor-associated diseases in newly hatched chicken and turkey. Poultry Sci., 72(suppl.1): 308(Abstract).