



## بررسی عوامل عفونی شایع در بیماری اسپوندیلایتیس در جوجه‌های گوشتی در استان چهارمحال و بختیاری

عزت‌الله فتحی<sup>۱\*</sup>، مجید غلامی آهنگران<sup>۲</sup>، حبیب‌الله امیراحمدی<sup>۳</sup>

۱. استادیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۲. دانشیار، گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

۳. دکترای حرفه‌ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد- ایران.

پذیرش: ۱۲ اردیبهشت ماه ۹۵

دریافت: ۱۷ مرداد ماه ۹۴

### چکیده

اسپوندیلایتیس (kinky back) با ابتلای مهره‌های ستون فقرات به کیفیت مشخص می‌شود و معمولاً دارای دلایل عفونی و میکروبی است. تاکنون گزارشی در مورد شیوع اسپوندیلایتیس در ایران وجود ندارد. در مطالعه حاضر، ۱۳ گله گوشتی با سن ۳۰-۴۵ روزگی، با مشکلات اندام حرکتی انتخاب شدند و مجموعاً از ۸۵ جوجه گوشتی با علایم لنگش نمونه‌گیری شد. پس از آسان‌کشی و کالبدگشایی از مهره‌های دچار ناهنجاری رادیوگراف تهیه شد. پس از انجام رادیولوژی، از ۴۳ نمونه که دارای علایم رادیوگرافی از جمله تغییر شکل مهره‌ها و پاسخ استخوانی در نواحی ستون فقرات بودند از محل ضایعه کشت باکتریایی و قارچی تهیه شد. نتایج نشان داد از مجموع ۸۵ نمونه دارای علایم بالینی، ۴۳ نمونه دارای علایم رادیوگرافی بودند. در آزمایش کشت میکروبی، ۳۸ نمونه دارای آلودگی میکروبی (باکتری/شریشیاکلی و باکتری/استافیلوکوکوس/اورئوس)، ۲ نمونه آلوده به قارچ بودند و ۳ نمونه هیچ‌گونه آلودگی میکروبی و قارچی نداشتند. نتایج نشان می‌دهد اسپوندیلیت فراوانی بالایی دارد و عوامل میکروبی در ایجاد این بیماری نقش عمده دارند. لذا کنترل بیماری‌های عفونی می‌تواند در کاهش این عارضه پاتولوژیک نقش به‌سزایی داشته باشد.

**واژه‌های کلیدی:** اسپوندیلایتیس، جوجه گوشتی، رادیوگرافی، کشت میکروبی.

### مقدمه

مرغ‌های تخم‌گذار شیوع کمتری دارد و معمولاً ناشی از عدم تعادل مواد معدنی است (۲). علی‌رغم اهمیتی که اختلالات حرکتی دارند معلومات نسبتاً کمی در مورد آن‌ها وجود دارد. مشکل مهمی که در مورد این بیماری‌ها وجود دارد ناشی از آن است که اصولاً نام‌هایی که برای این بیماری‌ها به کار رفته است به نشانه‌های بالینی، سبب‌شناسی و یا روند بیماری‌زایی آن‌ها اشاره می‌کند در حالی که این اسامی بیان‌گر وضعیت بیماری نیستند و در اصل در همه‌ی موارد بیماری‌زایی و علت واقعی بیماری را

اختلالات حرکتی از عوامل اصلی خسارات اقتصادی در پرورش طیور است. معمولاً دستگاه اسکلتی مبتلا می‌شود ولی گاهی ناهنجاری‌هایی در دستگاه‌های عصبی یا معمولاً عضلانی رخ می‌دهد و به اختلال حرکتی منجر می‌گردد. پرندگان گوشتی و بوقلمون بیشتر مبتلا می‌شوند. هم‌زمان با مسن‌تر شدن و سنگین‌تر شدن پرندگان اختلالات ناحیه پا به صورت بالینی ظاهر می‌شوند. ولی احتمالاً آغاز چنین فرایندی مربوط به قبل می‌باشد. این اختلالات در



در گزارش تحسین Aziz و همکاران در سال ۲۰۰۷، مشخص شد که بیماری عمدتاً در سن ۳۰-۴۰ روزه دیده می‌شود و یکی از عوامل وازدگی جوجه‌ها در سالن می‌باشد. در برش طولی از ستون فقرات یک حفره در بدنه مهره‌های سینه‌ای مشاهده شد که پر از مواد التهابی و بقایای نکروزه بود و این تغییر حالت موجب فشار بر روی نخاع شده که در نهایت سبب فلجی در پرنده می‌گردد. (۲).

Martin و همکاران در سال ۲۰۱۰، عفونت استئوآرتریت مهره‌ای اینتروکوکال یکی از بیماری‌های غیرمنتظره در جوجه‌های نر گوشتی و پولت‌های پرورشی است. در این گزارش بروز بیماری در گله‌های مختلف گوشتی و پولت‌های پرورشی در کارولینای شمالی بوده در این مطالعه نقش فاکتورهای مختلفی از جمله تولید آسسه‌های نخاعی به روش آزمایشگاهی، جداسازی مجدد باکتری *Enterococcus cecorum* از پرندگان آلوده، تلقیح باکتری *Enterococcus cecorum* از روش‌های خوراکی و تنفسی و تعیین نقش استرس در میزان بروز عفونت و ضایعات آن مشخص شد. طرح این مطالعه مشخص کرد که استئوآرتریت مهره‌ای اینتروکوکال می‌تواند جانشینی برای عفونت با باکتری *Enterococcus cecorum* باشد، همچنین استرس‌های محیطی به خصوص استرس‌های مؤثر بر روی دستگاه گوارش شرایط را برای بروز بیماری مستعد می‌کند. (۶).

بر اساس مطالعه Martin و همکاران در سال ۲۰۱۱، اسپوندیلایتیس اینتروکوکال (ES)، قبلاً استئوآرتریت مهره‌ای اینتروکوکال نامیده می‌شد. در این گزارش بیماری در گله‌های مختلف مرگ و میر و شیوع متفاوت دارد. باکتری‌های مختلفی از جمله سویه‌های *اشریشیا کلی*، *اینتروکوکوس* و *استافیلوکوکوس* از ضایعات نخاعی جدا گردیده‌اند. بر اساس این گزارش شیوع آسسه‌های نخاعی از سال ۲۰۰۷ به بعد زیادتر شده است (۷). لذا با توجه به

مشخص نمی‌کنند (۲). اسپوندیلایتیس (kinky back) یا خمیدگی پشت با ابتلای مهره‌های ستون فقرات به کیفوز (قوزکردگی) مشخص می‌شود. این تغییر حالت معمولاً سبب جابجایی در سطح شکمی مهره‌های آزاد در ناحیه سینه‌ای پرنده می‌باشد (۸) و به علت چرخش انتهایی قدامی مهره به طرف پایین، نارسایی سطح مفصلی در ثابت نگهداشتن مفصل و تغییرات مشابهی در مهره‌های مجاور ایجاد می‌شود. در موارد شدید انحنای حاد درون مجرای مهره نخاع را تحت فشار قرار داده و موجب فلجی می‌شود (۹ و ۱۰).

این بیماری دارای علایمی نظیر کوتاه شدن ظاهری، خمیدگی پشت، فلجی، خوابیدن روی شکم و قرارگیری پاها به سمت عقب و جانب است. گاهی وقت‌ها پرنده برای نگهداری خود از بال‌ها استفاده می‌کند. با توجه به فشاری که به نخاع پرنده وارد می‌شود قدرت حرکتی خود را از دست داده و نمی‌تواند تغذیه خوبی داشته باشد. این بیماری معمولاً در سنین مختلف و در جوجه‌های نر گوشتی و پولت‌های پرورشی دیده می‌شود و میزان شیوع آن بین ۲ تا ۴ درصد گزارش شده است (۹ و ۱۱). به نظر می‌رسد فاکتورهای مانند سن، رشد سریع بدن و ژنتیک در بروز آن نقش داشته باشد (۸). از طرف دیگر باتوجه به شیوع این بیماری در مرغداری‌های گوشتی و تلفاتی که وارد می‌کند توجه به این بیماری مهم است. از عوامل اصلی بروز این بیماری عفونت‌های باکتریایی و قارچی است (۲).

یکی از عوامل ایجاد کننده این بیماری باکتری اینتروکوکوس سکوروم (*Enterococcus cecorum*) است. این باکتری فلور طبیعی روده است. کالبدگشایی پرندگان مبتلا وجود یک توده سخت التهابی در سطح آزاد مهره سینه‌ای را نشان می‌دهد. این توده التهابی حاوی مواد چرکی نکروتیک مایل به زرد است. در آزمایشات میکروسکوپی عموماً باکتری گرم مثبت اینتروکوکوس کسوروم جدا شده است (۹ و ۱۰).



نمونه‌ها تعداد ۴۳ نمونه که دارای علائم رادیوگرافی از جمله تغییر شکل مهره‌ها و پاسخ استخوانی در نواحی ستون فقرات بودند جهت انجام عملیات کشت انتخاب شدند. سپس با استفاده از قیچی استخوان بر بخش‌هایی از ستون فقرات که دارای ضایعه بودند به صورت طولی و عرضی بریده شد تا از ضایعات درون این قسمت‌ها نمونه‌برداری انجام شود. در مرحله بعد با استفاده از آنس، سوپ و سرنگ استریل اقدام به نمونه‌گیری از محل ضایعه در ستون فقرات شد و نمونه‌ها به محیط‌های کشت میکروبی عمومی و اختصاصی ساخت شرکت هایمیدیا (Himedia) هند (جدول ۱) انتقال یافت. برای تشخیص عوامل قارچی از محیط ساپرو دکستروز آگار استفاده گردید. تمام نمونه‌ها در مرحله اول در محیط‌های عمومی غنی شده و محیط کشت قارچی کشت داده شده و سپس به محیط‌های اختصاصی جهت تشخیص قطعی انتقال می‌یافت.

عوارض بیماری و مشاهده افزایش بروز بیماری در گله‌های گوشتی نیاز به بررسی عوامل ایجاد کننده می‌تواند در کنترل و پیشگیری از بیماری مؤثر باشد.

### مواد و روش کار

در این مطالعه از ۱۳ گله گوشتی ۳۰ تا ۴۵ روزه، پس از اخذ تاریخچه کامل از مرغداری شامل مدیریت تهویه، بستر، تراکم، میزان تلفات، بیماری‌های درگیر و شناسایی جوجه‌های گوشتی مبتلا به فلجی یا درگیری اندام‌های حرکتی و داشتن علائم بالینی بیماری حرکتی اقدام به اخذ نمونه شد. در این بررسی جمع ۸۵ جوجه دارای علائم بالینی انتخاب گردید که جهت کشتن و کالبدگشایی به بیمارستان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد انتقال یافت. پس از مرگ آسان جوجه‌ها، لاشه‌ها کالبدگشایی گردید و ناحیه ستون فقرات پرندۀ جهت رادیولوژی آماده گردید. پس از رادیولوژی از

جدول ۱- برخی از محیط‌های مورد استفاده

کاربرد	مواد
جداسازی و شناسایی استافیلوکوک‌ها	محیط مانیتول سالت آگار
جداسازی و شناسایی باکتری اشریشیاکلی	محیط ائوزین متیلن بلو
تعیین هویت باکتری‌های گرم منفی	محیط مک کانکی
محیط عمومی جهت تکثیر و جداسازی باکتری‌ها و همولیزین	محیط بلاد آگار
برای رشد باکتری‌هایی که مشکل پسند	محیط نوترینت آگار
تعیین هویت باکتری‌های گرم منفی	محیط TSI
جدا نمودن انواع گونه‌های قارچ	محیط ساپرو دکستروز آگار
جداسازی و شناسایی استافیلوکوک‌ها	محیط برد پارکر

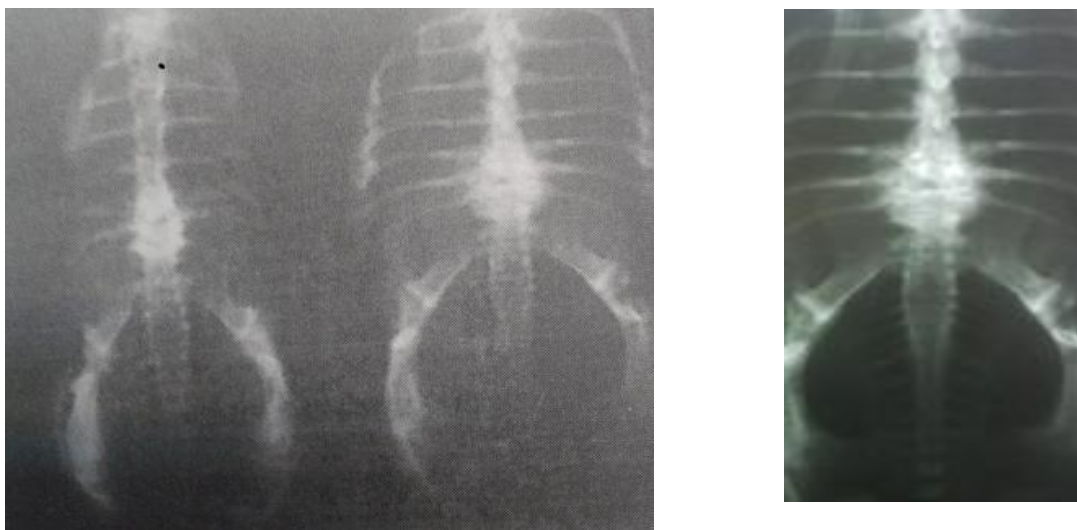


شکل ۱- نمونه‌ای از جوجه‌های مبتلا به فلجی اندام حرکتی





شکل ۲- عکس گرفته پس از کالبدگشایی لاشه‌های دچار ضایعه



شکل ۳- شکل رادیوگرافی ستون فقرات از جوجه‌های مبتلا



شکل ۴- استئوآرتریت مهره‌ای و فشرده شدن طناب نخاعی





## نتایج

آلودگی میکروبی بودند و ۳ نمونه هیچ‌گونه آلودگی میکروبی نداشتند. درصد آلودگی به باکتری‌های جدا شده در جدول ۲ و ۳ آمده است. باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین فراوانی را داشت.

از مجموع ۸۵ نمونه دارای علائم بالینی (شکل ۱)، ۴۳ نمونه که دارای علائم رادیوگرافی بودند (شکل ۳) برای آزمایش کشت میکروبی انتخاب گردید که ۴۰ نمونه دارای

جدول ۲- فراوانی میکروب‌های جدا شده در نمونه‌های مورد مطالعه

میکروب جدا شده	تعداد موارد مثبت	تعداد موارد منفی	درصد
باکتری <i>اشریشیاکلی</i>	۱۲	۲۸	۳۰
باکتری <i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	۳۲	۸	۸۳/۳
<i>آسپرژیلوس فومیگاتوس</i>	۲	۳۸	۵

جدول ۳- فراوانی عوامل آلوده کننده *spondylitis* - در جوجه‌های گوشتی مورد مطالعه

نوع فراوانی	تعداد	درصد
Staphilococci به تنهایی	۲۶	۶۵
E-coli به تنهایی	۶	۱۵
E-coli + Staph	۶	۱۵
Aspergilla's	۲	۵
Bacterial+ Aspergilla's	۰	۰
تعداد کل نمونه‌ها	۴۰	۱۰۰

## بحث

هوایی به مهره‌ها دانستند (۳).

تحسین عزیز و همکاران در سال ۲۰۰۷، طی تحقیقی که در کارولینای شمالی انجام دادند باکتری *Enterococcus secorum* را به عنوان عامل آلوده کننده در بیماری اسپوندیلایتیس در جوجه‌های گوشتی معرفی کردند (۲).

کانر و همکاران در سال ۲۰۱۰، در مطالعه خود از عوامل باکتریایی که سبب بیماری استئومیلیت در جوجه‌های گوشتی می‌شود باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش کردند (۵).

لینداون وین و همکاران در سال ۱۹۹۹، در کالبدگشایی دو پرنده ۱۷ و ۱۹ روزه که دچار بیماری اسپوندیلایتیس با علائم فلجی بال، پا، عدم تحرک و افتادن به پهلو بودند، پس از بررسی میکروسکوپی از محل

بیماری اسپوندیلایتیس با ایجاد لنگش، فلجی و مرگ میر در پرنده موجب حذف شدن آن از چرخه تولید شده و سبب وارد آمدن ضرر اقتصادی به مرغ‌داران می‌شود. به طور کلی بیماری‌هایی که از طریق درگیر کردن اندام حرکتی پرنده موجب حذف این پرندگان می‌شوند عمدتاً دارای دلایل عفونی و میکروبی هستند (۷).

Bergman و همکاران در سال ۱۹۸۰، پس از بررسی جوجه‌هایی که دارای علائمی نظیر فلجی نسبی و چمباتمه زدن بودند و مقاطع بافتی تهیه شده نشان دهنده فشار به نخاع به دلیل تغییر شکل مهره‌های ستون فقرات بودند (*spondylitis*). پس از نمونه برداری از ضایعات ناحیه قارچ *آسپرژیلوس فومیگاتوس* را عامل آن معرفی کردند و منشأ آن را تنفسی و انتقال عفونت از کیسه‌های





در بررسی حاضر، هیچ‌گونه باکتری *Entrococcus* و *Streptococcus* جدا نگردید. در حالی که در بررسی عزیز، مارتین و روبن، انتروکوک‌ها را به عنوان عامل اصلی آلودگی میکروبی معرفی کردند. ولی نتایج حاصله از مطالعه فوق تا حد زیادی با نتایج بری تروب، لینداون، کانر، شباهت و هم‌خوانی دارد. نتایج مطالعات نشان می‌دهد بیماری از فراوانی بالایی دارد و عوامل میکروبی ایجاد کننده بیماری در نقاط مختلف می‌تواند متفاوت باشد. همچنین مطالعات نشان می‌دهد که این بیماری در اکثر نقاط جهان می‌تواند یکی از علل تلفات و ضررهای اقتصادی در صنعت مرغداری باشد. لذا در صورتی که عوامل عفونی در دوره پرورش کنترل نشوند آن‌ها از روش‌های مختلف می‌توانند به ستون فقرات انتقال یافته و موجب اسپوندیلایتیس گردند. نتیجه کلی از این مطالعه نشان می‌دهد که در استان چهار محال و بختیاری بیماری اسپوندیلایتیس از عواملی است که سبب درگیری اندام‌های حرکتی می‌شود و در نهایت منجر به خسارت اختصاصی می‌شود.

#### منابع

- 1- Aitchison, H; Poolman, P; Coetzer, M; Griffiths, C; Jacobs, J; Meyer, M. and Bisschop, S; Enterococcal-related vertebral osteoarthritis in South African broiler breeders, Journal of the South African Veterinary Association; 2014; 85(1): 5.
- 2- Aziz, T. and Barnes, J; Is spondylitis an emerging disease in broilers breeders. World poultry; 2007; 23(12): 44-45.

ضایعه قارچ/اسپرژیلوس فومیگاتوس جدا گردید (۱۳). بری تروب و همکاران در سال ۲۰۰۵، از مؤسسه روسیلین اروپا در تحقیقی در مورد عوامل عفونی درگیرکننده استخوان‌های طیور/استاف/اورئوس را یکی از عوامل اصلی باکتریایی درگیرکننده استخوان در طیور گزارش کردند و همین‌طور به این مسأله اشاره کرد که نکروز سر استخوان ران بیشتر زمانی رخ می‌دهد که باکتری‌ها به عروق دیواره متافیز متصل شده و موجب ترومبوز و نکروز گسترده غضروف می‌شوند (۱۲).

Stalker و همکاران در سال ۲۰۱۰، در بررسی میزان بروز لنگش در جوجه‌های ۴ هفته که در مدت ۳ روز با افزایش ۷ درصدی تلفات به همراه تورم مفصل زانو و مفصل لگنی رانی و استئومیلیت استخوانی و مهره‌های همراه بوده باکتری *Entrococcus secorum* از طریق آزمایش PCR جدا کردند (۱۱).

Aitchison و همکاران در مطالعه‌ای در افریقای جنوبی در جوجه‌های ۴-۹ هفته که علائم فلجی و لنگش داشتند و در کالبدگشایی وجود یک توده در مهره‌های ۵-۷ سینه‌ای با اسپوندیلایتیس و استئومیلیت ناشی از عفونت باکتری *Entrococcus secorum* را مشاهده کردند. در این مطالعه با استفاده از آموکسی سیلین (۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به مدت ۵ روز از طریق آشامیدنی) بهبودی مناسبی در بیماری دیده شد (۱).

در مطالعه Borst و همکاران در سال ۲۰۱۴، ۲۲ نمونه پاتوژنیک از جدایه‌های باکتری *Entrococcus secorum* اخذ شده از اسپوندیلایت/انتروکوکال (ES) از پرندگان آلوده با ۲۲ نمونه غیرپاتوژنیک جدا شده از سکوم جوجه‌های غیرآلوده، پس از تلقیح به به جنین‌های ۱۲ روزه SPF اختلاف آماری قابل توجهی در زنده ماندن جنین‌ها و جوجه‌های تلقیح شده مشاهده گردید که در جنین و جوجه‌های تلقیح شده با جدایه‌های بیماری‌زا یک عفونت غیر قابل کنترل و پایداری مشاهده شد (۴).





- www.poultrysite.com/articles/171
- 8- Payne, J; Differentiating Lameness in Broilers: Is It Really Kinky Back. Poultry Practices Oklahoma Cooperative Extension Service; 2013; 3(2): 1-2.
  - 9- Robbins, K; Borst, L.B; Martin, M.P; Jay, P; Suyemoto, M. and Barnes, H.J; phenotypic Analysis of Enterococcus cecorum Field Isolates Associated with Vertebral Osteoarthritis. Population Health and Pathobiology Department College of Veterinary Medicine North Carolina State University; Raleigh; 2010; 7. www.cvm.ncsu.e
  - 10- Robbins, K.M; Suyemoto, M.M; Lyman, R.L; Martin, M.P; Barnes, H.J. and Borst, L.B; An outbreak and source investigation of enterococcal spondylitis in broilers caused by Enterococcus cecorum. Avian Dis; 2012; 56(4): 768-73.
  - 11- Stalker, M.J; Brash, M.L; Weisz, A; Ouckama, R.M. and Slavic, D; Arthritis and osteomyelitis associated with Enterococcus cecorum infection in broiler and broiler breeder chickens in Ontario. Canada Journal of Veterinary Diagnostic Investigation; 2010; 22: 643-645.
  - 12- Thorp, B; Bone disease in broiler chickens in Europe. European
  - 3- Bergman, G; Hieder, G. and Vogel, K; Mycotic spondylitis in broiler. Monatshefte veterinarmedizin; 1980; 35(9): 349-351
  - 4- Borst, L.B; Suyemoto, M.M; Keelara, S; Dunningan, S.E; Guy, J.S. and Barnes, H.J; Chicken Embryo Lethality Assay for Pathogenic Enterococcus cecorum, Avian Diseases; 2014; 58(2): 244-248.
  - 5- Connor, T.J; McConaghy, D; and Smyth, J.A; Development of a experimental model of bacterial chondronecrosis with osteomyelitis in broiler following exposure to Staphylococcus aureus by aerosol, and inoculation with chicken anaemia and infectious bursal disease viruses. Avian Pathology; 1999; 28(1): 26-35.
  - 6- Martin, L.T; Martin, M.P; Barnes, H.J; Experimental reproduction of enterococcal spondylitis in male broiler breeder chickens. Avian Dis; 2011; 55(2): 273-278.
  - 7- Martin, M.P; Martin, L.T; Barnes, H.J; Pathogenesis of Vertebral Osteoarthritis (Spinal Abscesses) in Male Broiler Breeders Caused by Enterococcus cecorum. Report of the US Poultry & Egg Association; 2010;





veterinary meeting, Technical Bulletin; 2005; <http://www.poultry-health.com>

- 13- Van Veen, L; Dwars, R.M. and Fabri, T.H.F; Mycotic spondylitis in broilers caused by aspergillus fumigatus resulting in partial anterior and posterior paralysis; Avian Pathology; 1999; 28(5): 487-490.







## Study of prevalent microbial involvement in spondylitis in broiler chickens in Chahrmahal-va-Bakhtiyari

Fathi, E.<sup>1\*</sup>; Gholami Ahangaran, M.<sup>2</sup>; Amir Ahmadi, H.<sup>3</sup>

1. Assistant Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord- Iran.
2. Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord- Iran.
3. DVM, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord branch, Islamic Azad University, Shahrekord- Iran.

*Received:* 8 August 2015

*Accepted:* 1 May 2016

### Summary

Spondylitis (Kinky back) was characterized by involvement of vertebral column to kyphosis by cause of microbial and infectious agents. Until now, there is no report related Spondylitis prevalence in Iran. In this study, 13 broiler flocks in Chaharmahal-va-Bakhtiyari province, 30-45 days old, with clinical lameness sign were selected. We sampled 85 broilers with clinical lameness sign in these flocks. After euthanization and necropsy, the radiograph was prepared from abnormal vertebrates. In samples with disformation of vertebrates and osteic response, bacterial and fungal cultures were prepared from lesions of vertebrates. From 85 cases with clinical sign, 43 samples have radiologic symptoms. In microbial culture 38 samples were infected to bacteria (*Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*), 2 samples were infected to fungi, while 3 samples have no infectivity to bacteria and fungi. Results showed that the spondylitis has high prevalence among broilers and the bacterial infections have very important role in this problem. Therefore, controlling of bacterial infection can decrease prevalent of this pathologic lesion.

**Keywords:** Spondylitis, Broiler chicken, Radiography, Microbial culture.

\* Corresponding Author E-mail: [ezzatfathi@yahoo.com](mailto:ezzatfathi@yahoo.com)

