بررسی اثر بنتونیت روی فلور میکروبی روده ی جوجه های گوشتی

فاطمه نظری، محمد دخیلی* [۲]، سهیل آقایی۳، محمد یگانه پرست۴

۱دانشجوی کارشناسی ارشدمیکروب‌شناسی،دانشگاه آزاداسلامی، واحد قم، قم، ایران.

۲استادیار قارچ شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی،واحد قم، ایران.

۳استادیار میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزد اسلامی، واحد قم، قم ایران.

۴.مربی مرکز تحقیقات کشاورزی ومنابع طبیعی

*نویسنده مسئول:قم،خیابان پانزده خرداد،دانشگاه آزاداسلامی صندوق پستی:۳۷۱۸۵/۳۶۴ تلفن:۵-۷۷۸۰۰۰۱ - ۰۲۵۱نمابر:۷۲۳۳۳۶۶پست الکترونیک:**Dr_dakhili@yahoo.com**

چکیده:

این پژوهش به منظور مطالعه ی اثر بنتونیت روی فلور میکروبی روده ی جوجه های گوشتی صورت گرفته است. در این آزمایش از انواع ودر صدهای مختلف بنتونیت استفاده کردیم . در مرحله اول ۴ تیمار مختلف از این افزودنی معدنی ذکر شده به جیره ی غذایی تعداد مشخصی از این جوجه های گوشتی اضافه شد. اسامی تیمارهای به کار رفته شامل: تیمار ۱ (شاهد)و تیمار ۲(بنتونیت موسسه ۱٪)وتیمار ۳(بنتونیت صفاری ۰/۵٪)و تیمار ۴(بنتونیت صفاری ۱٪)وتیمار ۵(بنتونیت صفاری ۱/۵٪) می باشد.

براساس نتایج این آزمایشات و با توجه به جداول زیر در یافتیم که افزودن این ماده به جیره ی غذایی طیور و تحت تاثیر قرار گرفتن با انواع ودر صدهای مختلف بنتونیت ، فقط بر روی شمارش تعداد کل باکتری های روده ای و شمارش و تعداد باکتری های گرم منفی بستر در محیط ائوزین متیلن بلو تاثیر گذاشته است چون لگاریتم این دو بخش ذکر شده کمتر از۰/۰۵شده است ($p<0/05$). و اختلاف معنی داری را نشان داده است ولی افزودن این ماده روی شمارش تعداد باکتری های گرم منفی روده ای و شمارش تعداد کل باکتری های موجود در بستر در محیط بلاد آگار و میزان رطوبت بستر و میزان PHروده ای ، تاثیر زیادی نگذاشته است چون لگاریتم این بخش های ذکر شده بیشتر از ۰/۰۵شده است($p> 0/05$) و اختلاف بی معنی است.

چند سویه از انتروباکتریاسه هایی را از نمونه های بستر وروده ی طیور جداکردیم . بااستفاده از روش Disk diffusion حساسیت سویه های اشرشیا کلی و سودوموناس وسیترو باکتر و کلبسیلارا به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، نئومایسین ، آمپی سیلین، نور فلوکساسین، اریترومایسین، جنتامایسین، ریفامپیسین، پنی سیلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سفیکسیم، کانامایسین ، مورد بررسی قرار گرفت.

لغات کلیدی: بنتونیت ، فلور میکروبی ، جوجه های گوشتی

۱-مقدمه:

امروزه پرورش متراکم حیوانات خصوصا طیور سبب شده تا حساسیت آنها نسبت به بیماری های روده ای افزایش یابد. طیور نسبت به کلونیزه شدن با میکروارگانیسم های بالقوه مضر مانند روتاویروس ، اشرشیا کلی ، گونه های سالمونلا وکلستریدیوم پرفرینجنس حساس هستند. به منظور کنترل بعضی از این مشکلات ، استفاده از آنتی بیوتیک ها در خوراک هم در سطح درمانی (برای درمان بیماری ها) و هم در سطوح پایین تر از دز درمانی (به عنوان محرک رشد) گسترش زیادی یافته است.(۲۰).

علی رغم نتایج مطلوب استفاده از آنتی بیوتیک ها در خوراک دام وطیور، امروزه فشار روز افزونی در جهت حذف استفاده از آنها در جیره حیوانات وجود دارد و این به دلیل احساس خطری است که در مصرف کنندگان محصولات دامی در ارتباط با میکروب های مقاوم شده به آنتی بیوتیک ها دیده شده است. مصرف زیاد آنتی بیوتیک در پرورش دام وطیور موجب پیدایش سویه های مقاوم باکتری ها و قابلیت انتقال ژن مقاومت به باکتری های حساس گردید به طوری که سلامت دام مصرف کننده آنتی بیوتیک و انسان مصرف کننده محصولات دامی در معرض خطر جدی قرار گرفت.(15).

تا کنون گزارش هایی در مرد سالمونلای مقاوم (۴)، کمپیلوباکتر مقاوم(۹) و انتروکوکسی های مقاوم به چند نوع آنتی بیوتیک (۷) وجود داشته است که اکثرا به استفاده بی رویه و کنترل نشده از آنتی بیوتیک ها بخصوص به عنوان افزودنی غذایی در جیره حیوانات ،نسبت داده شده است . خطر میکروب های مقاوم به آنتی بیوتیک ها در سال های اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته و پژوهش های زیادی به منظور یافتن جایگزین های مناسب برای آنتی بیوتیک ها صورت گرفته است.

از سوی دیگر مشخص شده که فلور میکروبی نرمال دستگاه گوارش دارای آثار مثبتی روی سیستم ایمنی بدن(۳) بوده و هم چنین می تواند مانع کلونیزه شدن دستگاه گوارش توسط میکروارگانیسم های بیماری زا شود (۱۳،۱۷،۱۹) . استفاده از آنتی بیوتیک ها به صورت خوراکی از طریق ایجاد اختلال در تعادل میکروبی موجود در دستگاه گوارش ، سبب حذف مزایای آن برای میزبان می شود.

در طی سال های گذشته جایگزین های زیادی مانند آنزیم ها، پروبیوتیک ها ، اسیدهای آلی و خاکهای معدنی و... معرفی شده اندو در هر مورد تحقیقات قابل توجهی صورت گرفته است(۸).

مشخصات بنتونیت:

بنتونیت در خانواده سیلیکات های صفحه ای و گروه اسمکتیت بوده و از نظر ساختمانی دارای ساختمان سه لایه ای هستند که یک لایه آلومینیوم اکتائدری(هشت وجهی) بین دو لایه سیلیس تترائدر(چهار وجهی) قرار می گیرد. صفحات چهاروجهی

از SiO_4 تشکیل شده است و هر چهاروجهی آن توسط ۳ اتم اکسیژن با چهار وجهی های مجاور خود پیوند می یابد. بنتونیت حاوی هیدروکسیل (OH) اند که در مرکز حلقه شش تایی قرار می گیرند .صفحات چهار وجهی توسط صفحات هشت وجهی به یکدیگر متصل می شوند . صفحات هشت وجهی از کاتیون های دو و سه ظرفیتی تشکیل شده اند . نحوه قرار گرفتن صفحات چهار وجهی و هشت وجهی به حالت T-O-T است . فاصله بنیادی در این گروه ۱۴ آنگستروم است ولی بعلت توانایی جذب مولکول های آب توسط اسمکتیت این فاصله می‌تواند از ۹/۶ تا ۲۱/۴ آنگستروم تغییر کند .(۲)

مصارف انواع بنتونیت ها:

•بنتونیت های فعال طبیعی و بنتونیت های فعال شده توسط اسید: این نوع بنتونیت ها در صنایع غذایی ، صنایع شیمیایی ، تهیه گوگرد ، صنعت نفت ، کاغذ سازی ، صنعت قند وشکر و نوشابه ، کنترل آتش سوزی و تمیزکننده وجود دارند.

•بنتونیت های فعال طبیعی و بنتونیت های جانشینی سدیم: این نوع بنتونیت ها در صنایع شیمیایی ، کاغذ سازی ، صنعت قند و شکر و نوشابه ، تمیزکننده ، موادمعدنی ، سرامیک ، کشاورزی ، حفاری و ریخته گری وجود دارند.

ریخته گری: از بنتونیت های سدیم دار به دلیل خاصیت پلاستیکی و چسبندگی آن در تهیه قالب های ریخته گری استفاده می شود . در تهیه قالب های ریخته گری ، بنتونیت به دلیل چسبندگی ، دانه های ماسه را به هم متصل می نماید و خاصیت پلاستیکی آن موجب می شود تا زیر فشار آن را متراکم نموده و شکل مناسب قالب را تهیه نمود.

گندوله آهن: از بنتونیت های سدیم دار برای تهیه گندوله آهن استفاده می شود.

حفاری چاه : در حفاری نفت و گاز از بنتونیت های سدیم دار استفاده می شود . با آزاد شدن بنتونیت در آب، پوسته‌های نسبتاً بزرگ سدیم بنتونیت به ذرات کلوئیدی تبدیل شده و انرژی الکتریکی ذخیره شده در شبکه بلوری را آزاد می‌کنند و در حدود ۱۵ تا ۳۰ برابر حجم اولیه متورم می‌شوند. از این خاصیت در حفاری برای پراکنده سازی مواد سنگین‌کننده و قطع حفاری استفاده می‌شود، بدین صورت بنتونیت پوششی را روی دیواره چاه ایجاد کرده و از مهاجرت نفت و گاز ممانعت می‌کند و دیواره را پایدار و مته را نیز چرب می‌کند. همچنین بنتونیت، مواد آلی و غیر آلی را از مخلوط آب جذب کرده و ویسکوزیته آن در برداشت و بالا آوردن نخاله‌های حفاری کمک می کند. بنتونیت۲-۵ ٪ وزنی گل‌های حفاری آبی را تشکیل می‌دهد.

تصفیه و رنگبری: در صنعت تهیه روغن دانه های گیاهی و پتروشیمی از بنتونیت کلسیم دار به دلیل قابلیت مناسب جانشینی کاتیونی و خاصیت رنگبری استفاده می شود.

فضولات گاوی: در گاوداری ها از بنتونیت سدیم دار به دلیل قابلیت جذب بالای آن برای جذب ادرار و دیگر فضولات استفاده می شود . در امریکا ۲۱ ٪ بنتونیت در این بخش به مصرف می رسد.

مواد شوینده: در تهیه مواد شوینده از بنتونیت سدیم و یا کلسیم دار به دلیل جلوگیری از راسب شدن مواد خاصیت نرمی آن استفاده می شود.

داروسازی: بنتونیت در صنایع داروسازی به نام صابون کانی یا صابون رسی معروف است . این ماده به صورت طبیعی ، به حالت سیلیکات آبدار آلومینیوم $Al2O3.4SiO2.H2O$ است که عمدتاً از مونت موریلونیت تشکیل شده است و ممکن است عناصر کلسیم ، منیزیم و آهن نیز در ترکیب آن وجود داشته باشد. پودر دارویی بنتونیت بسیار دانه ریز ، بی بو و به رنگ سفید مایل به خاکستری با حالتی زرد یا صورتی است. بنتونیت در آب غیر محلول است و با جذب مقدار کمی از آب متورم می شود و سوسپانسیون ۲ ٪ آن در آب ، PH قلیایی (۹/۵ تا۱۰/۵) تولید می کند . بنتونیت با جذب آب به صورت ژل در می آید که غلظت آن به مقدار بنتونیت وارد شده در آب بستگی دارد. از خاصیت جذبی این ماده به عنوان تثبیت کننده و تصفیه کننده استفاده می شود . نام دارویی این ماده لوسیون کالامین (Calamin-Lotoin)یا بنتونیت ماگما می باشد.

کاربرد در مهندسی عمران : علاوه بر خواص قبلی، سدیم بنتونیت دارای پلاستیسیته و چرب‌کنندگی خوب، مقاومت برشی بالا، نفوذناپذیری و تراکم‌پذیری و تحکیم‌پذیری پایین است. به عنوان مثال ملات با ۵-۳ ٪ سدیم بنتونیت برای پایدارسازی دیواره‌ها بکار می‌رود، همچنین برای جمع‌آوری فلزات سنگین از آب‌های زائد و پرکردن فضاهای خالی استفاده می‌شود (پوشش مخازن ذخیره فاضلاب، باتلاق‌های آب‌های صنعتی، جاسازی زباله‌های اتمی در زیرزمین, احداث سدها، کانال، مخازن, ترانشه‌ها و...

محیط زیست : پساب های صنعتی و کشاورزی مهمترین عامل آلوده کننده آب های سطحی و زیرزمینی هستند . به منظور کنترل این پساب ها ، محیط های نگهداری و انتقال را با استفاده از بنتونیت های سدیم دار باید ایزوله نمود .

پلیتی کردن کانهٔ آهن : از دههٔ ۱۹۵۰ به منظور پلیتی کردن، بنتونیت برابر کانهٔ منیتیت و هماتیت ریزدانه اضافه می‌گردد. حدود ۸-۶ کیلوگرم سدیم بنتونیت به ۱ تن کانه آهن خشک اضافه می‌گردد.

ماسه‌های گداز فلز :۴ تا ۶ درصد بنتونیت برای به هم چسباندن دانه‌های ماسه‌سبز قالب‌ریزی و چرخهٔ ریخته‌گری فلزات مورد استفاده قرار می‌گیرد. در فرمول‌بندی قالب‌ریزی پیشرفته خاک زغال، سلولز، غله، نشانه قیر یا دیگر منابع کربن به آن اضافه می‌گردد . این مواد برای جلوگیری از تخریب بعد از برداشت قالب الگو ضروری است.

بکارگیری بنتونیت به عنوان جاذب رطوبت: به علت خاصیت جذب رطوبت در غذای حیوانات، حشره‌کش‌ها، دفع زباله و پایدارسازی خاک بکار می‌رود .

جذب یون‌ها: خاصیت جذب یون‌ها و مولکول‌ها توسط بنتونیت بسیار بالا است. نوع کلسیم‌دار سریعتر آب جذب می‌کند ولی نوع سدیم‌دار ظرفیت بیشتری دارد. نوع کلسیم دار با اسید آلی واکنش داده شده تا ناخالصی‌هایی مانند کلسیت را حل کند. یون های دوظرفیتی مانند کلسیم را با هیدروژن جایگزین کند و فلزاتی مانند آهن II وIII ، آلومینیم و منیزیم را شسته باعث

افزایش سطح مخصوص و تخلخل و تغییر شبکهٔ بلورین شود. از آن برای تصفیه، رنگ‌زدایی، آبگیری و گندزدایی روغن‌های حیوانی و گیاهی و یا خنثی‌سازی بکار می‌رود. بنتونیت ناخالصی‌ها و باکتری‌های لخته‌شده را جذب و با حذف نمک‌های منیزیم و کلسیم سبب نرم‌شدن آب می‌شود.

پرکننده: بعضی از انواع کلسیم بنتونیت سفید رنگ بوده و در پایدارسازی امولسیون‌ها و به عنوان مادهٔ ژله‌ساز، چسبنده و نرم‌کننده استفاده می‌شود.

بنتونیت بهبود دهنده: سدیم بنتونیت برای تغییر خواص ترکیبات آلی مایع مانند ویسکوزیته، سوسپانسیون و ... به آنها افزوده می‌شود. کاغذ چاپ بدون کربن، گل حفاری، گریس، رنگ، جوهر چاپ، تصفیه نفت، روغن، حلال و کاتالیزورهای Si/Al را می‌توان از مخلوط کردن رس‌هایی مانند بنتونیت با اسید و کلسیم‌دار کردن آن بدست آورد که از آن برای حذف عناصر قلیایی، قلیایی خاکی، آهن، آلومینیم و منیزیم استفاده می‌شود. (۲)

۲-موادوروش ها:

این مطالعه بر روی ۴۰۰ عدد جوجه خروس انجام میشود که به طور تصادفی در ۲۰ پن آزمایشی توزیع میشوند. جوجه ها به صورت ازاد به دان وآب ونور دائمی ۲۴ ساعته دسترسی دارند. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با ۴ تکرار به ازای هرتیمار انجام میگیرد. جوجه ها تا پایان یک هفتگی با جیره ی غذایی یکسان تغذیه میشوند و پس از آن در پن ها توزیع میشوند.

عامل نوع جیره در ۴ سطح مورد استفاده قرار میگیرد . جیره پایه بر اساس احتیاجات غذایی طیور اماده میگردد.

در آزمایش مقدار بنتونیت اضافه شده به صورت ۰(شاهد)و۵ /۰و۱و۱/۵. در جیره های مختلف خواهد بود و در یک تیمار بنتونیت صنعتی استفاده میشود.

توزین جوجه ها در ابتدا ی آزمایش و پایان دوره آغازین و رشد وتوزین خوراک مصرفی به صورت هفتگی انجام میگیرد .

متوسط افزایش وزن ومصرف خوراک روزانه و ضریب تبدیل غذایی دوره اغازین ، رشد وکل دوره محاسبه وآمارگیری میشود وتلفات واحدهای آزمایش به صورت روزانه ثبت میگردد. در دو نوبت از هرو احد ۲ جوجه خروس از روده نمونه برداری کردیم ودر محیط کشت دادیم . و از بستر نیز در دو نوبت از هر واحد دو بار نمونه گیری کردیم وبه طریق زیر کشت دادیم:

۱-۲-ابتدا از نمونه بستر جوجه های گوشتی نمونه گیری به عمل اوردیم . برای نمونه گیری از بستر پس از تهیه ظروف پلاستیکی استریل وتمیز شماره قفس مورد نظر را با ماژیک روی آن یادداشت کردیم و بعد از ورد به قفس ها با آبسلاین از گوشه های بستر و مناطقی که اطراف آبخوری و دانخوری نبود و خیس نبودند نمونه را برداشتیم و داخل ظرف قرار دادیم ودرب ان را محکم بستیم.

۲-۲-برای نمونه گیری از روده ی جوجه های گوشتی ، بعداز کشتار جوجه ها ی گوشتی تمامی فضولات موجود در قسمت ایلئوم از فاصله ۱۰ سانتیمتری پس از زائده مکل تا انتهای رده کوچک جمع آوری کرده و پس از مخلوط کردن کامل در ظروف پلاستیکی کوچک درب دار (قوطی فیلم) ریخته شد وتا زمان شروع ازمایشات میکروبی در هوای آزاد نسبتا سرد نگهداری کردیم. حداکثر ۲ ساعت پس از شروع نمونه برداری فضولات ونمونه ها را به آزمایشگاه منتقل کردیم.

۳-۲-بعد از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه ابتدا یک گرم از هر کدام از نمونه هایمان را که شامل بستر و روده کوچک است را وزن میکنیم . قبل از ان برای هر کدام از نمونه های روده وبستردر ۱۰ عدد لوله استریل به اندازه ۹ سی سی سرم فیزیولوژی ریختیم . بعد از اندازه گیری، یک گرم از نمونه های (روده و بستر) را جدا در ۹ سی سی سرم فیزیولوژی ریختیم و بعد با شیکر مخلوط کردیم تا محلول هموژن شود بعد برای انجام این آزمایش رقت سازی انجام دادیم.

به این روش کشت کلونی ها روش پور پلیت میگویند.

(باید دقت داشت که دمای محیط های کشت مان از ۴۵ درجه بیشتر نباشد زیرا در غیر این صورت بر اثر حرارت محیط ،باکتری ها آسیب دیده وکلونی تشکیل نمیدهند.)

برای مخلوط شدن محیط های کشت با نمونه بستر و نمونه روده جوجه های گوشتی ، پلیت ها را ۵ بار به صورت ۸ انگلیسی حرکت دادیم . این کار اهمیت خاصی دارد زیرا اگر به خوبی انجام نشود پراکندگی کلونی ها پس از رشد در پلیت ، نا منظم خواهد بود . سپس پلیت ها را بی حرکت گذاشتیم تا محیط ها بسته شوند بعد پلیتها را روی هم میگذاشتیم وچسب میزدیم و در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۴۸ ساعت قرار دادیم و بعد رشد کلونی ها انهارا با دستگاه کلونی کانتر شمارش کردیم .

(برای اطمینان از استریل بودن محیط کشت و پلیت ها از محیط کشت شاهد استفاده کردیم . در ضمن برای هر رقت دو پلیت آماده کردیم).(12)

شمارش کلونی ها:

دو روش برای شمارش کلونی استفاده کردیم :

روش دستی که پلیت را به صورت وارونه بر روی یک صفحه سفید قرار دادیم و بین پلیت وصفحه یک شیشه شطرنجی قرار دادیم و با علامت گذاری خانه ها تعداد را بدست اوردیم .یعنی اگر در تمام رقت ها بیش از مثلا ۲۰۰ کلونی در هر پلیت دیده میشد ، سطح هر پلیت را به شعاع های منظمی تقسیم میکردیم و کلونی ها را در یک قسمت شمارش کرده و سپس تعداد کل را در ضریب مناسب ضرب کردیم . میانگین شمارش را در دو پلیت محاسبه و در ضریب رقت ضرب و نتیجه را به عنوان تخمین شمارش کلونی گزارش کردیم.

روش شمارش با دستگاه کلونی کانتر۸

وبعدخالص سازی کلونی باکتری های موجود در بستر وروده ی جوجه های گوشتی را انجام دادیم و بعد برای جداسازی وشناسایی انتروباکتریاسه آ از نمونه های بستر وروده ی جوجه های گوشتی از محیط های , TSI,SIM,MRVP Cimmuon sitrate واوره آگار و کاتالاز و اکسیداز و احیای نیترات استفاده کردیم.

۴-۲- مقاومت داروئی (Drug Resistance):

برای تعیین حساسیت چندین جدایه از انتروباکتریاسه آ نسبت به داروهای آنتی باکتریال روش دیسک دیفوزیون (disk diffusion) براساس روش استاندارد Kirby-Bauerو بر روی محیط آگار دار مولر هینتون مورد استفاده قرار گرفت(18).۱۳ عامل آنتی باکتریال مورد آزمایش و غلظت بالقوه آنها (بر حسب میکروگرم) عبارت بودند از : سیپروفلوکساسین، نئومایسین ، آمپی سیلین، نور فلوکساسین، اریترومایسین، جنتامایسین، ریفامپیسین، پنی سیلین، استرپتومایسین، کلرامفنیکل، تتراسایکلین، سفیکسیم، کانامایسین. این دیسک ها از شرکت پادتن طب (ایران) تهیه شدند.آزمایش برای هر کدام یک از جدایه به شرح ذیل انجام شد. ابتدا کلونی برداشت شده از محیط ذخیره TSIبرروی محیط نوترینت آگار کشت خطی داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید. سپس ۴تا ۵ کلنی تک انترباکتریاسه آ از این محیط برداشت شده و به لوله آزمایش استریل درب دار حاوی ۴تا ۵ میلی لیتر محیط TSBانتقال داده شد. محیط تلقیح شده معمولا به مدت ۲تا۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تا مشاهده یک کدورت واضح و قابل قبول و منطبق با کدورت استاندارد۰/۵مک فارلند انکوبه گردید. سپس یک سواپ استریل را به درون این سوسپانسیون باکتریایی نموده مایع اضافی سواپ را با فشار و چرخاندن به جداره داخلی لوله حاوی سوسپانسیون باکتریایی گرفته و بعد سواپ به صورت خطی وبدون فاصله بین خطوط کشت بر روی سطح محیط مولر هینتون که ۲۰ دقیقه قبل از استفاده از یخچال خارج گردیده بود ، کشت داده شد.به منظور تلقیح یکنواخت کشت خطی سه مرتبه انجام شد بدین نحو که هر مرتبه پلیت حاوی محیط کشت به میزان ۶۰ درجه نسبت به دفعه قبل چرخانیده شدو مجددا سواپ بر روی آن به صورت خطی کشیده شد. در نهایت سر سواپ را به لبه داخلی پلیت و در تماس با سطح محیط کشت چسبانده و یک دور کامل چرخانده شد. پلیت های تلقیح شده به مدت ۳ تا ۵ دقیقه به همان حال باقی ماندند تا رطوبت اضافی قبل از گذاشتن دیسک های آنتی بیوگرام توسط آگار جذب شود . بعد دیسک های مورد آزمایش را که یک ساعت قبل به منظور رسیدن به درجه حرارت ازمایشگاه از یخچال خارج شده بودند توسط پنس استریل برروی سطح محیط مولر هینتون تلقیح شده قرار داده شدند. به منظور رعایت فاصله بین دیسک ها بر ری محیط کشت به میزان ۲۴ میلی متر از همدیگر و ۱۵ میلیمتر از جدار پلیت فقط ۶ دیسک برروی یک پلیت ۹۰ میلیمتری گذاشته شد .ظرف مدت ۱۵ دقیقه پس از دیسک گذاری پلیتها جمع اری شده و در وضعیت وارونه وبه مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت در ۳۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند . بعد از این مدت برای قرائت نتیجه آزمایش از چشم غیر مسلح ودر حضور نور متمرکز ، قطر هاله ممانعت شونده از رشد

هر آنتی باکتریال بر حسب میلیمتر توسط خط کش اندازه گیری شد و با مقایسه با جدول تفسیر قطر هاله ممانعت شونده براساس حساس و مقاوم و حدواسط بودن طبقه بندی شدند.

جدول۱- مشخصات دیسکهای آنتی بیوتیک:

Antibiotic	Disk Code	Disk content(mcg/disk)	companies
Ampicillin	AM	۱۰	PT
Penicillin	P	۱۰	PT
Tetracyclin	TE	۳۰	PT
Gentamycin	GM	۱۰	PT
Neomycin	N	۳۰	PT
Ciprofloxacin	CP	۵	PT
Erytromycin	E	۱۵	PT
Chloramphenicol	C	۳۰	PT
Norfloxacin	NOR	۱۰	PT
Rifampicin	RA	۵	PT
Sterptomycin	S	۱۰	PT
Cefixime	CFM	۵	PT
Kanamycin	K	۳۰	PT

نتایج:

نتیجه گیری کلی حاصل از جدول ذیل این است که استفاده از تیمار۳ یعنی بنتونیت صفاری5/. ٪ در جیره ی غذایی جوجه های گوشتی در مقایسه با سایر تیمارها مثل بنتونیت صفاری ۱٪ و بنتونیت صفاری ۱/۵ ٪ و بنتونیت موسسه ۱٪ ،اثرات کاهشی بیشتری را در مقدار میانگین نسبت به نمونه شاهد داشته است.در کل تیمار ۳ روی همه ی فاکتورهای موجود دراین جدول اثر کاهشی داشته است ولی اثرات کاهشی بیشتر وموثرتری را در مورد میانگین تعداد باکتری های گرم منفی روده ای و باکتری های گرم منفی موجود در بستر در محیط EMB و مقدار PHروده ای ، نسبت به نمونه شاهد نشان داده است.

جدول ۲- مقایسه میانگین وانحراف معیار تیمارهای مختلف:

timar		gram	total	emb	ba	humidity	ph
1.00	Mean	22600000	1.21E+12	3.88E+08	1.58E+13	50.9597	5.5988
	Std. Deviation	26489746	2.13E+12	7.74E+08	1.64E+13	9.84400	.78436
	Std. Error of Mean	13244873	1.06E+12	3.87E+08	8.22E+12	4.92200	.39218
2.00	Mean	1300000.0	1.54E+13	.0000	8.47E+12	48.2667	5.1862
	Std. Deviation	1886796.2	1.68E+13	.00000	1.44E+13	2.14163	.80627
	Std. Error of Mean	943398.11	8.41E+12	.00000	7.20E+12	1.07082	.40314
3.00	Mean	200000.00	8.95E+11	75000.000	8.50E+12	49.4588	4.7695
	Std. Deviation	244948.97	7.49E+11	150000.00	1.45E+13	3.82256	1.53556
	Std. Error of Mean	122474.49	3.74E+11	75000.000	7.23E+12	1.91128	.76778
4.00	Mean	3350000.0	1.94E+11	275000.00	8.10E+12	45.1061	4.9738
	Std. Deviation	4668690.0	2.72E+11	550000.00	1.46E+13	11.65133	.38025
	Std. Error of Mean	2334345.0	1.36E+11	275000.00	7.32E+12	5.82566	.19012
5.00	Mean	1025000.0	2.76E+10	71350000	1.50E+13	86.6544	4.9975
	Std. Deviation	981070.84	2.04E+10	1.39E+08	1.73E+13	57.90849	.38913
	Std. Error of Mean	490535.42	1.02E+10	69561645	8.64E+12	28.95424	.19457
Total	Mean	5695000.0	3.55E+12	92015000	1.12E+13	56.0891	5.1052
	Std. Deviation	13831028	9.10E+12	3.49E+08	1.42E+13	28.61822	.83744
	Std. Error of Mean	3092711.9	2.04E+12	77994615	3.18E+12	6.39923	.18726

نتایج حاصل از آنتی بیوگرام:

نتایج حاصل از حساسیت اشرشیا کلی به آنتی بیوتیک های نام برده نشان داد که ۲۵٪سویه ها به آنتی بیوتیک استرپتومایسین مقاومت نشان دادندو ۶۸٪ حساسیت دارند.و ۷٪ آنها حد واسط هستند. و۶۸ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت نشان دادندو ۱۸٪ حساسیت دارند.و ۱۴٪ آنها حد واسط هستند. و۲۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک نئومایسین مقاومت نشان دادندو ۷٪ حساسیت دارند.و ۶۸٪ آنها حد واسط هستند

و۸۶ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاومت نشان دادندو ۳٪ حساسیت دارند.و ۱۱٪ آنها حد واسط هستند و۸۹ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک ریفامپیسین مقاومت نشان دادندو ۴٪ حساسیت دارند.و ۷٪ آنها حد واسط هستند و۶۸ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک اریترومایسین مقاومت نشان دادندو ۲۵٪ حساسیت دارند.و ۷٪ آنها حد واسط هستند و۱۱٪سویه ها به آنتی بیوتیک نورفلوکساسین مقاومت نشان دادندو ۸۲٪ حساسیت دارند.و ۷٪ آنها حد واسط هستند و۷ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سفیکسیم مقاومت نشان دادندو ۸۹٪ حساسیت دارند.و ۴٪ آنها حد واسط هستند و۴ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک جنتامایسین مقاومت نشان دادندو ۶۸٪ حساسیت دارند.و ۲۸٪ آنها حد واسط هستند و۲۱ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کانامایسین مقاومت نشان

دادندو ۶۱٪ حساسیت دارند.و ۱۸٪ آنها حد واسط هستند و۳۹ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مقاومت نشان دادندو ۶۱٪ حساسیت دارند. و۱۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادندو ۸۷٪ حساسیت دارند.و ۷٪ آنها حد واسط هستند و۱۶ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاومت نشان دادندو ۶۸٪ حساسیت دارند.و ۱۶٪ آنها حد واسط هستند.

نتایج حاصل از حساسیت سودوموناس به آنتی بیوتیک های نام برده نشان داد که ۱۰۰٪سویه ها به آنتی بیوتیک استرپتومایسین مقاومت نشان دادند. و۶۲ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت نشان دادندو ۳۸٪ آنها حد واسط هستند. و۲۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک نئومایسین مقاومت نشان دادندو ۱۳٪ حساسیت دارند.و ۶۲٪ آنها حد واسط هستند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاومت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک ریفامپیسین مقاومت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک اریترومایسین مقاومت نشان دادند و ۱۰۰٪ سویه ها به آنتی بیوتیک نورفلوکساسین حساسیت دارند.و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سفیکسیم مقاومت نشان دادندو۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک جنتامایسین حساسیت نشان دادند و۸۷ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کانامایسین مقاومت نشان دادندو ۱۳٪ آنها حد واسط هستند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مقاومت نشان دادندو۸۷ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین حساسیت نشان دادندو ۱۳٪ آنها حد واسط هستند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاومت نشان دادند.

نتایج حاصل از حساسیت سیتروباکتر به آنتی بیوتیک های نام برده نشان داد که ۱۰۰٪سویه ها به آنتی بیوتیک استرپتومایسین حساسیت نشان دادند. و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک تتراسایکلین حساسیت نشان دادندو ۱۰۰٪ سویه ها به آنتی بیوتیک نئومایسین حد واسط هستند

و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاومت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک ریفامپیسین مقاومت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک اریترومایسین مقاومت نشان دادند و ۱۰۰٪ سویه ها به آنتی بیوتیک نورفلوکساسین حساسیت دارند.و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سفیکسیم حساسیت نشان دادندو۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک جنتامایسین حساسیت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کانامایسین حساسیت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل حساسیت نشان دادندو۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین حساسیت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاومت نشان دادند.

نتایج حاصل از حساسیت کلبسیلا به آنتی بیوتیک های نام برده نشان داد که ۶۲٪سویه ها به آنتی بیوتیک استرپتومایسین مقاومت نشان دادند.و۳۸٪آنها حدواسط اند و۲۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک تتراسایکلین مقاومت نشان دادندو ۷۵٪ سویه ها حدواسط اندو۲۵٪سویه ها به آنتی بیوتیک نئومایسین مقاوم هستندو۷۵٪ حدواسط اند.

و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک پنی سیلین مقاومت نشان دادند و۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک ریفامپیسین مقاومت نشان دادند و۷۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک اریترومایسین مقاومت نشان دادندو۲۵٪ حدواسط اند و ۳۷٪ سویه ها به آنتی بیوتیک نورفلوکساسین مقاومت دارند.و ۵۰٪ حساسیت دارند و ۱۳٪ حدواسط اندو۱۰۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سفیکسیم حساسیت نشان دادندو۲۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک جنتامایسین مقاومت نشان دادند و۷۵٪ حساسیت دارند.۲۵ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کانامایسین مقاومت نشان دادند و ۷۵٪ حدواسط اند.و۵۰ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک کلرامفنیکل مقاومت نشان دادندو۳۷٪ حساسیت دارند و ۱۳٪ حدواسط اند.۳۸ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین مقاومت نشان دادند و ۵۰٪ حساسیت داشتندو۱۲٪ حدواسط اند و۳۸ ٪سویه ها به آنتی بیوتیک آمپی سیلین مقاومت نشان دادند.و۶۲٪ حدواسط .

جدول ۳-نتایج حاصل از تست حساسیت اشرشیا کلی به آنتی بیوتیک ها:

آنتی بیوتیک	درصد مقاومت	درصد حدواسط	درصد حساسیت
S10	٪۲۵	٪۷	٪۶۸
TE30	٪۶۸	٪۱۴	٪۱۸
N30	٪۲۵	٪۶۸	٪۷
P10	٪۸۶	٪۱۱	٪۳
RA5	٪۸۹	٪۷	٪۴
E15	٪۶۸	٪۷	٪۲۵
NOR10	٪۱۱	٪۷	٪۸۲
CFM 5	٪۷	٪۴	٪۸۹
GM10	٪۴	٪۲۸	٪۶۸
K30	٪۲۱	٪۱۸	٪۶۱
C30	٪۳۹	۰	٪۶۱
CP5	٪۱۵	٪۷	٪۷۸
AM10	٪۱۶	٪۱۶	٪۶۸