تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی با استفاده از تکنیک ژنتیک مولکولی دنسیتومتری

Determination of Relative Population of *Bifidobacterium* spp. in Broiler Gut Using Densitometry Technique Based Molecular Genetics

علیرضا صیداوی[۱]، علی قطبی[۲] ، محمد چمنی[۳]

۱- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت (نویسنده عهده‌دار مکاتبات)

۲- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت

۳- استادیار گروه علوم دامی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

تاریخ دریافت: ۸۶/۱۲/۲۰ تاریخ پذیرش:۸۷/۶/۳۰

چکیده

امروزه برای بررسی باکتری‌های دستگاه گوارش از روش‌های نوین مولکولی استفاده می‌شود. باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نقش مهمی در ممانعت از استقرار برخی پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش طیور داشته و ضمن افزایش مقاومت طیور در برابر بیماری‌ها، سبب بهبود سیستم ایمنی و عملکرد آن ها می‌شوند. این تحقیق به منظور تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی در سال ۱۳۸۶ در دانشگاه آزاد اسلامی رشت انجام شد. از تکنیک مولکولی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و شیوه دنسیتومتری برای بررسی جمعیت نسبی این باکتری استفاده شد.برای این منظور، محتویات گوارشی خارج و DNA مربوطه استخراج شد. با استفاده از یک آغازگر اختصاصی، باند اختصاصی مربوط به این باکتری و با استفاده از یک آغازگر عمومی، باند اختصاصی کل باکتری‌های دستگاه گوارش به دست آمد. سپس به کمک تکنیک دنسیتومتری، جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش تعیین شد. تجزیه و تحلیل نتایج نشان داد باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم ۴/۵۰ درصد کل باکتری‌های دوازدهه را شامل می‌شدند که این مقدار در ژوژنوم معادل ۴/۹۵ درصد برآورد شد. همچنین ۵/۱۷ درصد کل باکتری‌های موجود در ایلئوم را باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم تشکیل می‌دادند و نسبت جمعیت این باکتری‌ها در روده کور نیز معادل ۹/۳۶ درصد برآورد شد. جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور) نسبت به بخش‌های فوقانی روده باریک بیشتر بود. همچنین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در هر سه سن چهار، چهارده و سی روزگی، در روده کور بیش از سایر بخش‌های مورد بررسی (دوازدهه، ژوژنوم و ایلئوم) بود. نتایج، نشان دهنده متغیر بودن جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور است که با عملکرد، وظایف و محیط فیزیکوشیمیایی این بخش‌ها مرتبط است.

واژه‌های کلیدی: طیور، بیفیدوباکتریوم، فراوانی، دنسیتومتری، روده کوچک

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

برای بهبود عملکرد طیور، راه کارهای مختلفی شامل توجه به ژنتیک و اصلاح نژاد طیور، بهداشت و پیش گیری از بیماری ها، تغذیه بهینه و نظایر آن وجود دارد. فلور میکروبی دستگاه گوارش طیور هم تأثیر زیادی بر عملکرد آن دارد. علاوه بر نقش مهم برخی پاتوژن‌های مقیم دستگاه گوارش طیور در زمینه بروز بیماری در سطح گله، بخشی از فلور میکروبی می‌تواند به هضم مواد خوراکی کمک کرده و عملکرد طیور را بهبود بخشد. به همین دلیل سعی می‌شود جمعیت این نوع گروه های باکتریایی مفید را در دستگاه گوارش طیور افزایش دهند (Fujisawa ,et al.,1984). در این میان باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نقش مهمی در ممانعت از استقرار برخی پاتوژن‌ها در دستگاه گوارش طیور داشته و ضمن افزایش مقاومت طیور در برابر بیماری‌ها، سبب بهبود سیستم ایمنی و عملکرد آن ها می‌شوند (Jin ,et al.,1998). وظایف متعدد دیگری نیز از جمله تجزیه مواد مغذی، کمک به هضم مواد مغذی و نظایر آن برای این باکتری در دستگاه گوارش طیور گزارش شده است (Mountzouris et al.,2007).

طیف وسیع و متغیری از جمعیت‌های جنس بیفیدوباکتریوم در دستگاه گوارش طیور مشاهده شده است. امروزه در صنعت پرورش طیور به منظور دستیابی به بازده اقتصادی مطلوب، پرندگان در سیستم‌های پرورشی متراکم وگله‌های با جمعیت های زیاد ،نگهداری و پرورش داده می شوند. به همین جهت طیور تحت تاثیرعوامل گوناگون بوده و در معرض تنش قرار می گیرند که این عوامل مختلف، منجر به بروز اختلال در تعادل میکروفلور روده و در نتیجه تضعیف مکانیسم‌های دفاعی بدن شده و به‌این ترتیب، اجرام بیماری زا فرصت فعالیت پیدا می‌کنند (Mitsuoka ,2007). درچنین شرایطی اغلب به منظور مهار یا حذف اجرام زیان آور موجود در روده و همچنین جهت بهبود بازده غذایی وافزایش تولید، ازافزودنی‌های غذایی ضد میکروبی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که جهت بررسی میزان کارایی و عملکرد این نوع مواد هم باید روش مناسبی جهت تعیین جمعیت فلور میکروبی از جمله باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم پیدا نمود. هر گونه تلاشی که

Archive of SID

www.SID.ir

منجر به شناخت بیشتر این فلور میکروبی و تعیین جمعیت آن شود، می‌تواند مسیر دستکاری فلور میکروبی در جهت اهداف مورد نظر را تسهیل کند و سبب شود دستکاری فلور میکروبی با تغییر جیره‌ها با اطمینان و سرعت بالاتری انجام پذیرد. با دستیابی به شیوه نوینی در تعیین جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم دستگاه گوارش طیور در داخل کشور، می‌توان به راحتی عملکرد جیره‌های مختلف برای بهبود جمعیت این نوع فلور میکروبی مفید را آزمایش کرد و عملکرد طیور را افزایش داد. این امر با توجه به نقش مهم تغذیه در راندمان تولید طیور، اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Seidavi ,et al., 2008b).

یکی از مهمترین موانع در این مسیر، تعیین جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم است که با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی و سرولوژیکی، کاری بسیار پرزحمت، وقت‌گیر و پر هزینه است. در بسیاری موارد هم نتایج به دست آمده با این نوع روش‌های قدیمی، از اطمینان و اعتبار زیادی برخوردار نیست (Hooper,et al.,2001)به‌طوری‌که تخمین زده می‌شود تنها دوازده درصد گونه‌های باکتریایی تاکنون با استفاده از این نوع روش‌ها شناخته شده اند (Atlas,et al.,1994). بنابراین، دستیابی به یک تکنیک آزمایشگاهی سریع، دقیق و کم هزینه جهت رفع این مشکلات و معایب، گام بلندی در جهت بهبود سطح پژوهشی و اجرایی صنعت طیور خواهد بود.

امروزه روش‌های مولکولی برای بررسی باکتری‌ها نقش مهمی در شناخت وضعیت پراکنش باکتری‌ها از جمله باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در طیور دارند(et al.,2008, Seidavi). تکنیک های مبتنی بر ژنتیک مولکولی، امروزه مورد توجه زیادی قرار دارد. به دلیل دقت، کارایی و سرعت مناسبی که دستورالعمل‌های آزمایشگاهی ژنتیک مولکولی دارند، محققان و متخصصان سعی در به کارگیری این شیوه‌ها در فرایند تحقیقات خود دارند تا عملکرد این رشته را بهبود بخشند. امروزه روش‌های مولکولی جدیدی برای کمّی‌سازی داده‌های مربوط به شناسایی میکروارگانیسم‌ها توسعه یافته که تکنیک های دنسیتومتری و real time PCR از آن جمله اند (Tannock,et al.,2002). در چند سال اخیر، دنسیتومتری کاربرد زیادی در کمّی‌سازی داده‌های کروماتوگرافی لایه نازک پیدا کرده و جایگزین روش‌های قدیمی شده است

Archive of SID

www.SID.ir

(Poole ,et al.,2003). اخیراً هم et, (Srisom al.,2007) و همکاران (۲۰۰۷) کاربرد دنسیتومتری در اندازه‌گیری سولفات نئومایسین در داروهای انسانی گزارش شده است. لیکن هنوز گزارشی از تعیین جمعیت باکتریایی با استفاده از تکنیک دنسیتومتری منتشر نشده است.

این تحقیق به منظور تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی در سنین مختلف دوران پرورش آن ها طراحی و اجرا شد تا امکان تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم دستگاه گوارش طیور نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش طیور به روش دنسیتومتری بررسی و جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌های دستگاه در هر بخش و سن مشخص شود.

مواد و روش‌ها

جوجه‌های گوشتی مورد استفاده در این تحقیق طبق شرایط تجاری موجود در سطح واحدهای پرورش طیور ،نگهداری و پرورش داده شدند. تغذیه جوجه‌ها به صورت اختیاری و در حد اشتها بود. از طرح آزمایشی کاملاً تصادفی (CRD) با چهار تیمار (دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور) استفاده شد که هر تیمار مشتمل بر سه تکرار بود. جیره طیور بر اساس دستورالعمل راهنمای پرورش سویه راس و با نرم‌افزار جیره‌نویسی UFFDA تهیه و سایر شرایط پرورش نظیر دما، نور، واکسیناسیون، تراکم، تهویه، رطوبت، آبخوری‌ها، دان‌خوری‌ها، بستر و سایر مؤلفه‌های مدیریتی مطابق شرایط رایج در مرغداری‌های منطقه اعمال گردید. در هر یک از سنین چهار، چهارده و سی روزگی از دوران پرورش، تعداد بیست قطعه جوجه به‌روش قطع گردنی، کشتار و سپس پر و پوست آن ها 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 میکروتیوب های 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.

Archive of SID

www.SID.ir

نمونه‌های تهیه شده تا زمان استخراج در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

DNA محتویات دستگاه گوارش طیور بر اساس روش سیداوی و همکاران (Seidavi, et al.,2008) جداسازی و خالص‌سازی شد. DNA استخراج شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج شده ،از الکتروفورز استفاده شد. یک جفت آغازگر رفت و برگشت اختصاصی برای شناسایی کلیه باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم و نیز یک جفت آغازگر رفت و برگشت اختصاصی برای شناسایی کلیه باکتری‌های دستگاه گوارش جوجه‌ها انتخاب و تهیه شد.

یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌ها بهینه‌سازی شد. با توجه به این که حجم نهایی واکنش، ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد، ابتدا تعداد کل نمونه‌هایی که در هر مرحله PCR می‌شدند برآورد گردید.

جهت رؤیت محصولات PCR، از ژل آگارز ۱/۴ درصد با رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید استفاده شد. تانک الکتروفورز با آب مقطر، شسته و آبکشی شد و الکتروفورز آماده راه‌اندازی گردید. سینی شیشه‌ای داخل تانک هم به همین ترتیب با آب مقطر ،شسته و آبکشی و سپس خشک شد. اطراف سینی با نوار چسب عایق شد تا پس از ریختن ژل مذاب، از سینی به بیرون تراوش نکند. سینی روی سطحی تراز قرار داده شد و شانه به دقت روی سینی تعبیه گردید؛ به گونه‌ای که کمی با کف سینی فاصله داشته باشد. با توجه به این که در این تحقیق، ژل ۱/۴ درصد به‌کار رفت، برای تهیه هر ۲۰۰ سی سی ژل آگارز، مقدار ۲/۸ گرم آگارز توزین شد و سپس با ۲/۸ سی سی TAE 50X مخلوط شد و حجم آن با آب مقطر به ۲۰۰ سی سی رسانده شد. سپس در مایکروفر حرارت داده شد تا کاملا مخلوط و شفاف شوند و در ادامه از مایکروفر خارج شد تا کمی سرد شود. سپس ۷ میکرولیتر اتیدیوم بروماید به آن افزوده شد و اجازه داده شد ژل خنک تر شود. ژل روی سینی الکتروفورز ریخته شد. پس از سفت شدن ژل، چسب ها و شانه به دقت برداشته شده و ژل به تانک دستگاه الکتروفورز منتقل گردید. ژل بگونه‌ای در تانک الکتروفورز قرار داده شد که چاه کها به‌سمت قطب منفی قرار گیرند. با روشن کردن و تنظیم شدت جریان و ولتاژ دستگاه، الکتروفورز انجام

Archive of SID

www.SID.ir

شد. محصولات واکنش‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت الکتروفورز شدند و سپس زیر نور ماورای بنفش عکس‌برداری انجام گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gel Proc Analyzer انجام شد. برای انجام دنسیتومتری، از روش برومآژ و کاتاری و (Bromage and Kaattari, 2007) استفاده گردید. محاسبات شامل تعیین شدت باندهای اختصاصی برای شناسایی کل باکتری‌ها بود که توسط نرم‌افزار فوق و بر اساس مدل رگرسیون خطی با برون‌یابی محاسبه و برآورد جمعیت کل باکتری‌ها به دست آمد. علاوه بر این، شدت باندهای اختصاصی برای شناسایی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نیز توسط نرم‌افزار فوق بر اساس مدل رگرسیون خطی همراه با برون‌یابی محاسبه شد و سپس نسبت شدت باندهای اختصاصی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم به شدت باندهای اختصاصی کل باکتری‌ها به دست آمد تا جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها بر حسب درصد به دست آید و مشخص شود در هر یک از بخش‌های دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور و در هر سن، باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم چند درصد از کل باکتری‌های دستگاه گوارش طیور را شامل می‌شوند.

نتایج

با توجه به بهینه‌سازی یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم و یک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز دیگر برای شناسایی اختصاصی کلیه باکتری‌های موجود در دستگاه گوارش جوجه‌ها، استفاده از تکنیک دنسیتومتری توانست جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم 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 بیفیدوباکتریوم هستند. همچنین با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان بیان داشت استخراج DNA در این آزمایش، مقادیر بالایی از DNA ژنومی را حاصل کرد که کیفیت آن با الکتروفورز روی ژل آگارز ارزیابی و تایید گردید.

تکثیر قطعه‌ای به طول ۵۱۰ جفت باز از ژن 16S rDNA سبب شناسایی کلیه باکتری‌های

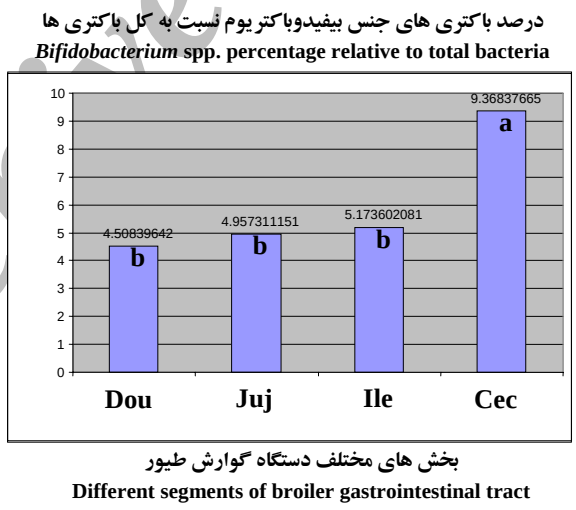
Archive of SID

www.SID.ir

جنس بیفیدوباکتریوم و بیان آن به صورت باندی اختصاصی شد که پس از الکتروفورز، تحت اشعه ماورای بنفش مرئی شدند. همچنین تکثیر قطعه‌ای به طول ۶۱۱ جفت باز 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 شدند. همچنین نتیجه دو واکنش زنجیره‌ای پلیمراز مجزا و مقایسه نتایج حاصل با Size Marker مناسب، تکثیر قطعات هدف را تأیید کرد.

۱- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها به تفکیک هر یک از بخش‌های دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور

تجزیه و تحلیل نتایج حاصل بر اساس خروجی‌های نرم‌افزار Gel Proc Analyzer و تعیین نسبت های مربوطه نشان داد جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم با رسیدن به بخش‌های تحتانی روده (ایلئوم و روده کور) نسبت به بخش‌های فوقانی روده باریک افزایش می‌یابد (شکل ۱).



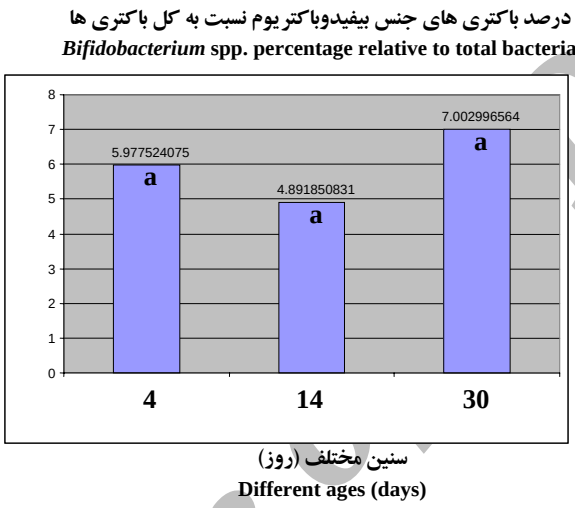
شکل ۱- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در هر یک از چهار بخش دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌ها (درصد)

Fig 1. *Bifidobacterium* spp. population relative to total bacteria in each four segments of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers (%)

Archive of SID
www.SID.ir

۲- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در سنین چهار، چهارده و سی روزگی

بر اساس یافته‌های این آزمایش مشخص شد در بین سنین مختلف (۴، ۱۴ و ۳۰ روزگی)، بیشترین و کمترین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم به‌ترتیب در سی و چهارده روزگی وجود داشت (شکل ۲).



شکل ۲- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در سنین مختلف (درصد)

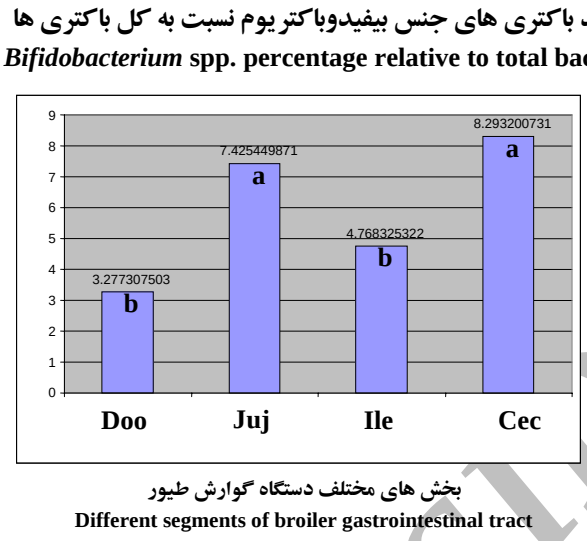
Fig 2. *Bifidobacterium* spp. population relative to total bacteria in different ages (%)

۳-جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار، چهارده و سی روزگی به تفکیک هر یک از بخش‌های دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور

با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در سنین چهار، چهارده و سی روزگی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی به دست آمد (شکل‌های ۵-۳). با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در هر سه سن چهار، چهارده و سی روزگی، در روده کور بیش از سایر بخش‌های مورد بررسی (دوازدهه، ژوژنوم و ایلئوم) بود (شکل‌های ۵-۳). همچنین بالاترین، و کمترین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم ، به ترتیب در روده کور جوجه‌های چهارده روزه

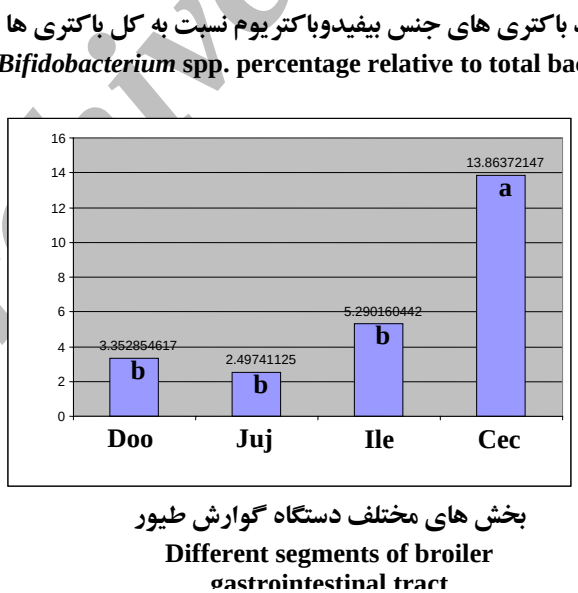
Archive of SID
www.SID.ir

(۱۳/۸۶ درصد) و ژوژنوم جوجه‌های چهارده روزه (۲/۴۹ درصد) به دست آمد (شکل ۴).



شکل ۳- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهار روزگی در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌ها (درصد)

Fig 3. *Bifidobacterium* spp. population relative to total bacteria at 4 day of ages in each four segments of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers (%)

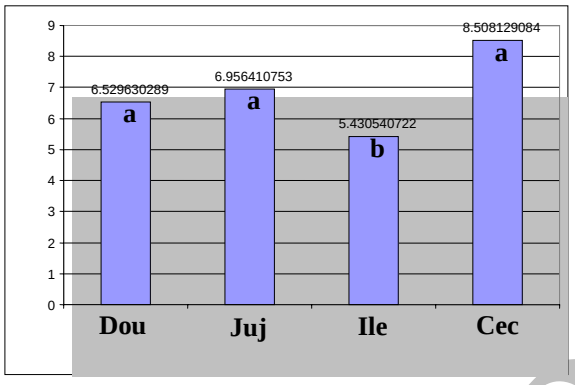


شکل ۴-جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در چهارده روزگی در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌ها (درصد)

Fig 4. *Bifidobacterium* spp. population relative to total bacteria at 14 day of ages in each four segments of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers (%)

Archive of SID
www.SID.ir

درصد باکتری های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری ها
***Bifidobacterium* spp. percentage relative to total bacteria**



بخش های مختلف دستگاه گوارش طیور
Different segments of broiler gastrointestinal tract

شکل ۵- جمعیت باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌ها در سی روزگی در دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌ها (درصد)

Fig 5. *Bifidobacterium* spp. population relative to total bacteria at 30 day of ages in each four segments of duodenum, jejunum, ileum and cecum of broilers (%)

بحث

در این زمینه، تکثیر ژن هدف در باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم توسط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز پیش از این توسط یاموتو و همکاران (Yamamoto,et al.,1992)گزارش شده است. با توجه به بررسی‌های انجام گرفته می‌توان گفت امکان شناسایی دقیق و سریع باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم با استفاده از قطعه خاصی از ژن 16S rDNA به طور کامل وجود دارد. همچنین ژو و همکاران (Zhu, et al.,2002) تنوع فلور میکروبی دستگاه گوارش طیور را تأیید کرده بودند. آن ها توانستند مجموعاً ۱۶۵۶ توالی نوکلئوتیدی با منشاء ژن‌های 16S rRNA از باکتری‌های موجود در محتویات و باکتری‌های چسبیده و یا فرو رفته در لایه مخاطی روده کور جوجه‌های گوشتی به دست آورند. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، درصد باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌های موجود در هر یک از چهار بخش دوازدهه، ژوژنوم، ایلئوم و روده کور جوجه‌های گوشتی را مشخص کرد. نتایج حاصل نشان‌دهنده متغیر بودن جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور است که با عملکرد و محیط فیزیکوشیمیایی این بخش‌ها

Archive of SID
www.SID.ir

مرتبط می‌باشد (Mountzouris ,et al.,2007) و با توجه به نقش مفید بیفیدوباکتریوم، علت دیگر می‌تواند وظایف و عملکرد مجزای هر بخش دستگاه گوارش، در هضم و جذب مواد مغذی باشد. اما باید توجه نمود که جمعیت مطلق و نسبی هر باکتری در دستگاه گوارش تابع عوامل بسیار متنوعی نظیر نوع جیره، فراوری جیره، افزودنی‌های جیره (نظیر پروبیوتیک ها، آنتی‌بیوتیک ها، آنزیم ها و نظایر آن)، سن پرنده، محیط فیزیکوشیمیایی دستگاه گوارش، محیط زندگی پرنده، و به ویژه جمعیت سایر باکتری‌های دستگاه گوارش (اثرات متقابل اجزای فلور میکروبی بر هم) است (et, Knarreborg al.,2002). 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 دنسیتومتری در تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش طیور بود.

هرچند پیش از این، گزارش‌هایی درباره باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم در دستگاه گوارش طیور منتشر شده بود (Rada ,et al.,2001)؛ لیکن این محققان، جمعیت باکتری‌ها را با استفاده از روش‌های دیگر، به ویژه روش‌های مبتنی بر کشت میکروبی، برآورد و گزارش کرده بودند که معایب چنین روش‌هایی (دقت پایین، سرعت کم، هزینه بالا، نیاز به نیروی کار زیاد و ماهر، تکرارپذیری پایین، ناشناخته ماندن یا مشابه بودن احتیاجات رشد بسیاری از باکتری‌ها و غیره) پیش از این مشخص و گزارش شده است (et al.,2001, Hooper). پیش از این هم نتایج مشابهی توسط پژوهشگران دیگر درباره کارایی تکنیک دنسیتومتری در کمّی سازی نتایج باندهای ژل آگارز و اکریلامید بیان شده است. اولین بار،انزمان و همکاران Enzmann (etal.,1999) بیان داشتند تکنیک دنسیتومتری در محاسبه کمّیت DNA میتوکندریایی، کارایی و دقت بهتری نسبت به روش اسپکتروفتومتری دارد. ژانگ و همکاران (Zhang ,et al.,2007) برای نخستین بار میزان پروتئین‌های ایمنوگلوبین ، آلبومین سرم گاوی، کازئین، بتا لاکتوگلوبولین و لاکتاآلبومین محصولات لبنی را با استفاده از تکنیک دنسیتومتری گزارش کردند و مزیت این تکنیک

www.SID.ir

نسبت به شیوه‌های مرسوم دیگر را تأیید نمودند. اخیراً (and Bromage et al.,2007 Kaattari) هم نتایج مشابهی درباره کارایی تکنیک دنسیتومتری برای تعیین غلظت نسبی پروتئین‌های هدف بیان شده که صحت و دقت نتایج مبتنی بر دنسیتومتری را تأیید می‌کند. هرچند تاکنون تعیین جمعیت نسبی باکتری‌ها با استفاده از این شیوه گزارش نشده است.

از مزایای روش به کار رفته در این تحقیق، سهولت کاربرد، سرعت بالا، دقت بالا، تکرارپذیری زیاد و هزینه نسبتاً پایین آن است. یکی از نکاتی که باید در انجام آزمون دنسیتومتری به آن توجه نمود، این است که واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در این روش برای تعیین تعداد نسخه‌های دی.ان.اِی هدف به کار می‌رود. لذا برای معتبر بودن داده‌های حاصل لازم است کنترل‌های داخلی وجود داشته باشد که دستیابی به این کنترل‌ها در برخی موارد مشکل است و همچنین باید برای هر ریزسازوارهٔ خاص، یک کنترل مجزا طراحی شود. در غیر این‌صورت نمی‌توان به تنهایی از تراکم باند برای تعیین کمّی محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استفاده کرد. همچنین گاهی اوقات مقدار دی.ان.اِی هدف، متناسب با دی.ان.اِی تکثیر شده نیست؛ به‌طوری‌که معمولاً هزار نسخه از یک دی.ان.اِی هدف، تا صدهزار نسخه محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ایجاد می‌کند. همچنین همواره همهٔ دی.ان.اِهای هدف با کارآیی یکسانی تکثیر نمی‌شوند. در واقع یک دی.ان.اِی هدف وقتی در یک نمونه وجود داشته باشد، نسبت به وقتی که در نمونه دیگری وجود دارد، همیشه همان میزان محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز را تولید نمی‌کند. بر این اساس باید همه نکات فوق در انجام آزمایش به دقت مورد توجه قرار گیرد تا نتایج دقیقی به‌دست آید. همچنین استفاده از سیستم‌های تصویربرداری پیشرفته لیزر دنسیتومتر، دوربین‌های کالیبره شده و سیستم بسیار جدید LiCor Odyssey و نیز رقیق‌سازی نمونه، عواملی هستند که سبب می‌شوند دقت نتایج کمّی‌سازی، افزایش یافته و میزان خطای آن به کمتر از ±۱ درصد برسد (Kaattari and Bromage ,et al.,2007، ۲۰۰۷). یکی از محدودیت های این روش، در مورد کاربرد ژل‌های اکریلامید کمتر از ۵ درصد است که به دلیل زمینه غیریکنواخت و پررنگ آن، دقت نتایج تکنیک دنسیتومتری کاهش می‌یابد. به همین دلیل در این آزمایش، از ژل آگارز ۱/۴ درصد استفاده شد.

www.SID.ir

بنابراین ،شیوه دنسیتومتری مبتنی بر نتایج PCR را می‌توان روشی سودمند و آسان برای تعیین جمعیت نسبی باکتری‌های جنس بیفیدوباکتریوم نسبت به کل باکتری‌های دستگاه گوارش طیور دانست که لازم است با دقت زیاد به جزئیات کاربرد آن، جایگزین روش‌های سنتی نظیر کشت میکروبی شود. پیشنهاد می‌شود در آینده جمعیت نسبی سایر باکتری‌های مهم دستگاه گوارش طیور، به‌ویژه باکتری‌های مضر شامل سالمونلا، کلستریدیوم، و اشریشیا کلی نیز با استفاده از شیوه دنسیتومتری تعیین و به تدریج این روش جایگزین شیوه‌های مبتنی بر کشت میکروبی یا سرولوژیکی شود.

سپاسگزاری

این مقاله بر اساس نتایج طرح پژوهشی "بررسی امکان تعیین جمعیت فلور میکروبی دستگاه گوارش طیور به روش دنسیتومتری" تهیه شده است که در دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت اجرا گردید. بدین‌وسیله از مسؤولین محترم این دانشگاه برای حمایت و تأمین هزینه‌های طرح ،سپاسگزاری و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

1. Atlas, R.M. 1994. Diversity of microbial communities. In: Advances in Microbial Ecology (Marshall, K.C., Ed.) Plenum Press, New York, N.Y., pp.1-47.
2. Bromage, E.S., and S.L. Kaattari. 2007. Simultaneous quantitative analysis of multiple protein species within a single sample using standard scanning densitometry. J. Immunol. Methods. 323: 109-113.
3. Enzmann, H., C. Wiemann H.J. Ahr, and G. Schluter. 1999. Damage to mitochondrial DNA induced by the quinolone Bay y 3118 in embryonic turkey liver. Mutation Res. 425: 213-224.
4. Fujisawa, T, S. Shirasaka, J. Watabe and T. Mitsuoka. 1984. *Lactobacillus aviarius* sp. Nov.: a new species isolated from the intestine of chickens. Syst. Appl. Microbio1. 5: 414-420.

Archive of SID

www.SID.ir

5. Hooper, L.V., M.H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P.G. Falk and J.I. Gordon. 2001. Molecular analysis of commensally host-microbial relationships in the intestine. Science. 291: 881-884.
6. Jin, L.Z., Y.W. Ho, N. Abdullah, M.A. Ali and S. Jalaludin. 1998. Effect of adherent Lactobacillus cultures on growth, weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. Anim. Feed Sci. Techno1. 70: 197-209.
7. Knarreborg, A., M.A. Simon, R.M. Engberg, B.B. Jensen and G.W. Tannock. 2002. Effect of dietary fat source and subtherapeutic levels of antibiotic on the bacterial community in the ileum of broiler chickens at various ages. App1. Environ. Microbio1. 68: 5918-5924.
8. Mitsuoka, T. 2002. Research in intestinal flora and functional foods. Jpn. J. Intest. Microbio1. 15: 57-89.
9. Mountzouris, K.C., P. Tsirtsikos, E. Kalamara, S.G. Nitsch, G. Schatzmayr, and K. Fegeros. 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* strains in promoting broiler performance and modulating cecal microflora composition and metabolic activities. Poult. Sci. 86: 309-317.
10. Poole, C.F. 2003. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. J. Chromatography. 1000: 963-984
11. Rada, V., D. Duskova, M. Maarounek, and J. Petr. 2001. Enrichment of bifidabacteria in the hen ceaca by ietary inulin. Folia Microbiol. 46: 73-75.
12. Seidavi, A.R., S.Z. Mirhosseini, M. Shivazad, M. Chamani, and A.A. Sadeghi. 2008a. Optimizing multiplex polymerase chain reaction method for specific, sensitive and rapid detection of *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* sp. in chick gastrointestinal tract. Asian J. Anim. Vet. Advances. 3(4): 230-235.
13. Seidavi, A.R., S.Z. Mirhosseini, M. Shivazad, M. Chamani, and A.A. Sadeghi. 2008b. the development and evaluation of a duplex PCR detection of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp. in duodenum, jejunum,

Archive of SID
www.SID.ir

ileum and cecum of broilers. J. Rapid Methods Automation. Microbiol. 16(1): 107-119.

14. Srisom, P., B. Liawruangrath., S. Liawruangrath., J.M. Slater, and S. Wangkarn. 2007. Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection. Simultaneous determination of neomycin sulfate and polymyxin B sulfate by capillary electrophoresis with indirect UV detection. J. Pharma. Biomed. Anal. 43: 1013-1018.
15. Tannock, G.W. 2002. Molecular methods for exploring the intestinal ecosystem. Br. J. Nutr. 87 Suppl 2: S199-S201.
16. Yamamoto, T., M. Morotomi and R. Tanaka. 1992. Species-specific oligonucleotide probes for five *Bifidobacterium* species detected in human intestinal microflora. Appl. Environ. Microbiol. 58: 4076-4079.
17. Zhang, H., J. Xu, J. Wang, M. Menghebilige, T. Sun, H. Li, and M. Guo. 2007. A survey on chemical and microbiological composition of kurut, naturally fermented yak milk from Qinghai in China. Food Control (2007), doi:10.1016/j.foodcont.2007.06.010.
18. Zhu, X.Y., T.Z. Yoga Pandya and R.D. Joerger. 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. Appl. Environ. Microbiol. 68: 124-137.

Archive of SID

www.SID.ir