تعیین جمعیت نسبی باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به باکتری های دیگر در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه های گوشتی در سنین مختلف با استفاده از روش غلظت سنجی مبتنی بر 16S rDNA

علیرضا صیداوی[1*]، محمد چمنی[2]

۱ـ استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت، رشت -ایران.

۲- دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران - ایران.

*نویسنده مسئول: alirezaseidavi@iaurasht.ac.ir

دریافت مقاله: ۲۳فروردین۸۸ پذیرش نهایی: ۷آذر۸۸

چکیده

باکتری‌های جنس کلستریدیوم به ویژه کلستریدیوم پرفرینگنس از عوامل مهم بیماری زای انسان و حیوانات هستند. برای تعیین فراوانی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی، از شیوه جدیدی موسوم به غلظت‌سنجی مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلیمراز استفاده‌شد. محتویات گوارشی جوجه‌ها خارج و DNA آنها استخراج شد. با استفاده از واکنش‌های زنجیره ای پلیمراز، باندهای اختصاصی مربوط به باکتری‌های جنس کلستریدیوم و کل باکتری‌های دستگاه‌گوارش به دست‌آمد. سپس بر اساس روش غلظت‌سنجی مبتنی بر 16S ribosomal DNA، جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌های دستگاه‌گوارش محاسبه‌شد. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل نشان داد باکتری‌های جنس کلستریدیوم ۰/۳۶ درصد کل باکتری‌های دوازدهه را شامل می‌شوند که این مقدار در ژوژنوم معادل ۰/۲۰ درصد برآورد شد. همچنین ۱/۱۵ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم را باکتری‌های جنس کلستریدیوم تشکیل می‌دادند و نسبت جمعیت این باکتری‌ها در روده کور نیز معادل ۳/۷۲ درصد برآورد شد. جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور) بیش از بخش‌های فوقانی روده باریک بود. در سنین مختلف پرورش جوجه‌ها، بیشترین و کمترین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم به ترتیب در چهار و چهارده روزگی مشاهده شد. کمترین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم، در دوازدهه جوجه‌های چهار روزه (۰/۰۰۰۱۶ درصد) و بیشترین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در روده‌کور جوجه‌های چهار روزه (۴/۸۷ درصد) به دست‌آمد. جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در هرسه‌سن چهار، چهارده و سی روزگی، در روده کور بیش از سایر بخش‌ها و در ژئوژنوم کمتر از سایر بخش‌ها بود. نتایج حاصل بیانگر متغیر بودن جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور و کارآیی روش غلظت‌سنجی برای برآورد جمعیت نسبی این باکتری‌ها است. پژوهشنامه دامپزشکی، ۱۳۸۹، دوره ۶، شماره ۱، ۱۱-۱.

واژه‌های کلیدی: کلستریدیوم، غلظت سنجی، روده کور، پرندگان، واکنش زنجیره‌ای پلیمراز.

Determining of Relative Population of *Clostridium* spp. Bacteria in Duodenum, Jejunum, Ileum and Cecum of Broilers at Various Ages using Densitometry Technique based on 16S rDNA Approach

Seidavi, A.R.[1*], Chamani, M.[2]

[1]*Assistant Professor of Animal Sciences Department, Islamic Azad University, Rasht Branch, Rasht-Iran. 2.Associate Professor of Animal Sciences Department, Islamic Azad University, Sciences and Researches Branch, Tehran-Iran.*

Abstract *Clostridium* spp. especially *Clostridium perfringens* are pathogenic factors in human and animals. It was used novel approach based on polymerase chain reaction named densitometry technique for determining of *Clostridium* spp. bacteria frequency in duodenum, jejunum, ileum and cecum of broiler. Digest contents were removed and extracted their DNA. It was obtained specific bands for detecting of *Clostridium* spp. and all bacteria using polymerase chain reactions. Then, it was determined relative population of *Clostridium* spp. relative to total gut bacteria by means of densitometry technique based on 16S ribosomal DNA approach. Result analysis was showed *Clostridium* spp. consists 0.36% of total duodenum bacteria. Also it was showed *Clostridium* spp. consists 0.20% of total jejunum bacteria. Meanwhile *Clostridium* spp. consists 1.15% of total ileum bacteria. Furthermore it was showed *Clostridium* spp. consists 3.72% of total cecum bacteria. Relative population of *Clostridium* spp. in lower segments i.e. ileum and cecum were higher than upper segments i.e. duodenum and jejunum. Meanwhile among different ages, the highest and lowest relative population of *Clostridium* spp. obtained in 4 and 14 of ages respectively. The lowest relative population of *Clostridium* spp. obtained in duodenum of broilers in 4d of ages (0.00016%). Also, the highest relative population of *Clostridium* spp. obtained in cecum of broilers in 4d of ages (4.87%). At all three studied 4, 14 and 30d of ages, the highest relative population of *Clostridium* spp. obtained in cecum and the lowest relative population of *Clostridium* spp. obtained in jejunum. From obtained results, it was showed *Clostridium* spp. populations are variable in various intestine segments and densitometry has efficiency for determining relative population of these of bacteria. ***Vet. Res. Bull. 6,1: 1-11, 2010.***

Keywords: *Clostridium* spp, Densitometry, Cecum, Avian, Polymerase Chain Reaction.

مقدمه

باکتری‌های جنس کلستریدیوم به ویژه کلستریدیوم پرفرینگنس از عوامل بیماری زای انسان و حیوانات هستند (Songer، ۱۹۹۶؛ Bacciarini و همکاران، ۲۰۰۳) که افت شدید تولیدات صنعت طیور را در سرتاسر جهان به دنبال دارند (Roberts و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kaldhusdal و Løvland، ۲۰۰۰؛ Brynestad و Granum، ۲۰۰۲). این باکتری‌ها در غذاهای با پروتئین بالا که منشأ حیوانی داشته باشند (نظیر گوشت و شیر) فراوان هستند. کلستریدیوم پرفرینگنس حداقل چهار اگزوتوکسین مهم آلفا، بتا، اپسیلون و لاندا دارد (Petit و همکاران، ۱۹۹۹). این توکسین‌ها عامل شکل‌های مختلف انتروتوکسیمیا و التهاب روده در میزبان هستند (Songer، ۱۹۹۶؛ Bueschel و همکاران، ۲۰۰۳). هرچند روش‌های مبتنی بر PCR برای تشخیص این باکتری‌ها به خوبی توسعه یافته اند (Daube و همکاران، ۱۹۹۴؛ Songer و Meer، ۱۹۹۶؛ Meer و Songer، ۱۹۹۷؛ Yoo و همکاران، ۱۹۹۷؛ Kadra و همکاران، ۱۹۹۹؛ Augustynowicz و همکاران، ۲۰۰۰؛ Garmory و همکاران، ۲۰۰۰). لیکن هنوز نیاز به کارهای تحقیقاتی بسیار زیاد دیگری است تا جنبه‌های مختلف آن دقیقاً روشن شود.

دستگاه گوارش طیور یکی از مهم ترین نقاط استقرار و اقامت باکتری‌های جنس کلستریدیوم است (Craven و همکاران، ۲۰۰۱b؛ Kaldhusdal و همکاران، ۲۰۰۱). هرگونه تلاشی که منجر به شناخت و تعیین جمعیت فلور میکروبی دستگاه گوارش طیور شود، می‌تواند مسیر دستکاری فلور میکروبی در جهت اهداف مورد نظر را تسهیل کند (Craven و همکاران، ۲۰۰۱a؛ Kessel و همکاران، ۲۰۰۱). در ابتدا باکتری‌ها تنها با استفاده از روش‌های کشت میکروبی مورد بررسی قرار می‌گرفتند. این روش‌ها علاوه بر پُرزحمت، وقت گیر و ناقص بودن، برای بررسی جامع طیف وسیعی از باکتری‌ها کارآیی لازم را نداشتند (Apajalahti و همکاران، ۲۰۰۳).

اخیراً روش‌های مولکولی برای شناسایی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در طیور توسعه یافته اند (Engstrom و همکاران، ۲۰۰۳؛ Gholamiandekhordi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jaimes و همکاران، ۲۰۰۶؛ McCourt و همکاران، ۲۰۰۶؛ Myers و همکاران، ۲۰۰۶؛ Mirhosseini و همکاران، ۲۰۰۸). روش‌های مبتنی بر ژنتیک مولکولی امروزه بدلیل دقت، کارآیی و سرعت بالا مورد توجه زیادی قرار دارند. در چند سال گذشته، روش‌های مولکولی جدیدی برای کمّی سازی داده‌های مربوط به شناسایی ویروس‌ها و باکتری‌ها و پروتئین‌ها توسعه یافته اند که روش‌های real time PCR و غلظت سنجی یا دنسیتومتری از آن جمله هستند (Kim و همکاران، ۲۰۰۷).

در سالیان اخیر تعیین توالی 16S ribosomal RNA (rRNA) به عنوان ابزار اصلی تعیین روابط فیلوژنتیک بین باکتری‌ها به کار می‌رود (Zheng و همکاران، ۲۰۰۹). ویژگی این شیوه مولکولی سبب شده است که علاوه بر تعیین روابط فیلوژنتیکی، برای تشخیص و تعیین هویت باکتری‌ها در آزمایش‌های بالینی هم به کار رود (Pillidge و همکاران، ۲۰۰۹). مطالعات مختلف نشان داده اند که تعیین توالی روش مناسبی برای باکتری‌های با رشد آهسته، غیر معمول و سختگیر است؛ در حالی که چنین باکتری‌هایی در شیوه‌های کشت میکروبی به میزان بسیار ضعیفی تشخیص داده می‌شوند (Lamendella و همکاران، ۲۰۰۷؛ Woo و همکاران، ۲۰۰۷؛ Lami و همکاران، ۲۰۰۹). پیشرفت‌های اخیر در روش‌های مولکولی مبتنی بر DNA و RNA ریبوزومی، امکان تشخیص جمعیت‌های باکتریایی مختلف در نمونه‌های محیط را بدون کشت دادن آنها فراهم کرده است (Gong و همکاران، ۲۰۰۷؛ Kumar و همکاران، ۲۰۰۹).

اولین بار از روش غلظت سنجی برای محاسبه کمّیت DNA میتوکندریایی استفاده شد (Enzmann و همکاران، ۱۹۹۹). در این تحقیق بیان شد غلظت سنجی، کارآیی و دقت بهتری نسبت به روش اسپکتروفتومتری دارد. به تازگی استفاده از روش غلظت سنجی برای بررسی میزان تجزیه پروتئین‌های هموگلوبین انسانی هم گزارش شده است (Guan و همکاران، ۲۰۰۶).

این تحقیق به منظور تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف دوران پرورش آنها طراحی و اجرا شد تا جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم دستگاه گوارش طیور نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش طیور به روش غلظت سنجی تعیین و جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در هر بخش و سن مشخص شود.

مواد و روش ها

تعداد صد و بیست قطعه جوجه گوشتی سویه راس که از مهمترین سویه‌های مورد استفاده در سرتاسر ایران است از سن یک تا سی روزگی تحت شرایط یکسان از نظر جیره، مدیریت پرورش (دما، نور، تراکم، تهویه، بستر، واکسیناسیون، رطوبت،

آبخوری‌ها، دان خوری‌ها و غیره) و مطابق شرایط تجاری موجود در سطح واحدهای پرورش طیور منطقه نگهداری و پرورش داده شدند. به این منظور جوجه‌ها روی بستر پوشال و خرده چوب پرورش داده شدند. ابتدا سالن جاروب و با فشار آب شسته شد. سپس با مواد ضدعفونی کننده مورد ضدعفونی قرار گرفت. کلیه آبخوری‌ها و دان خوری‌ها ابتدا شسته و سپس بوسیله مواد مناسب ضدعفونی گردید. در طول دوره پرورش نیز آبخوری‌ها و دان خوری‌ها متناسب با سن جوجه‌ها مورد بهره برداری قرار گرفتند. پس از خشک شدن کف سالن، روی کف آن پوشال ریخته شد. سه روز قبل از شروع پرورش جوجه‌ها، با بستن کلیه درب و پنجره‌ها و سایر منافذ، با استفاده از گاز فرمالدئید اقدام به ضدعفونی سالن و کلیه وسائل و تجهیزات آن شد و دو روز قبل از شروع پرورش جوجه‌ها هم با باز کردن در و پنجره‌ها و هواکش‌ها، گاز فرمالدئید خارج شد. حرارت مورد نیاز سالن نیز توسط هیتر تامین گردید. برنامه واکسیناسیون نیز مطابق دستورالعمل دامپزشک و بصورت مرسوم در منطقه انجام پذیرفت.

در هریک از سنین چهار، چهارده و سی روزگی از دوران پرورش، تعداد بیست و چهار قطعه جوجه به روش قطع گردنی کشتار شده و سپس پر و پوست آنها با هم جدا گردید. در ادامه حفره بطنی عمود بر خط میانی و در ناحیه شکمی باز شد و دستگاه گوارش جوجه‌ها خارج گردید. سپس محتویات هر یک از بخش‌های دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور در شرایط استریل جداسازی و پس از انتقال به میکروتیوبهای مربوطه، داخل فلاسک یخ قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل گردید. در انجام مراحل فوق دقت گردید از ورود آلودگی‌های ثانویه به نمونه‌ها جلوگیری شود. نمونه‌های تهیه شده تا زمان استخراج در دمای ۲۰ـ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

در ادامه DNA محتویات بخش‌های مختلف روده کوچک و روده کور جوجه‌ها جداگانه با استفاده از پروتکل‌های موجود (صیداوی و همکاران، ۱۳۸۶) استخراج و خالص سازی شد. با استفاده از تکنیک اسپکتروفتومتری، کمّیت و با استفاده از الکتروفورز کیفیت این DNA تأیید شد. سپس با استفاده از اطلاعات موجود (صیداوی، ۱۳۸۶) پرایمری برای شناسایی همه باکتری‌های موجود در بخش‌های مختلف روده کوچک و روده کور جوجه‌ها انتخاب گردید. همچنین با استفاده از همین منابع علمی، یک جفت پرایمر مجزا برای شناسایی کلیه باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌ها انتخاب شد. یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های جنس کلستریدیوم و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها (یونیورسال) بهینه سازی شد (صیداوی و همکاران، ۱۳۸۶).

در این آزمایش از ژن 16S rRNA به عنوان مولکول هدف برای شناسایی باکتری استفاده گردید. علت انتخاب این ژن، بالا بودن تعداد کپی این مولکول و پایداری آن در سلول بود (Kawanami و همکاران، ۲۰۰۹، Zheng و همکاران، ۲۰۰۹). با استفاده از توالی استاندارد ژن 16S rRNA از باکتری‌های جنس کلستریدیوم، پرایمرهای رفت و برگشت انتخاب گردید.

حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر بود. با توجه به اینکه حجم نهایی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد، ابتدا تعداد کل نمونه‌هایی که در هر مرحله PCR می‌شدند برآورد گردید. سپس در هر مرحله آزمایش، حجم کل واکنش‌های PCR را یک واکنش بیشتر از تعداد واقعی واکنش‌های PCR مورد نظر در نظر گرفته شد تا هنگام تقسیم پیش مخلوط واکنش‌ها بین تیوبها، هدر رفتن مقادیر جزئی پیش مخلوط از طریق نوک سمپلر با انتهای میکروتیوب حاوی پیش مخلوط، سبب کمبود حجم پیش مخلوط برای تیوبهای آخر نشود. در ادامه پیش مخلوط کل واکنش‌ها تهیه می‌شد. بدین ترتیب که مقدار آب دوبار تقطیر کل واکنش‌ها محاسبه شده و در یک میکروتیوب ریخته شد. سپس اجزای دیگر واکنش PCR شامل MgCl2، آغازگر رفت و برگشت، بافر و dNTPs (غیر از آنزیم) برای کل واکنش‌ها بر اساس منبع صیداوی و همکاران (۱۳۸۶) محاسبه شد و در این میکروتیوب ریخته شد. در ادامه DNA الگوی مورد نظر به تفکیک در میکروتیوبهای جداگانه ریخته شد. به میکروتیوب حاوی پیش مخلوط واکنش PCR که روی یخ قرار داده شده بود، آنزیم به مقدار کل واکنش‌ها محاسبه و افزوده شد. سپس به سرعت پیش مخلوط تهیه شده، بین میکروتیوبها تقسیم شد و پس از کمی ورتکس کردن، در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شد تا واکنش PCR انجام شود. محصولات این دو واکنش PCR الکتروفورز و مرئی شده و از باندهای مربوطه عکسبرداری شد.

تجزیه و تحلیل کمّی داده‌ها با استفاده از نرم افزار Analyzer Gel Proc انجام شد. برای انجام غلظت سنجی از روش Bromage و Kaattari (۲۰۰۷) استفاده گردید. شدت (غلظت) باندهای اختصاصی کل باکتری‌ها توسط نرم افزار فوق و بر اساس مدل

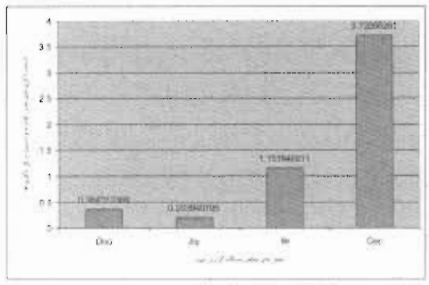
رگرسیون خطی با برون یابی محاسبه و برآوردی از جمعیت کل باکتری‌ها به دست آمد. علاوه بر این، شدت (غلظت) باندهای اختصاصی باکتری‌های جنس کلستریدیوم نیز توسط نرم افزار فوق بر اساس مدل رگرسیون خطی همراه با برون یابی محاسبه شد. سپس نسبت شدت (غلظت) باندهای اختصاصی باکتری‌های جنس کلستریدیوم به شدت (غلظت) باندهای اختصاصی کل باکتری‌ها بدست آمد تا جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها بر حسب درصد در هر یک از بخش‌های دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور و در هر سن بدست آید. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS و مقایسه میانگین داده‌ها به روش دانکن انجام پذیرفت.

نتایج

با توجه به بهینه سازی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های جنس کلستریدیوم و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دیگر برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها، استفاده از روش غلظت سنجی توانست جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش طیور را برآورد کند. نتایج حاصل توانست نشان دهد چه درصدی از کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی متعلق به گونه‌های مختلف باکتری‌های جنس کلستریدیوم هستند. تکثیر یک قطعه اختصاصی از ژن 16S rDNA سبب شناسایی کلیه باکتری‌های جنس کلستریدیوم و بیان آن به صورت باندهای اختصاصی و مجزا شد که پس از الکتروفورز، تحت اشعه ماورای بنفش مرئی شدند. همچنین تکثیر قطعه‌ای از ژن 16S rDNA سبب شناسایی کلیه باکتری‌های دستگاه گوارش طیور و بیان آن به صورت باندی اختصاصی شد که پس از الکتروفورز، تحت اشعه ماورای بنفش مرئی شد. همچنین نتیجه دو واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مجزا و مقایسه نتایج حاصل با نشانگر اندازه مناسب، تکثیر قطعات هدف را تأیید کرد.

۳-۱- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش

نتایج به دست آمده از این تحقیق توانست درصد باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها را در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی نشان دهد. بر این



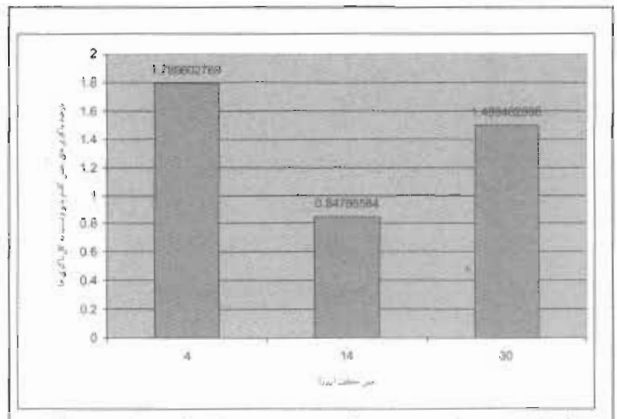
شکل ۱- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار بخش دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور

شکل۱- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در چهار بخش دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده‌کور

اساس ۰/۳۶ درصد باکتری‌های دوازدهه متعلق به جنس کلستریدیوم بودند. در ژئوژنوم هم ۰/۲۰ درصد کل باکتری‌ها متعلق به این جنس بوده و ۱/۱۵ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم هم از گروه کلستریدیوم بودند. سرانجام از کل باکتری‌های روده کور هم ۳/۷۲ درصد آنها متعلق به جنس کلستریدیوم بودند. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل بر اساس خروجی‌های نرم افزار Gel Proc Analyzer و تعیین نسبتهای مربوطه نشان داد جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور، رده a) به طور معنی داری ($P\leq۰/۰۵$) بیشتر از بخش‌های فوقانی روده باریک (دوازدهه و ژوژنوم، رده b) است (شکل۱).

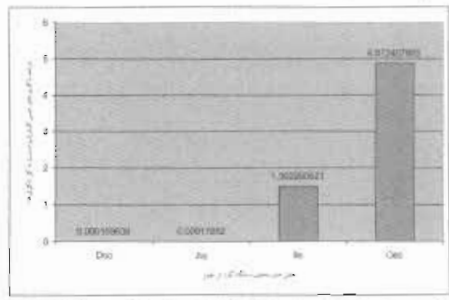
۳-۲- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف

بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در چهار روزگی، ۱/۷۸ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها، باکتری‌های جنس کلستریدیوم هستند (رده a). این باکتری‌ها ۰/۸۴ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها در چهارده روزگی را تشکیل می‌دهند (رده b). در سی روزگی نیز باکتری‌های جنس کلستریدیوم، ۱/۴۹ درصد کل باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها را تشکیل می‌دهند (رده a). بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در ابتدا جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در حداکثر بوده و سپس با افزایش سن جوجه‌ها تا چهارده روزگی، جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم به طور معنی داری ($P\leq۰/۰۵$) کاهش یافته و پس از آن سیر صعودی پیدا می‌کند؛ لیکن به اندازه جمعیت نسبی ابتدای دوره پرورش



شکل 2- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف

شکل۲: جمعیت باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در سنین مختلف.



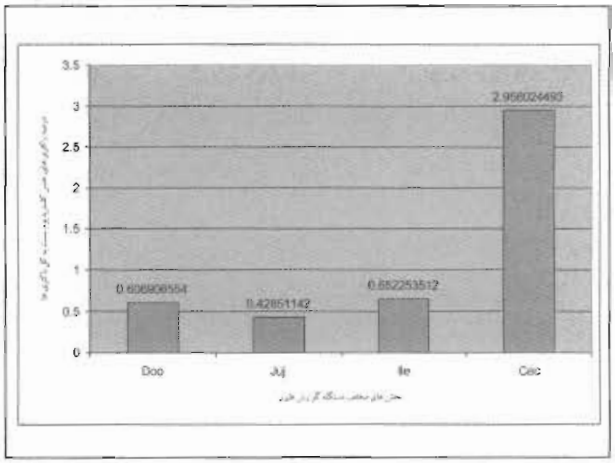
3- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در دوازده، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

شکل۳: جمعیت باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در چهار روزگی در دوازده، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور.

برنمی گردد. بر این اساس در بین سنین مختلف، بیشترین و کمترین جمعیت نسبی باکتری های جنس کلستریدیوم به ترتیب در چهار و چهارده روزگی وجود داشت و اختلاف بین سنین فوق هم معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود (شکل ۲).

۳-۳- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش

اختلاف بین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در چهار روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، ۰/۰۰۰۱۶ درصد باکتری های دوازده در سن چهار روزگی متعلق به جنس کلستریدیوم بودند (رده c). همچنین در سن چهار روزگی، در ژئوژنوم هم ۰/۰۰۰۱۷ درصد کل باکتری ها متعلق به این جنس بود (رده c) و ۱/۵۰ درصد کل باکتری های موجود در ایلئوم در سن چهار روزگی از گروه کلستریدیوم بودند (رده b). سرانجام از کل



شکل۴: جمعیت باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در چهارده روزگی در دوازده، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

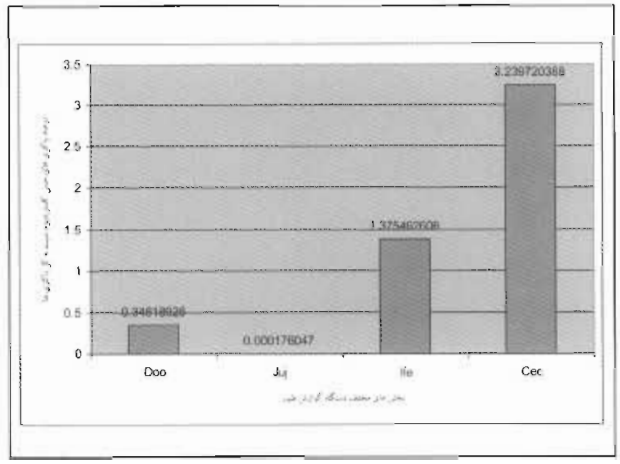
باکتری‌های روده کور در سن چهار روزگی، ۴/۸۷ درصد آنها (رده a) متعلق به جنس کلستریدیوم بودند (شکل ۳).

۳-۴- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش

اختلاف بین جمعیت نسبی باکتری‌ها در این سن در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود. بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در چهارده روزگی، ۰/۶۰ درصد کل باکتری های دوازده از جنس کلستریدیوم هستند (رده b). در این سن، باکتری های جنس کلستریدیوم ۰/۴۲ درصد (رده b) باکتری های ژئوژنوم را تشکیل می دادند و این مقدار در ایلئوم به ۰/۶۵ درصد (رده b) و در روده کور به ۲/۹۵ درصد (رده a) کل باکتری ها رسید (شکل ۴).

۳-۵- جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در چهار بخش مورد بررسی دستگاه گوارش

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، درصد باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در سن سی روزگی در بخش های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به دست آمد و این اختلاف ها معنی دار ($P\leq ۰/۰۵$) بود. بر این اساس ۰/۳۴ درصد باکتری های دوازده در سن سی روزگی متعلق به جنس کلستریدیوم بودند (رده c). همچنین در این سن، در ژئوژنوم هم ۰/۰۰۰۱۷ درصد کل باکتری ها متعلق به این جنس بود (رده c) و ۱/۳۷ درصد کل باکتری های موجود در ایلئوم در سن سی روزگی از گروه کلستریدیوم بودند (رده b). سرانجام از کل باکتری های روده کور در این سن، ۳/۲۴ درصد (رده a) آنها متعلق



شکل ۵: جمعیت باکتری های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری ها در سی رورگی در دوازدهه، ژئوژنوم، ایلئوم و روده کور

به جنس کلستریدیوم بودند (شکل ۵).

بحث و نتیجه‌گیری

ازآن جایی که باکتری‌های جنس کلستریدیوم نقش زیادی در بروز بیماری در جوجه‌های گوشتی و کاهش سطح تولید گله دارند، بنابراین تشخیص و تعیین جمعیت این باکتری‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است و کنترل آنها می‌تواند به طور مستقیم و غیرمستقیم عملکرد گله را افزایش دهد (Brynestad و Granum، ۲۰۰۲؛ Craven و همکاران، ۲۰۰۳؛ Apajalahti و همکاران، ۲۰۰۴). پیش از این تکثیر ژن هدف در باکتری‌های جنس کلستریدیوم با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز گزارش شده بود (Engstrom و همکاران، ۲۰۰۳؛ Gholamiandekhordi و همکاران، ۲۰۰۶؛ Jaimes و همکاران، ۲۰۰۶).

با توجه به بررسی‌های انجام گرفته می‌توان گفت امکان شناسایی دقیق و سریع باکتری‌های جنس کلستریدیوم با استفاده از قطعه خاصی از ژن 16S rDNA به طور کامل وجود دارد (Augustynowicz و همکاران، ۲۰۰۰؛ McCourt و همکاران، ۲۰۰۶؛ Myers و همکاران، ۲۰۰۶؛ Mirhosseini و همکاران، ۲۰۰۸). در واقع روش تعیین توالی مولکولهای 16S rRNA تبدیل به بهترین استاندارد در بررسی باکتری‌ها شده است (Li و همکاران، ۲۰۰۹؛ Pillidge و همکاران، ۲۰۰۹). این مولکول حدود هزار و ششصد نوکلئوتید طول دارد (Rudi و همکاران، ۲۰۰۹). توالی این مولکول ابزار مناسبی را برای تعیین تشابه ژنومی در سطوح بالاتر از گونه فراهم کرده که مقایسه تشابهات در میان کل باکتری‌ها را ممکن می‌سازد (Lami و همکاران، ۲۰۰۹). البته گونه‌های بسیار مرتبط با هم، اغلب توالی rRNA یکسانی دارند (Takeuchi و همکاران، ۲۰۰۹). لذا این روش اطلاعات تکمیلی برای هیبریداسیون DNA-DNA فراهم می‌کند (Sagaram و همکاران، ۲۰۰۹). بنابراین امروزه تعیین توالی ژنی 16S rRNA ودیگر نواحی ژنی جهت شناسایی باکتری‌ها به کار می‌رود (Jaeschke و همکاران، ۲۰۰۹؛ Tardy و همکاران، ۲۰۰۹).

نتایج به دست آمده در این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس کلستریدیوم نسبت به کل باکتری‌های موجود در هر یک از چهار بخش دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی را مشخص کرد. نتایج حاصل نشان دهنده متغیر بودن جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور است که با گزارش‌های پیشین مطابقت دارد (Roberts و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kessel و همکاران، ۲۰۰۱؛ Barbara و همکاران، ۲۰۰۷) و با توجه به نقش منفی کلستریدیوم، علت آن می‌تواند مقاومت بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌ها در برابر استقرار و کلنی زاسیون این باکتری بیماری زا و مناسب بودن محیط هر بخش از دستگاه گوارش برای رشد و تکثیر این پاتوژن باشد. در واقع، متفاوت بودن میزان جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم در سنین مختلف و غیریکنواختی آن در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌ها از قبل هم انتظار می‌رفت؛ چرا که این جمعیت تا حد زیادی تحت تأثیر اثرات متقابل بافت و/یا سلول‌های میزبان - باکتری است (صیداوی، ۱۳۸۶). بنابراین نتایج فوق باید به عنوان یک مورد خاص بیان شده و در هنگام ارائه نتایج مربوط به جمعیت یک باکتری خاص در دستگاه گوارش، شرایط عوامل موثر بر جمعیت این باکتری در نظر گرفته شود. در واقع هدف اصلی این آزمایش، بررسی کارآیی شیوه غلظت سنجی در تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس کلستریدیوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور، و در مرحله بعد معرفی یک روش نوین بجای روش‌های کشت میکروبی جهت مقایسات کمّی و تعیین جمعیت باکتری‌های دستگاه گوارش بود.

همچنین باید به این مسأله توجه شود که با توجه به این که هدف از این تحقیق، توسعه کاربرد استفاده از تکنیک غلظت سنجی در تعیین جمعیت باکتری‌ها بود، لذا باکتری‌های جنس کلستریدیوم تنها به عنوان یک نمونه آزمایشی انتخاب شد و لذا می‌توان پس از این، برای تعیین جمعیت هر نوع باکتری مورد نظر در سطح جنس، گونه یا سویه، اقدام به انتخاب پرایمر مربوط به همان جنس، گونه یا سویه کرد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز اختصاصی برای تشخیص همان جنس، گونه یا سویه باکتریایی

مورد نظر انجام داد و سپس با استفاده از تکنیک غلظت سنجی، همانند آن چه در این آزمایش انجام شد، اقدام به تعیین جمعیت آن باکتری جنس، گونه یا سویه نمود.

جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم در دستگاه گوارش طیور پیش از این هم بررسی شده بود (Kaldhusdal و همکاران، ۲۰۰۱)؛ لیکن این محققان جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم را با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی برآورد کرده بودند که این روش‌ها معایب زیادی دارند (صیداوی، ۱۳۸۶). در هر صورت، نتایج این تحقیق درباره جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم همخوانی زیادی با نتایج آزمایش‌های محققان دیگر (Roberts و همکاران، ۱۹۹۶؛ Kessel و همکاران، ۲۰۰۱؛ Barbara و همکاران، ۲۰۰۷) داشت. یکی از معایب عمده روش‌های سنتی این است که عمدتاً قادرند تنها بخش کوچکی از باکتری‌ها را تشخیص دهند. زیرا احتیاجات رشد بیشتر باکتری‌ها هنوز ناشناخته مانده است و نمی توان شرایط مورد نیاز آنها را در محیط آزمایشگاهی شبیه سازی کرد. بنابراین دستیابی به یک روش آزمایشگاهی بدون کشت میکروبی، در این گونه موارد بسیار مفید خواهد بود تا حداقل باکتری‌های بیماری‌زا را بتواند شناسایی کند. البته چندبار غنی سازی این نوع نمونه‌ها با محیط کشت اختصاصی مناسب می تواند تا حدودی منجر به تشخیص درست و حذف نتایج منفی کاذب ناشی از عدم رشد باکتری‌های هدف در روش‌های کشت میکروبی شود. لیکن به دلیل نتایج مثبت کاذب ناشی از تکثیر باکتری‌های غیر هدف با احتیاجات رشد مشابه باکتری‌های هدف، دقت این روش‌ها نسبت به روش غلظت سنجی کمتر می‌باشد.

پیش از این نتایج مشابهی توسط پژوهشگران دیگر درباره کارآیی روش غلظت سنجی در کمّی سازی نتایج باندهای ژل آگارز و اکریلامید بیان شده است. اولین بار Enzmann و همکاران (۱۹۹۹) بیان داشتند تکنیک غلظت سنجی در محاسبه کمّیت DNA میتوکندریایی کارآیی و دقت بهتری نسبت به روش اسپکتروفتومتری دارد. کارآیی روش غلظت سنجی برای تعیین غلظت نسبی پروتئین‌های هدف توسط Bromage و Kaattari (۲۰۰۷) اثبات و گزارش شده است که صحت و دقّت نتایج این تحقیق را تأیید می‌کند. اخیراً هم استفاده از تکنیک دنسیتومتری در پزشکی و بویژه در سنجش تراکم استخوان و مسائل پیرامون آن بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Leslie و همکاران، ۲۰۰۷؛ Baim و همکاران، ۲۰۰۸؛ Faulkner و Miller، ۲۰۰۸؛ Blake و Fogelman، ۲۰۰۸؛ Miller، ۲۰۰۸). همچنین Zhang و همکاران (۲۰۰۷) هم برای اولین بار میزان پروتئین‌های ایمنوگلوبین، آلبومین سرم گاوی، کازئین، بتا لاکتوگلوبولین و لاکتاآلبومین محصولات لبنی را با استفاده از تکنیک غلظت سنجی گزارش کردند و مزیت این تکنیک نسبت به شیوه‌های مرسوم دیگر را تأیید نمودند. البته باید توجه نمود که یکی از محدودیت‌های این روش، هنگام کاربرد ژل‌های اکریلامید تا پنج درصد است که بدلیل زمینه غیریکنواخت و پررنگ آن، دقت نتایج تکنیک غلظت سنجی کاهش می‌یابد. به همین دلیل در این آزمایش از ژل آگارز ۱/۴ درصد استفاده شد.

با توجه به نتایج این آزمایش می‌توان بیان داشت که روش غلظت سنجی نسبت به روش‌های کشت میکروبی و سرولوژیکی دارای کاربرد ساده، سرعت بالا، دقت مناسب، تکرارپذیری زیاد و هزینه نسبتاً پایین است. یکی از مهم ترین مزیت تعیین جمعیت باکتریایی بر اساس روش غلظت سنجی مبتنی بر نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمراز که در این تحقیق از آن استفاده شد، این است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز توانایی تشخیص توالی‌های هدف را دارد و ارتباطی با رشد سلول‌های هدف ندارد؛ در حالی که توانایی تشخیص و تعیین جمعیت در روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی، به رشد باکتری‌های هدف وابسته است.

به عنوان نتیجه گیری نهایی باید گفت شیوه غلظت سنجی مبتنی بر نتایج PCR را می‌توان روشی سودمند و مفید برای تعیین جمعیت باکتری‌های جنس کلستریدیوم در دستگاه گوارش طیور دانست که لازم است با دقت زیاد نسبت به جزئیات کاربرد آن، به تدریج جایگزین روش‌های سنتی نظیر کشت میکروبی یا سرولوژیکی شود. در آینده پیشنهاد می‌شود جمعیت نسبی سایر باکتری‌های مهم فرآورده‌های دام و طیور نیز با استفاده از شیوه غلظت سنجی تعیین گردد.

تشکر وسپاسگزاری

این مقاله بر اساس نتایج طرح پژوهشی «تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس سالمونلا، کلستریدیوم و باکتری اشریشیا کلی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور» استخراج شده است که اعتبار آن از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت تأمین گردیده است. بدین وسیله از مسئولین محترم دانشگاه برای حمایت و تأمین هزینه‌های طرح سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

منابع

۱- صیداوی، ع.ر. ۱۳۸۶. شناسایی برخی باکتری‌های روده کور (سکوم) دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز. رساله دکتری تخصصی. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران. ۳۱۷ صفحه.

۲- صیداوی، ع. ر.، میرحسینی، س. ض.، شیوازاد، م.، چمنی، م.، صادقی، ع. ا. و پورسیفی، ر. ۱۳۸۶. اثر پنج مؤلفه مختلف بر بهینه سازی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای تشخیص باکتری‌های جنس کلستریدیوم در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی. مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار. ۳ (۳): ۱۶۲-۱۵۳.

3-Apajalahti, J., Kettunen, A., Graham, H. (2004) Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poult.* Sci. J, **60**:223-232.

4-Apajalahti, J.H.A., Kettunen, A., Nurminen,P.H., Jatila, H., Holben, W.E. (2003) Selective plating underestimates abundance and shows differential recovery of bifidobacterial species from human feces. *Appl. Environ. Microbiol,* **69**:5731-5735.

5-Augustynowicz, E., Gzyl, A., Slusarczyk, J. (2000) Molecular epidemiology survey of toxinogenic Clostridium perfringens strain types by multiplex PCR. *Scand. J. Infect. Dis*, **32**: 637-641.

6-Bacciarini, L.N., Boerlin,P., Straub,R., Frey, J., Grone, A. (2003) Immunohistochemical localization of Clostridium perfringens beta-2 toxin in the gastrointestinal tract of horses. *Veterinary Pathology*, **40**: 376-381.

7-Baim, S., Leonard,M.B., Bianchi,M.L., Hans,D.B., Kalkwarf,H.J., Langman,C.B., Rauch, F. (2008) Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry and Executive Summary of the 2007 ISCD Pediatric Position Development Conference. *J. Clin. Densitometry*, **11(1)**: 6-21.

8-Barbara, A.J., Trinh,H.T., Glock, R.D., Songer, J.G. (2007) Necrotic enteritis-producing strains of Clostridium perfringens displace nonnecrotic enteritis strains from the gut of chicks. Vet. Microbiol. doi:10.1016/j.vetmic.

9-Blake, G.M., Fogelman, I. (2008) Methods and Clinical Issues in Bone Densitometry Principles of Bone Biology (Third Edition), 1883-1894.

10-Bromage, E.S., Kaattari, S.L. (2007) Simultaneous quantitative analysis of multiple protein species within a single sample using standard scanning densitometry. J. Immunol. Methods, **323**: 109-113.

11-Brynestad, S., Granum, P.E. (2002) Clostridium perfringens and foodborne infections. Int. J. Food Microbiol, **74**: 195-202.

12-Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington,S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G. (2003) Prevalence of cpb2, encoding beta2 toxin, in Clostridium perfringens field isolates: correlation of genotype with phenotype. Veterinary Microbiology, **94**: 121-129.

13-Craven, S.E., Cox, N.A., Bailey, J.S., Cosby, D.E. (2003) Incidence and tracking of Clostridium perfringens through an integrated broiler chicken operation. Avian Dis, **47**: 707-711.

14-Craven, S.E., Cox, N.A., Stern,N.J., Mauldin, J.M. (2001a) Prevalence of Clostridium perfringens in commercial broiler hatcheries. Avian Dis, **45**: 1050-1053.

15-Craven, S.E., Stern, N.J., Bailey, J.S., Cox, N.A. (2001b) Incidence of Clostridium perfringens in broiler chickens and their environment during production and processing. Avian Dis, **45**: 887-896.

16-Daube, G., China,B., Simon, P., Hvala, K., Mainil, J. (1994) Typing of Clostridium perfringens by in vitro amplification of toxin genes. *J. Appl. Bacteriol*, **77**: 650-655.

17-Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen, E., Baverud, A., Gunnarsson, A. (2003) Molecular typing of isolates of Clostridium perfringens from healthy and diseased poultry. Vet. Microbiol, **94**: 225-235.

18-Enzmann, H., Wiemann, C., Ahr,H.J., Schluter, G. (1999) Damage to mitochondrial DNA induced by the quinolone Bay y 3118 in embryonic turkey liver. Mutation Res, **425**: 213-224.

19-Faulkner, K.G., Miller, P.D. (2008) Clinical Use of Bone Densitometry Osteoporosis (Third Edition), **1493**-1518.

20-Garmory, H.S., Chanter,N., French, N.P., Bueschel, D., Songer,J.G., Titball, R.W. (2000) Occurence of

Clostridium perfringens 2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. Epidemiol. Infect, **124**: 61-67.

21-Gholamiandekhordi, A.R., Ducatelle, R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. (2006) Molecular and phenotypical characterization of Clostridium perfringens isolates from poultry flocks with different disease status. Vet. Microbiol, **113**:143-152.

22-Gong, J., Si,W., Forster, R.J., Huang, R., Yu.H., Yin,Y., Yang, C., Han, Y. (2007) 16S rRNA gene-based analysis of mucosaassociated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. FEMS Microbiol. Ecol, **59**:147-157.

23-Guan, S.M., Nagata,H., Shizukuishi,S., Wu, J.M. (2006) Degradation of human hemoglobin by Prevotella intermedia. Anaerobe, **12**: 279-282.

24-Jaeschke, A., Op Den Camp,H.J.M., Harhangi, H., Klimiuk, A., Hopmans, E.C., Jetten, M.S.M., Schouten, S., Sinninghe Damsté, J.S. (2009) 16S rRNA gene and lipid biomarker evidence for anaerobic ammonium-oxidizing bacteria (anammox) in California and Nevada hot springs. FEMS Microbiol. Ecol, **67(3)**: 343-350.

25-Jaimes, C.P., Aristizábal, F.A.G., Bernal, M.M., Suárez, Z.R., Montoya, D. (2006) AFLP fingerprinting of Colombian Clostridium spp strains, multivariate data analysis and its taxonomical implications. J. Microbiol. Methods, **67**:64-69.

26-Kadra, B., Gouillou, J.P., Popoff, M., Bourlioux, P. (1999) Typing of sheep clinical isolates and identification of enterotoxigenic Clostridium perfringens strains by classical methods and by polymerase chain reaction (PCR). FEMS Immunol. Med. Microbiol, **24**: 259-266.

27-Kaldhusdal, M., Lovland, A. (2000) The economical impact of Clostridium perfringens is greater than anticipated. World Poult, **16**:50-51.

28-Kaldhusdal, M., Schneitz, C., Hofshagen, M., Skjerve, E. (2001) Reduced incidence of Clostridium perfringens -associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. Avian Dis, **45**: 149-156.

29-Kawanami, T., Fukuda, K., Yatera, K., Kido, T., Yoshii, C., Taniguchi, H., Kido, M. (2009) Severe pneumonia with Leptotrichia sp. detected predominantly in bronchoalveolar lavage fluid by use of 16S rRNA gene sequencing analysis. J. Clin. Microbiol, **47(2)**: 496-498.

30-Kessel, A.S, Gillespie, I.A., O'Brien, S.J., Adak, G.K., Humphrey, T.J., Ward, L.R. (2001) General outbreaks of infectious intestinal diseases linked with poultry, England and Wales, 1992-1999. Communical Diseases Public Health, **4**: 171-177.

31-Kim, S.H., Kim, I.J., Pyo, H.M.,Tark, D.S., Song, J.Y., Hyun, B.H. (2007) Multiplex real-timeRT-PCR for the simultaneous detection and quantification of transmissible gastroenteritis virus and porcine epidemic diarrhea virus. J. Virol. Methods. doi:10.1016/j. jviromet.

32-Kumar, N., Goswami, M., Gayathri, N., Lakra, W.S. (2009) Genetic diversity in Penaeus semisulcatus (De Haan, 1844) based on mitochondrial DNA sequences of 16S rRNA gene. Indian J. Anim. Sci, **79(2)**: 223-226.

33-Lamendella, R., Santo Domingo, J.W., Oerther, D.B., Vogel, J.R., Stoeckel, D.M. (2007) Assessment of fecal pollution sources in a small northern-plains watershed using PCR and phylogenetic analyses of Bacteroidetes 16S rRNA gene. FEMS Microbiol. Ecol, **59**:651-660.

34-Lami, R., Ghiglione, J.F., Desdevises, Y., West, N.J., Lebaron, P. (2009) Annual patterns of presence and activity of marine bacteria monitored by 16S rDNA-16S rRNA fingerprints in the coastal NW Mediterranean Sea. Aqua. Microb. Ecol, **54(2)**: 199-210.

35-Leslie, W.D., Moayyeri, A., Sadatsafavi, M., Wang, L. (2007) A New Approach for Quantifying Change and Test Precision in Bone Densitometry. J. Clin. Densitometry, **10(4)**: 365-369.

36-Li, M., Zhou, H., Hua, W., Wang, B., Wang, S., Zhao, G., Li, L., Pang, X. (2009) Molecular diversity of Bacteroides spp. in human fecal microbiota as determined by group-specific 16S rRNA gene clone library analysis. Sys. Appl. Microbiol, **32(3)**: 193-

200.

37-McCourt, M.T., Finlay, D.A., Laird, C., Smyth, J.A., Bell, C., Ball, H.J. (2006) Sandwich ELISA detection of Clostridium perfringens cells and a-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry Vet. Microbiol, **106**:259-264.

38-Meer, R.R.,G.Songer,J. (1997) Multiplex polymerase chain reaction assay for genotyping Clostridium perfringens. Am. J. Vet. Res, 58: 702-705.

39-Miller, P.D. (2008) Controversial Issues in Bone Densitometry Principles of Bone Biology (Third Edition), 2008, Pages 1895-1904.

40-Mirhosseini, S.Z., Seidavi, A.R., Shivazad, M., Chamani, M., Sadeghi, A.A., Pourseify, R. (2008) Application of a duplex PCR approach for the specific and simultaneous detection of Clostridium spp. and Lactobacillus spp. in broiler gastrointestinal tract. Indian J. Anim. Nutr, **25(1)**: 83-92.

41-Myers, G., Rasko, D., Cheung, J., Ravel, J., Seshadri, R., DeBoy, R., Ren, Q., Varga, J., Awad, M., Brinkac, L., Daugherty, S., Haft, D., Dodson, R., Madupu, R., Nelson, W., Rosovitz, M., Sullivan, S., Khouri, H., Dimitrov, G., Watkins, K., Mulligan, S., Benton, J., Radune, D., Fisher, D., Atkins, H., Hiscox, T., Jost, H., Billington, S., Songer, J.G., McClane, B.,Titball, R., Rood, J., Melville, S., Paulsen, I. (2006) Skewed genomic variability in strains of the toxigenic bacterial pathogen, Clostridium perfringens. Genome Res, **16**:1031-1040.

42-Petit, L., Gibert, M., Popoff, M.R. (1999) Clostridium perfringens: toxinotype and genotype. Trends Microbiol, **7**: 104-110.

43-Pillidge, C.J., Sheehy, L.M., Shihata, A., Pu, Z.Y., Dobos, M., Powell, I.B. (2009) Intragenomic 16S rRNA gene heterogeneity in Lactococcus lactis subsp. Cremoris. Int. Dairy J, **19(4)**: 222-227.

44-Roberts, T.A., Baird-Parker, A.C., Tompkin, B.B. (Eds.) (1996) Microorganisms in food, Characteristics of microbial pathogens. Blackie Academic and Professional. London, UK.

45-Rudi, K., Zimonja, M., Aasen, I.M., Knutsen, S.H., Sahlstrom, S. (2009) Novel 16S rRNA gene analyses reveal new in vitro effects of insoluble barley fibres on the human faecal microbiota. Lett. Appl. Microbiol, **48(4)**: 433-439.

46-Sagaram, U.S., Deangelis, K.M., Trivedi, P., Andersen, G.L., Lu, S.E., Wang, N. (2009) Bacterial diversity analysis of huanglongbing pathogen-infected citrus, using phyloChip arrays and 16S rRNA gene clone library sequencing. Appl. Environ. Microbiol, **75(6)**: 1566-1574.

47-Songer, J.G. (1996) Clostridial enteric diseases of domestic animals. Clin. Microbiol. Rev, **9**: 216-234.

48-Songer, J.G., Meer, R.R. (1996) Genotyping of Clostridium perfringens by polymerase chain reaction is a useful adjunct to diagnosis of clostridial enteric disease in animals. Anaerobe, **2**: 197-203.

49-Takeuchi, M., Komai, T., Hanada, S., Tamaki, H., Tanabe, S., Miyachi, Y., Uchiyama, M., Kamagata, Y. (2009) Bacterial and archaeal 16S rRNA genes in late pleistocene to holocene muddy sediments from the kanto plain of Japan. Geomicrobiology J, **26(2)**: 104-118.

50-Tardy, F., Gaurivaud, P., Tricot, A., Maigre, L., Poumarat, F. (2009) Epidemiological surveillance of mycoplasmas belonging to the 'Mycoplasma mycoides' cluster. J. Appl. Microbiol, **48(2)**: 210-217.

51-Woo, P.C.W., Lau, S.K.P., Lin, A.W.C., Curreema, S.O.T., Fung, A.M.Y., Yuen, K.Y. (2007) Surgical site abscess caused by Lactobacillus fermentum identified by 16S ribosomal RNA gene sequencing. Diagnos. Microbiol. Infect. Dis, **58**:251-254.

52-Yoo, H.S., Lee, S.U., Park, K.Y., Park, Y.H. (1997) Molecular typing and epidemiological survey of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR. J. Clin. Microbiol, **35**: 228-232.

53-Zhang, H., Xu, J., Wang, J., Menghebilige, M., Sun, T., Li, H., Guo,M., (2007) A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China. Food Control.

54-Zheng, G., Yampara-Iquise, H., Jones, J.E., Andrew Carson, C. (2009) Development of Faecalibacterium 16S rRNA gene marker for identification of human faeces. J. Appl. Microbiol, **106(2)**: 634-641.