مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (31) العدد (1) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (31) No. (1) 2009

عزل وتصنيف بعض الأحياء الدقيقة الموجودة في مكونات الغلاف الحيوي الجرثومي لأنظمة الشرب في مزارع الدواجن

الدكتور فهيم عبد العزيز*
الدكتور علي نيصافي **
بشرى العيسى ***

(تاريخ الإيداع 20 / 10 / 2008. قبل للنشر في 2009/1/25)

□ الملخّص □

تعد المشاكل التي يولدها الغلاف الحيوي الجرثومي في أنظمة الشرب في مزارع الدواجن من التحديات الكبرى التي تواجه صناعة الدواجن، إذ يتوفر في أنظمة الشرب بيئة مناسبة لتشكيل الغلاف الحيوي والذي يتألف من الأحياء الدقيقة المتنوعة التي قد تكون سبباً لانتشار الكثير من العوامل الممرضة التي تشكل خطورة على صحة الطيور وتسبب عندها الكثير من الأمراض المعدية التي تؤدي لنفوق طيور الدواجن، وتدني الإنتاج وبالتالي الخسائر الاقتصادية الكبيرة في هذا القطاع الإنتاجي المهم.

تم في هذه الدراسة الحالية مسح 10 مزارع لتربية الفروج والدجاج البياض، منها ما يتبع نظام مشارب الحلمة، ومنها ما يتبع نظام المشارب الآلية المعلقة وأخذت /80/ عينة من الغلاف الحيوي في أنظمة سقايتها تم فحصها مخبرياً لعزل الجراثيم وتصنيفها.

أظهرت نتائج الزرع الجرثومي العام والانتقائي للعينات المختبرة على الأوساط المناسبة عزلات من المكورات الدقيقةMicrococcus (العنقودية Staphylococcus ، المعوية Enterococcus) والعصيات Bacillus (الإشريكية القولونية E.coli ، السالمونيلة Salmonella، الزوائف Pseudomonas، الباستوريلة Pasteurella) والتي تم تشخيصها وتحديد النوع باستخدام عدة API للتشخيص.

الكلمات المفتاحية: الغلاف الحيوي، الأحياء الدقيقة، جراثيم،نظام السقاية، دواجن.

*أستاذ – قسم الإنتاج الحيواني– كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
**أستاذ مساعد – قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.
*** طالبة دراسات عليا (ماجستير)– قسم الإنتاج الحيواني – كلية الزراعة– جامعة تشرين– اللاذقية– سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم البيولوجية المجلد (31) العدد (1) 2009
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Biological Sciences Series Vol. (31) No. (1) 2009

Isolatiing and Classifying some Microorganisms in the Microbial Biofilms of the Poultry Watering Systems

Dr. Fahim Abdelaziz [*]
Dr. Ali Nisafi [**]
Boushra ALissa [***]

(Received 20 / 10 / 2008. Accepted 25/1/2009)

□ ABSTRACT □

Poultry watering systems are a suitable environment for the growth of many sorts of microorganisms which pose a serious problem for poultry industry. These microorganisms produce many pathogenic agents that may cause infection leading to higher mortality rates and less productivity of birds. Automatic nipple drinkers or hanging automatic watering system samples of two different types of poultry farms (broiler flocks, laying hens) were used. Eighty samples were examined in order to isolate and classify the bacteria on ten farms. Bacterial cultures on selective or general environments showed different strains of micrococcus *(Staphylococcus. spp Enterococcus. Spp) and Bacillus(pasteurella. spp, E.Coli, Salmonella. spp, Pseudomonas. Spp;* theses species were further classified using the API kit system.

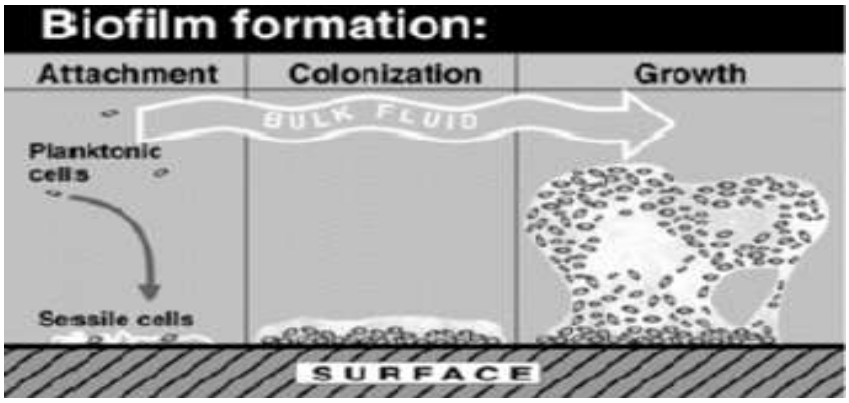
Keywords: Biofilm, Microorganism, Bacteria, Drinking Water systems, Poultry.

[*] **Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[**] **Associate Professor, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**
[***] **Postgraduate Student, Department of Animal Production, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, Syria.**

مقدمة:

الغلاف الحيوي الجرثومي هو طبقة رقيقة تضم مجموعات متنوعة من الكائنات الدقيقة microorganisms التي أحاطت نفسها بمواد غروية بوليميرية Extracellular polymeric substances (أو بما يسمى عديد السكاريد الخارجي Exopolysaccharides) تختبئ ضمنها وتساعدها على الالتصاق بالسطوح الحية live surface وبالسطوح الخاملة inert surfaces (Costerton et al.,1995) (Prakash et al., 2003) وقد وصف الباحث (Wimpenny, 2000) وآخرون الغلاف الحيوي الجرثومي على أنه تركيب تتجمع فيه كائنات دقيقة وتشكل موزاييكاً مختلف الخواص يحتوي العديد من الكائنات الممتكلة لخواص تقاربية تجعلها تتآزر مع بعضها لتنتقل من نمط العوالق السابحة الحرة freefloating إلى نمط الغلاف الحيوي الذي ينظم عمليات النمو والتطور ويؤدي إلى تشكيل مستعمرات جرثومية ملتصقة معقدة (O'Toole et al., 2000) لها عدد من الخصائص المتميزة منها إنتاج عديدات السكاريد الخارجية (Hoyle et al., 1992).

هذا ويمر تشكل الغلاف الحيوي بمراحل متتابعة تبدأ بالالتصاق attachment وتشكيل المستعمرات colonization ومن ثم نمو المستعمرات الجرثومية وتكاثرها growth (Forsythe , 2000; Frank,2001) كما هو موضح بالشكل (1).



الشكل (1): يوضح مراحل تشكل الغلاف الحيوي

ويتطور الغلاف الحيوي على مختلف السطوح الصلبة غير الحية من ضمنها المعادن (Cristina et al.,2007) والزجاج والبلاستيك (Shankaralngnam Pitchiam et al .,2006) ويمكن ملاحظة تشكل الغلاف الحيوي أيضاً في منظمات الجريان والمرشحات والمضخات وفي خزانات نظم التبريد وفي الحشيات المستخدمة في تجهيز التوصيلات وأنابيب السقاية، حيث أن هذه الحشيات توفر البيئات المناسبة لتراكم المواد العضوية عليها، كما تؤمن الصمامات مواقع جيدة للنمو الجرثومي (تشمل هذه الكائنات الجراثيم bacteria والفيروسات viruses والفطور fungi والطحالب algae والأواليات protozoa التي يمكن أن تشكل مجتمعات ذات نوع وحيد single species communities أو مجتمعات متعددة الأنواع multiple species communities تنتظم على شكل عناقيد أو طبقات ((Robin , 2001) وتشكل تراكيب أحادية أو تراكيب ثلاثية الأبعاد وقد تشكل تكتلات على شكل ندف وحبيبات (Allison et al., 1987; Prakash et al.,2003)

وحسب نتائج الكثير من الباحثين، فإن نظام الشرب هو أحد أهم وسائل نقل الجراثيم الممرضة (Mannig et al., 2007; Zimmer, 2003) نتيجة لجريان الماء بمعدلات منخفضة low flow rates في

أنظمة سقاية الدواجن واستعمال بعض المستحضرات الدوائية المنحلة في مياه الشرب، وبسبب وجود سكر العنب المستعمل بكثرة كحامل للمادة الفعالة للمستحضر، تتوضع طبقة من عديد السكاريد التي تشجع وتنشط نمو الكائنات المجهرية فيها، وكذلك ارتفاع درجات الحرارة في الحظائر بالإضافة لترسب بعض المعادن وخاصة الكلس، مما يوفر بيئات مثالية ideal environments لنمو الجراثيم وتشكل الغلاف الحيوي، الذي يؤدي في النهاية إلى تلوث مياه الشرب وعدوى الطيور (Susan et al., 2004 .). وبما أن معظم خزانات المياه معرضة لأشعة الشمس، وبالتالي إلى درجات حرارة مرتفعة، مما يوفر الحرارة اللازمة للنمو والتكاثر الجرثومي. قام مركز السيطرة على الأمراض في أطلنطا Centre for Disease Control بدراسة تبيّن أن الغلاف الحيوي يشكل خطراً حقيقياً على الإنسان والحيوان والطيور، كما يحتوي على كائنات ممرضة مثل *legionella, vibrio,campylobacter,salmonella* وحتى الفيروسات viruse (Prakash,et al., 2003). كما يمكن أن تتواجد في الغلاف الحيوي أحياء مثل ملتهمات الجراثيم bacteriophage التي تمتلك خاصية اختراق الأوليات، وتعمل على تفجيرها، محررة ألاف الجراثيم ضمن الماء الجاري <.www.dbecosystems.com.2007> حيث توفر أماكن ملائمة لنمو الكائنات الحية الدقيقة، وبالأخص الجراثيم المقاومة للحرارة thermophilic والجراثيم دقيقة الهواء *microaerophilic*
(De Beer, 1994 ; Kapperud et al., 1993)

إن تشكل الغلاف الحيوي على السطوح الداخلية لمنظومات المياه يمنع إزالة الخلايا الجرثومية بطرق الغسيل والتنظيف العادية، مما يسبب المشاكل ويحمي الخلايا من تأثير المطهرات. درست أبحاث قليلة الغلاف الحيوي الجرثومي في حظائر الدواجن، لكن يوجد اعتقاد سائد وأكيد بأن الغلاف الحيوي يتشكل في أنابيب مياه الشرب (Mattila et al.,1992) كما يلعب الغلاف الحيوي دوراً كبيراً في نقل الأمراض الجرثومية والفيروسية والأولية (Gama, 1995).

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي الأهمية العملية للبحث من كشف وتحديد بعض الجراثيم الممرضة المتواجدة في الغلاف الحيوي لأنظمة السقاية في مزارع الدواجن، فيساعد عزلها وتصنيفها على معرفة الأمراض المتوقعة والإصابات المحتملة في قطعان الدواجن.

مواد البحث وطرائقه:

1: المزارع والعينات:

خلال الفترة الممتدة من كانون الثاني إلى تشرين الثاني 2007 وضعت تحت الدراسة 10 مزارع دواجن (فروج + بياض) في مناطق مختلفة من محافظة اللاذقية (المنشأة العامة للدواجن، المؤسسة العسكرية، الخابورية، الدروقيات، قسمين، القنجرة، ست مرخو، بسنادا، المروج، كرسانا) وهذه المزارع تتبع نظام الرعاية الأرضية والرعاية في أقفاص وتتبع نظام سقاية آلية معلقة ونظام السقاية ذي الحلمة حيث عزلت 80 عينة منها 40 عينة من الغلاف الحيوي الجرثومي داخل الأنبوب و20 عينة من الخزان الرئيسي و10 عينات من الخزان الخاص بالحظيرة و10 عينات من

المناهل وقد أخذت العينات عند غياب أي نوع من المعالجة بالمضادات الحيوية وتم فحص العينات في مخبر الدواجن في كلية الزراعة– جامعة تشرين.

2: الأوساط Media

*** أوساط عامة:**

- أجار أجار Agar Agar (AA)
- أجار مغذٍ Nutrient Agar(NA)
- مرق مغذٍ Nutrient broth (NB)
- آجار ميللر هينتون Mueller- Hinton Agar (M H A)

*** أوساط استعملت في تحديد هوية الذراري المعزولة:**

- أجار ماكونكي MacConkey Agar (McC)
- أجار ملح ومانتول Mannitol salt agar (M S A)
- سالمونيلا شيجيلا Salmonella Shigella Agar (SS)
- هيكتون أجار Hektoen Enteric Agar (H E)
- أجار المكورات العنقودية .Staphylococcus 110 Agar
- أجار المكورات المعوية Enterococcus Agar (E A)
- وسط انتقائي للزوائف (Cetrimide-Nalidixic agar)
- أجار الخضرة اللامعة Brilliant green agar (BGA)
- أجار الأيوزين وأزرق الميتلين Eosin methylene blue (EMB)
- أجار اليوريا Christemsem's Agar (UA)
- أجار مدمى Blood Agar (BA)
- أجار للفيبريو كوليرا TCBS Agar
- سترات الصوديوم كوسر Koser's citrate medium
- مرق الغلوكوز واللاكتوز Glucose and Lactose broth
- ماء هضموني(الببتون) Peptone water

جميع الأوساط عقمت بالصاد الموصد (Autoclaving at 121C for 20-min) باستثناءHE و TCBS Agar و SS Agar تم تعقيمها بواسطة الحمام المائي المغلي لمدة 30/د.

3: الصبغات

استخدمت صبغة غرام التي تميز أنواع البكتريا إلى مجموعتين الأولى ايجابية الغرام تحتفظ باللون البنفسجي، والمجموعة الثانية سلبية الغرام، لا تحتفظ بصبغة بنفسجية الكريستال Crystal violet وتأخذ اللون الأحمر للسفرانين Safranin

4: الكواشف المستخدمة للاختبارات الكيميائية الحيوية Reagents for biochemical tests

Alpha-naphthol and potassium hydroxide regents(Voges-Proskauer- regents) VP_1(Ref.70 422)

Alpha-naphthol C_2H_5OH VP_2 (Ref.70 422)

ZYMA مادة معدلة TRIS

CH_3OH ZYMB
TDA(Ref.70 402) تريبتوفان دي أمينيز
CH_3COOH_5N NIT_1+ NIT_2 (Ref.70 422)
JAMES (Ref.70 542)
Oxidase(Ref.55 635)
Mineral oil (Ref.70 100)

5: طريقة تحضير العينة والزرع:

اتبعت طريقة الرج vortexing و طريقة القشط scraping (Ishida et al., 1998) باستعمال مشرط معقم لإزالة الغلاف الحيوي الملتصق على السطوح الداخلية للمشارب وفك التصاق خلايا الأحياء الدقيقة عن السطوح الصلبة، ثم مددت وغسلت بالماء المعقم، وزرعت في وسط سائل (المرق المغذي) وحضنت بالدرجة 37 ^oC لمدة 24 ساعة ثم أخذت القراءات للعكارة، وبعدها زرعت على الأوساط العامة والنوعية والتمييزية سابقة الذكر، وبعد الانتهاء من هذه العمليات والوصول إلى الزرع النقي حفظت المزارع النقية على المنابت الصلبة المائلة في الثلاجة بالدرجة 10 ^oCمن أجل العمليات اللاحقة والصورة (1) تبين نماذج من العينات المدروسة ممثلة بقطعة من أنابيب المياه الواصلة إلى المناهل والتي تحتوي على الغلاف الحيوي.

الصورة (1): قطع من أنابيب المياه تشكل على سطحها الداخلي غلاف حيوي.

6 : تصنيف العزلات:

صنفت العزلات تبعا لـ :

- الخصائص الزرعية على الأوساط النوعية (المانعة والتمييزية).
- صبغة غرام.
- الاختبارات الكيميائية الحيوية (الكاتالاز- الأوكسيداز- تخمير السكريات :لاكتوز،غلوكوز، مالتوز – تحليل الدم- الإندول – اليوريا).
- طريقة المسطرة البيولوجية باستخدام عدة API [API E20 , API staph]

النتائج والمناقشة:

أولا: النتائج

1: نتائج الزرع:

بنتيجة عمليات الزرع الجرثومي على المستنبتات المختلفة تم الحصول على/65/ عزلة جرثومية أعطت نتيجة ايجابية من أصل /80/ عينة يبينها الجدول (1)

الجدول (1): نتائج الزرع الأولي للعينات في المرق والآجار المغذي.

العينات / المستنبت	ع1	ع2	ع3	ع4
NB	+	+	+	+
NA	+	+	+	+
عدد العينات الإيجابية	2	3	40	20

حيث: ع1: عينة خزان الماء الرئيسي، العدد الكلي(10)

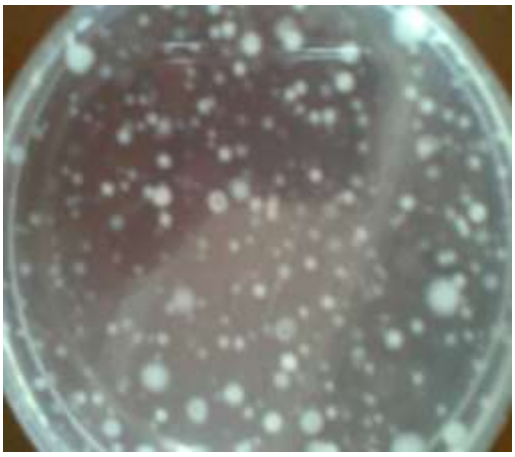
ع2: عينة الخزان الفرعي ضمن الحظيرة، العدد الكلي(10)

ع3: عينة الغلاف الحيوي داخل الأنبوب، العدد الكلي(40)

ع4: عينة الغلاف الحيوي (الحلمة، المشرب)، العدد الكلي(20)

+ نمو جرثومي على شكل ندف أو عكارة في المرق المغذي أو مستعمرات على طبق الأجار المغذي.

والصورتان (3,2) توضحان الفرق بين نمو المستعمرات الجرثومية للعينات ع1 ، ع3 على الأجار المغذي بعد \24\ساعة من الزرع.



الصورة (2): النمو الجرثومي الكثيف في إحدى عينات الغلاف الحيوي ع3 على الأجار المغذي

الصورة (3): النمو الجرثومي في إحدى عينات الخزان الرئيسي ع1 على الأجار المغذي

2 : نتائج تصنيف العزلات:

أ- التصنيف تبعا للخصائص الزرعية:

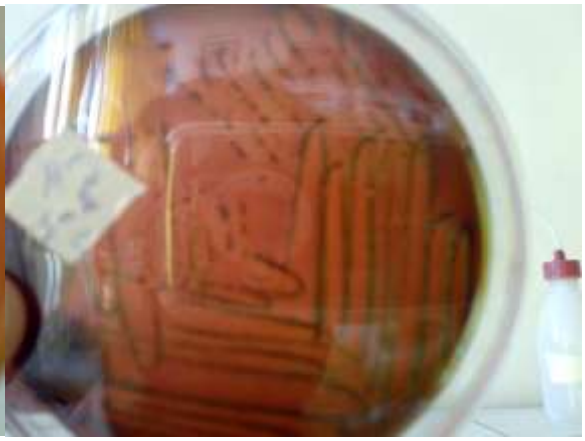
يظهر الجدولان (2,3) والصور اللاحقة الخصائص الزرعية للنموات الجرثومية على المستنبتات المختلفة النوعية والانتقائية، إذ تم تصنيفها مبدئياً تبعاً لهذه الخصائص وبذلك تم عزل 6 مجاميع جرثومية صنفت كإشيريكية قولونية E.Coli وسالمونيلة Salmonalla وزوائف Pseudomonas ومكورات معوية Enterococcus وباستوريلة Pasteurella وعنقوديات Staphylococcus

الجدول (2): نتائج زرع العزلات تبعاً للخصائص اللونية على الأوساط النوعية.

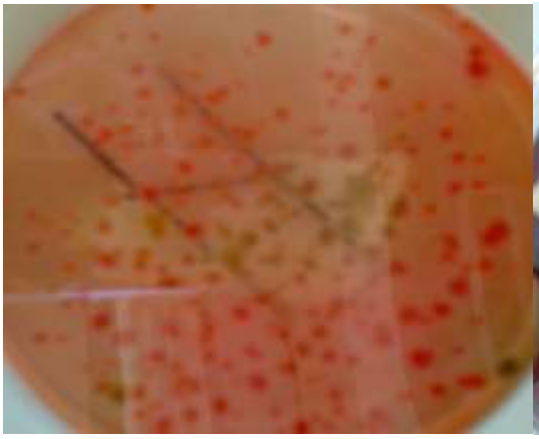
عزلات / المستنبتات	*E. coli*	*Salmonella*	*Pseudomonas*	*Enterococcus*	*Pasteurella*	*Staphylococcus*
N A	مستعمرات رمادية	مستعمرات رمادية	مستعمرات شفافة	مستعمرات دون لون		مستعمرات صفراء
McC	مستعمرات زهرية	مستعمرات دون لون	مستعمرات غير ملونة أو خضراء أو زرقاء	مستعمرات دون لون	مستعمرات زهرية	يمنع النمو
HEA	مستعمرات زهرية	مستعمرات مسودة في المركز	مستعمرات ذات لمعة خضراء إلى مزرقة	مستعمرات بلون قرنفلي ضارب للصفرة		يمنع النمو
MSA	يمنع النمو					مستعمرات صفراء، حمراء

الجدول (3) نتائج تصنيف العزلات تبعاً للخصائص اللونية على المستنبتات المانعة والانتقائية

العزلات / المستنبتات	*E. coli*	*Salmonella*	*Pseudomonas*	*Enterococcus*	*Pasteurella*	*Staphylococcus*
B GA	مستعمرات دون لون خضراء مصفرة	مستعمرات دون لون والوسط تلون بالزهري	مستعمرات حمراء صغيرة	مستعمرات زهرية		يمنع النمو
B A			مستعمرات رمادية مخضرة		مستعمرات رمادية لامعة	مستعمرات رمادية
SS	مستعمرات زهرية	مستعمرات عاتمة في المركز		مستعمرات بلون كريمي أو زهري		يمنع النمو
E MB	مستعمرات خضراء مع لمعة معدنية	مستعمرات مسودة في المركز	مستعمرات دون لون	مستعمرات زهرية		
TC BS	مستعمرات صفراء	يمنع النمو				يمنع النمو

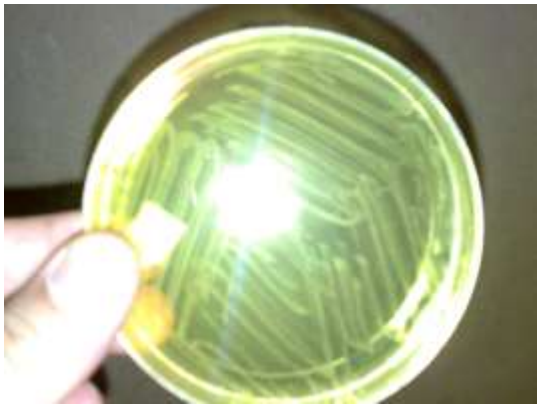


الصورة (4): الأشريكية القولونية بلمعة خضراء على EMB.



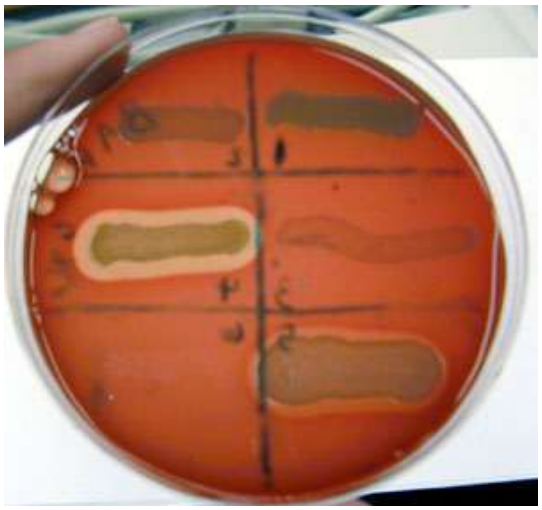
الصورة (5): الأشريكية القولونية والسالمونيلة علىMcC .

الصورة (6): الأشريكية القولونية والسالمونيلة والزائفة علىHEA

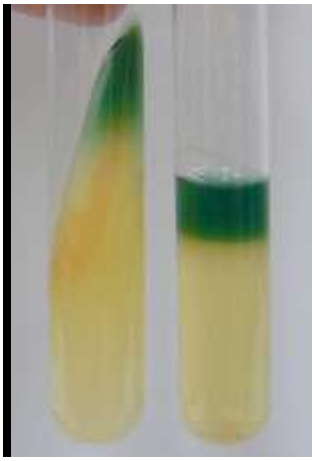


الصورة (7): العنقودية الذهبية وقد حولت الوسط MSA الزهري إلى اللون الأصفر

الصورة (8): السالمونيلة بدون لون وقد حولت وسط BGA إلى لون زهري خفيف



الصورة (9): الباستوريلة على BA وقد سببت تحلل الدم



الصورة (10): الزائفة الزنجارية معطية الصبغة التألقية الخضراء

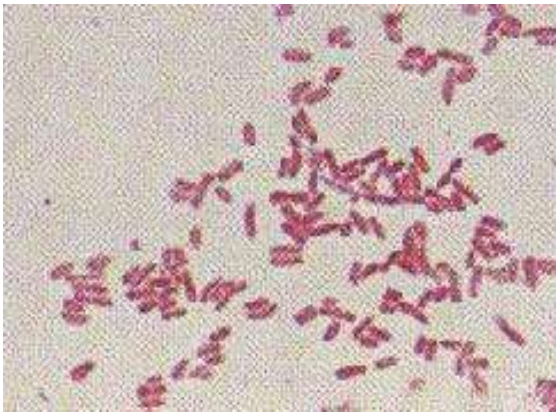
الصورة (11): مزرعة نقية للأشريكية القولونية على McC .

ب – التصنيف تبعاً للصبغات والفحص المجهري:

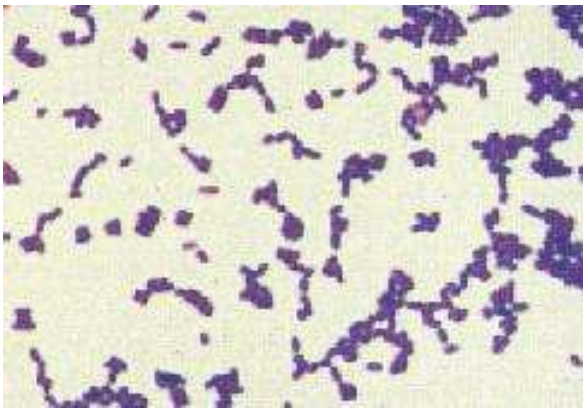
بينت نتائج أخذ المسحات الجرثومية للعزلات المختلفة وصبغها بصبغة غرام، ومن ثم فحصها تحت المجهر ومشاهدة الصفات المجهرية وجود /39/ مستعمرة نقية من العصيات السلبية لملون غرام ضمت الإشيريكية القولونية والسالمونيلة والزوائف والباستوريلة والمكورات المعوية و /26/ مستعمرة نقية من المكورات ضمت عنقوديات ايجابية لملون غرام والمعويات السالبة لملون غرام. وخصائصها موضحة في الجدول رقم (4)، كما توضح الصورتان (12) و (13) العصيات السالبة لملون غرام والمكورات الموجبة لملون غرام.

الجدول (4) تصنيف العزلات من العصيات والمكورات تبعاً لصبغة غرام والفحص المجهري.

العزولات / الصبغة	*E.coli*	*Salmonella*	*Pasteurella*	*Staphylococcus*	*Enterococcus*	*Pseudomonas*
غرام	–	–	–	+	–	–
الفحص المجهري	عصيات مستقيمة، أطرافها مدورة، منفردة أو في سلاسل	عصيات ثخينة، طويلة	عصيات بيضوية، ثنائية القطبين	مكورات دقيقة، مدورة، منتظمة عنقودياً	مكورات بيضوية، منتظمة عقدياً	عصيات رفيعة، مستقيمة



الصورة (12): العصيات سلبيات الغرام وهي ذات لون أحمر



الصورة (13): المكورات ايجابية الغرام وهي ذات لون بنفسجي

ج- التصنيف تبعاً للتفاعلات الكيميائية الحيوية:

تبين معطيات الجدول (5) خصائص العزلات المختلفة في الاختبارات الكيميائية الحيوية من حيث تخمر السكريات وتحليل الدم وتشكل حلقة الإندول.

الجدول (5): نتائج تصنيف العزلات السلبية والموجبة لملون غرام تبعاً للاختبارات الكيميائية الحيوية

	الكاتالاز	الأوكسيداز	تخمر اللاكتوز	تخمر الغلوكوز	تخمر المالتوز	تحلل الدم	الأندول	اليوريا
E. coli	+	–	+	+	+	+\–	+	–
Salmonella	–	–	–	+	+	–	–	–
Pasteurella	+	+	–	+	–	–	–	–
Pseudomonas	+	+	–	–	–	+	–	–
Enterococcus			+	+	+	+	–	–
Staphylococcus	+	–	+	+	+	+\–	–	–

د- التصنيف تبعاً للمسطرة البيولوجية "API":

الـ API عبارة عن نظام قياسي مصمم بحجم صغير مؤلف من حجر اختبار يحتوي على كواشف الاختبارات الحيوية للكشف عن بعض الوظائف البيوكيميائية للبكتريا فقد استخدمت مسطرة بيولوجية للعنقوديات API Staphموضحة في الصورة(14) وقد تم تمييز 26 نوعاً من العنقوديات والجدول (6) يوضح نتائج اختبارات الـ Api Staph، إذ ظهرت عزلات مكررة على الشكل التالي: سبع عزلات S_1 وخمس عزلات S_4 وأربع عزلات S_9 وأخرى لتمييز العائلة المعوية API 20 E التي أظهرت 39 نوعاً من العائلة المعوية منها ست عزلاتE_1 وثلاث عزلات E_2 وخمس عزلات E_3 وست عزلات E_4 وثلاث عزلات E_5 وأربع عزلات E_6 وأربع عزلات E_8 وأربع عزلاتE_{11} ونتائج العزلات الأخرى موضحة في الجدول (7) نتائج الاختبارات. هذا وقد قمنا بتطبيق هذه الطريقة في هيئة التقانة الحيوية بدمشق.

الجدول (6): نتائج اختبارات الـAPI Staph :

	0	GLU	FRU	MNE	MAL	LAC	TRE	MAN	XLT	MEL	NIT	PAL	VP	RAF	XYL	SAC	MDG	NAG	ADH	RE
S_1	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	V	+	-	-
S_2	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
S_3	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
S_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S_5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
S_6	-	+	V	V	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-
S_7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
S_8	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	+	+	V	+	-	-
S_9	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
S_{10}	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_{11}	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_{12}	+	-	+	-	+	+	-	V	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
S_{13}	-	-	+	+	+	+	+	V	V	+	+	V	+	+	+	+	+	+	+	-

موجبة التفاعل: +

سالبة التفاعل :−

V: variable

S_1:*S. lentus*; 67375750

S_2: *S .aureus* 6733751

S_3: *S.intermedius* 6736150

S_4: *Micrococcuc spp* 0004000

S_5: *S .lentus* 6773751

S_6: *S. Lugdunensis* 6716150

S_7:*Micrococcuc spp* 0014000

S_8: *S.lentus* 6737670

S_9: *S. epidermidis* 6706113

S_{10}: *S.capitis* 35661

S_{11}: *Micrococcus spp* 700405

S_{12}: *S. xylosus* 700404

S_{13}: *S. lentus* 700403

الجدول (7): نتائج اختبارات الـAPI 20 E :

strians	ONP	ADH	LDC	ODC	CIT	H_2S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	RA
E_1	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
E_2	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
E_3	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
E_4	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
E_5	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E_6	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E_7	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
E_8	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E_9	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
E_{10}	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+
E_{11}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

موجبة التفاعل: +

سالبة التفاعل :−

V: variable

E_1: *E.coli* 5144572

E_2: *E.coli* 4044572

E_3: *E.coli* 4144572

E_4 :*Salmonella enterica* 1004020

E_5 : *Pseudomnas orryzhihabitanus* 0220000

E_6: *Salmonella typh*i 0200000

E_7: *Pseudomnas luteola* 1000002

E_8: *Pasteurella pneumoniae* 1000000

E_9: *P.aeryginosa* 0206002

E_{10}: *Citrobacter freundii* 3604572

E_{11}: *Pseudomonas orryzhihabitanu* 0000002

الصورة(14) مسطرة بيولوجية API Staph

الصورة(15) مسطرة بيولوجية API 20 E

ثانيا:المناقشة

تبين النتائج والجداول الموضحة لها عزل مجاميع متعددة ومختلفة من الأحياء الدقيقة المتواجدة في الغلاف الحيوي الجرثومي لأنظمة الشرب في مزارع الدواجن، وهذا يتوافق مع دراسة (Stewart et al ., 2000) حيث تبين أن الغلاف الحيوي يتألف من مزيج من الأنواع الجرثومية، وعند مقارنة نتائج الفحص الجرثومي للعينات ع1 ، ع2 ، ع3 ،ع4 وجد أن ع3 ،ع4 والتي كان عددها على التوالي 40، 20 أعطت نمواً جرثومياً أكثف عند زرعها في المرق المغذي وعلى المستنبتات الجرثومية في أطباق بتري، بالمقارنة مع عدد وتنوع وحجم نمو المستعمرات للعينات ع1 ، ع2 التي عددها 10،10 فقد حصل النمو الجرثومي عند /5/ عينات فقط من أصل /20/ وهذا يتطابق مع نتائج (Lawrence et al ., 1991)إذ ظهر أن عدد الخلايا الحرة السابحة أخفض بـ 500− 50.000 مرة من عدد الخلايا في الغلاف الحيوي المتشكل في أنظمة إمدادات المياه. كما لوحظ أن أقل تلوث جرثومي ظهر في ع1، فقد أعطت عينتان فقط من أصل /10/ عينات نمواً جرثومياً، وهذا يعني أن الجراثيم تنجرف مع تيار الماء ولم تسمح لها الفرصة والوقت الكافي للالتصاق والبقاء في الخزان. كما تتوافق هذه النتائج مع معطيات (Amaral, et al., 2004; Edstorm, 2006) الذي أوضح أن الغلاف الحيوي يعد مستودعاً للعديد من البكتريا الحرة السابحة في أنابيب مياه المشارب، ومع ما أورده (Prakash, et al., 2003) الذين كشف أنه في أي نظام مائي تفضل حوالي 99% من البكتريا في أنظمة الشرب الآلية أن تعيش ضمن غلاف حيوي ملتصق بالسطوح الداخلية لهذه الأنظمة.

وكذلك فإن النتائج التي تم الوصول إليها في هذه الدراسة والتي مكنت من عزل مجموعة واسعة من الأحياء الدقيقة ضمت الـ *Enterococci, Staphylococcus, Pseudomonas, Salmonella, E.coli , Pastuerella* تتوافق مع معطيات (Jann et al ., 2001) التي تبين أن الغلاف الحيوي في أنظمة توزيع المياه يشتمل على أحياء دقيقة أخرى مثل الـ *Salmonella, Campylobacter* وعزل البكتيريا *Mycobacterium ssp* و *Helicobacter pylori* و *Legionella* وأنواع محددة من السالمونيلة كـ *S.typhi* و *S. paratyphi.* و *S.enterica*.

كما أن المسحات المأخوذة من الغلاف الحيوي المتشكل على الحشيات المستخدمة في تجهيز توصيلات الأنابيب في أنظمة السقاية والتي كانت مصنوعة من البلاستيك والمطاط في المزارع التي المدروسة كانت إيجابية وظهرت بعض هذه الحشيات متآكلة وهذا يتطابق مع نتائج أبحاث (De-Beer et al ., 1994) إذ إن هذه الحشيات توفر المكان المناسب لتراكم المواد العضوية والأوساخ وتساعد على تشكل الغلاف الحيوي ونمو الجراثيم في أنظمة مياه الشرب. كما تؤمن الصمامات valves مواقع جيدة للنمو الجرثومي بسبب موضعها في التجهيزات، وتكون الحشيات فيها أكثر عرضة للتآكل والاحتكاك. وهذا يتوافق مع الاختبارات التجريبية التي استعمل فيها المطاط والتيفلون كمادة حشوية حيث يمكن أن يستعمل المطاط كمصدر طاقة للكائنات الحية المجهرية، وهذا يوفر أماكن ملائمة لنمو الكائنات الحية الدقيقة (De-Beer et al ., 1994).

تبيّن أيضاً أن عينات الماء المأخوذة من المزارع الست التي تتبع نظام المشارب الآلية المعلقة كانت ملوثة بالسالمونيلة أما في المزارع التي تتبع نظام السقاية ذي الحلمات ظهرت السالمونيلة في مزرعتين من أصل / 4 / وقد برر ذلك على ضوء نتائج أبحاث (Renwick et al, 1992., Poppe et al., 1991; Jafari et al., 2006) أن خطر التلوث بالسالمونيلة يزداد عندما تكون المشارب مكشوفة open drinkers على الوسط المحيط لأن الفرشة litter تعد مصدراً للسالمونيلة .

لوحظت فروقات واضحة في حجم الغلاف الحيوي بين المزارع المدروسة، وسجل اختلاف واضح في حجم الغلاف الحيوي بين الحظائر ضمن مزرعة واحدة فقط (مزرعة دجاج بياض) وبالرجوع إلى سجلات تلك المزرعة عزي السبب إلى عدم إجراء عمليات التنظيف الفعالة والتطهير المناسبة، وعدم إجراء عملية التجفيف بعد كل عملية تنظيف للتجهيزات المختلفة في الحظائر، وغياب شبه كامل لطرق الشطف الميكانيكي، وقلة فترة المعالجة بالقلويات alkaline treatment time وقلة زمن ملامسة المطهرات للسطوح الداخلية للأنابيب، الذي يساعد على قتل الكائنات الدقيقة، وقد ذكر الباحثون (Gilbert *et al.*, 1998; Costerton *et al.*, 1995) أن حجم الغلاف الحيوي يزداد بمرور الوقت، ويمكن أن تتفاوت سماكة الغلاف الحيوي من طبقة ذات خلية وحيدة إلى عدة طبقات من الخلايا تصل سماكتها لعدة سنتيمترات، وهذا يعتمد على منتجاته وعلى توفر شروط نمو مناسبة وعدم اتباع عمليات التنظيف والتطهير الروتينية والفعالة.

الاستنتاجات والتوصيات:

- لوحظ مستوى عال للتلوث الميكروبي في أنظمة السقاية للمزارع المدروسة.
- يعد الغلاف الحيوي مسكناً آمناً للعديد من البكتريا الحرة السابحة(freefloating) في أنابيب مياه المشارب، لذلك من الضروري تبديل هذه الحشيات والصمامات والأنابيب عندما ينتهي عمرها الزمني.

– يجب إزالة الغلاف الحيوي من أنظمة سقاية الدجاج، إذ يعد ذلك جزءاً أساسياً من أي برنامج صحي وقائي، وقد أثبت الخبراء أن تقديم مياه نقية للطيور يرفع عوائد استثمار الدواجن لأكثر من 20 مرة.

– يلعب الغلاف الحيوي دوراً كبيراً في نقل الأمراض الجرثومية والفيروسية، ومن الصعب جداً ضبط مستوى التلوث البكتيري لمصدر المياه وحددت العديد من الأبحاث السابقة مستوى المسببات الإمرضية والملوثات في المياه غير المعالجة.

– يجب استعمال طرق التنظيف الفعالة التي تتضمن منظفات فعالة ضد الكائنات الدقيقة التي من المحتمل تواجدها في خزانات مياه الشرب وفي أنابيب السقاية مع العلم أنها قد تتكييف مع كل تقنيات التنظيف لتحافظ على بقائها.

– فهم آلية التصاق الجراثيم وتطور الغلاف الحيوي على السطوح الداخلية لمنظومات سقاية الدواجن المختلفة مطلوب لتحديد آلية السيطرة على هذه المشكلة.

المراجع:

1. AMARAL, L.A.,. *Drinking water as a risk factor to poultry health*. Braz. J. Poult.: 2004, 191-199.
2 . ALLISON, D., and SUTHERLAND I.. *The role of exopolysaccharide in adhesion offreshwater bacteria*. J. Gen Microbiol. 133: 1987, 1319-1327.
3. COSTERTON, J. W., Z. LEWANDOWSKI, D. E. CALDWELL, D. R. KORBER, and. LAPPIN- H. M SCOTT. Microbial biofilms. In: L. N. Ornston, A. Balows, and E.P.Greenberg Annual Reviews, Inc.,Palo Alto, CA. (ed.) Annu. Rev. Microbiol No. 49. 1995. 711-745.
4. CRISTINA L. C. ESTEVES, BRADLEY D. JONES, and STEVEN CLEGG. Biofilm Formation by Serovar Typhimurium and Escherichia coli on Epithelial Cells following Mixed Inoculations Infection and Immunity**,** Vol. 73, No5, 2005, 5198-5203
5. DE-BEER, D., SRINIVASAN, R., AND STEWART, P.S. *Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection*. Appl. Environ.Microbiol., 60: 1994, 4339-344.
6. EDSTORM *Biofilm Key understanding and controlling bacteria growth in automated Drinking Water Systems*. 2006, 1-7.
7. FORSYTHE, S.J. *The microbiology of safe food*. Blackwell Science, London. 2000
8. FRANK, J.F.. *Microbial attachment to food and food contact surfaces*. Adv. Food. Nutr. Res., 43: 2001, 319-369.
9. GAMA MSQ. *Água, que cura, que nutre, que mata*. Aves & Ovos, 1995; pp.30-33.
10. GILBERT P. AND BROWN M.R.W. *Biofilms and p-lactam activity. J. Antimicrob. Chemother*. 41**:** 1998, 571 - 580.
11. HOYLE, B.D., JASS J. and COSTERTON, J.W. *The biofilm glycocalyx as a resistance factor*. J. Antimicrob. Chemother, 26, 1992, 1-6
12. ISHIDA H., ISHIDA Y., KUROSAKA Y., OTANI T., SATO K. AND KOBAYASHI H. *In vitro and in vivo activities of levofloxacin against biofilm- producing Pseudomonas aeruginosa***.** Antimicrob. Agents Chemother, 42: 1641 - 5,1998,
13. JAFARI , R.A. FAZLARA A. and GOVAHI M .*An investigation into salmonella and fecal coliform contamination of drinking water broiler farms in Iran*. International Journal of Poultry Science 5 ,5, ISSN 1682-8356, 2006, 491-493

14. JANN M. ICHIDA, LUCIE KRIZOVA, COLLEEN A. LEFEVRE, HAROLD M. KEENER, DAVID L. ELWELL and EDWARD H. BURTT, JR**.** *Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost*. Journal of Microbiological methods, 2001, 43-57.
15. KAPPERUD G, SKJERVE E, VIK L, HAUGE K, LYSAKER A, AALMEN I, OSTROFF SM, POTTER M. *Epidemiological investigation of risk factors for Campylobacter colonization in Norwergian broiler flocks*. Epidemiology and Infection, 111,2, 1993, 245-255
16. LAWRENCE J. R., KORBOR D.R., HOYLE B. O., COSTERTON J.W. AND CALDWELL D.E. *O ptical sectioning of Microbiol Biofilms* . Bacteriol,176: 1991, 37-42.
17. MANNIG.L ,CHADD.S.A. AND BAINES .R.N. KEY HEALTH and WELFARE. Indicators for broilar prodcution world's poultry science .Journal,Vol.63, 2007.
18. MATTILLA-SANDHOLM, T., AND G. WIRTANEN.. *Biofilm formation in the industry: A review. Food Reviews Intl*. 84,4, 573-603 1992
19. O'TOOLE, G. A., and R. KOLTER.. *Flagellar and twitching motility are necessary for Pseudomonas aeruginosa biofilm development*. Mol. Microbiol. 30,2,2000, 295-304.
20. PRAKASH. B. VEEREGOWDA. M and KRISHNAPPA G. *Biofilms: A survival strategy of bacteria*. Current Science, Vol. 85, No. 9, 10 November 2003, 85-97.
21. POPPE C, IRWIN RJ, MESSIER S, FINLEY GG, OGGEL J. *The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks*. Epidemiology and Infection, 107, 1991, 201-211.
22. ROBIN K. KING. *The presence of Bacterial pathogens in recirculating Aquaculture system biofilm and their response to various sanitizers*. Ph.D thesis in Food Science and Technology,Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, 2001,189.
23. RENWICK AS, IRWIN RJ, CLARKE RC, MCNAB WB, POPPE C. *Epidemiological association between characteristics of registered broiler chicken flocks in Canada and the Salmonella culture status of floor litter and drinking water*. Canadian Veterinary Journal; 33, 1992, 449-458
24. SHANKARALNGNAM PITCHIAM, M.S., M.B.A. *Comparison of wire and plastic belts on microbial attachment and biofilm formation*, A thesis in food technology. Submitted to the Graduate Faculty of Texas Tech University Graduate School, August, 2006, 213.
25. Susan Watkins, Lisa Newberry, Melony Wilson and Robert Hubbard *Water Sanitation: Evaluation of Products* Spring 2004 • Volume 6, Number 1, 123-132
26. STEWART, P.S., ROE, F., RAYNER, J., ELKINS, J.G., LEWANDOWSKI, Z., OCHSNER, U.A., AND HASSELT, D.J. 2000. *Effect of catalase on hydrogen peroxide penetration into Pseudomonas aeroginosa biofilms. Appl. Environ. Microbiol*., 66: 836-838.
27.WIMPENNY. J., W. M., U. SZEWZYK. *Hetrogeneity in biofilms*. In: S. B. Mohanty (ed.) Electron microscopy for biologists.. Charles C. Thomas, Springfield, 2000, 292
28. ZIMMER M, BARNHART H, IDRIS U, LEE MD. *Detection of Campylobacter jejuni strains in the waterlines of a commercial broiler and their relationship to the strains that colonized the chickens*. Avian Diseases 47,1, 2003, 101-107.