

VARIABILITE INTER-INDIVIDUELLE DE LA FLORE DIGESTIVE DU POULET DE CHAIR ANALYSEE PAR EMPREINTE MOLECULAIRE : CONSEQUENCES POUR L'ETUDE DE L'EFFET DE SES FACTEURS DE VARIATION

**Guardia Sarah¹, Recoquillay François², Juin Hervé³, Lessire Michel¹, Leconte Maryse¹,
Rideaud Patricia³, Moreau-Vauzelle Carole³, Dupont Christel³, Guillot Jean François⁴,
Gabriel Irène¹**

¹INRA - UR 83, Unité de Recherches Avicoles 37380 NOUZILLY,
²PHYTOSYNTHESE - 57, avenue Jean Jaures, Z.I. de Mozac Volvic, BP 50100 - 63203
RIOM, ³INRA – UE 1206 Unité d'Elevage Alternatif et Santé des Monogastriques- 17700
SURGERES, ⁴I.U.T DE TOURS - Laboratoire de microbiologie - 29 rue du Pont-Volant -
37082 TOURS

RÉSUMÉ

Depuis l'interdiction des antibiotiques facteurs de croissance qui permettaient de contrôler la flore digestive, d'autres moyens doivent être utilisés. Différentes alternatives sont proposées. Pour connaître leurs effets sur la flore, il est nécessaire de mieux la connaître, ainsi que sa variabilité inter-individuelle pour ne pas la confondre avec l'effet des alternatives. Pour s'affranchir de cette variabilité, une approche couramment utilisée consiste à regrouper un nombre suffisamment important d'échantillons individuels considérés comme représentatifs de leur population. Pour savoir si cette approche est satisfaisante, nous avons analysé au cours de ce travail, la variabilité inter-individuelle de la flore digestive du poulet de chair pour des regroupements de prélèvements de 5, 10, 15 ou 20 animaux. Les échantillons ont été prélevés le long du tractus digestif (jabot, iléon, caeca) à différents âges (8-9j, 22-23j et 43-44j), à la fois au niveau des contenus digestifs et au niveau de la muqueuse. Cette flore a été étudiée par une méthode d'empreinte moléculaire sur gel, l'électrophorèse en gradient de température dans le temps. Les similarités entre profils bactériens ont été déterminées à l'aide du coefficient de Pearson.

Pour les contenus digestifs comme pour les muqueuses, quelque soit l'âge ou le segment digestif, les profils montrent des différences et les similarités entre les pools peuvent être particulièrement faibles. Ainsi, pour des pools de 20 animaux, les coefficients de Pearson sont compris entre 39% et 97,5%, c'est-à-dire inférieurs au coefficient de similarité positive (98%) à partir duquel 2 échantillons peuvent être considérés comme similaires. La flore ne peut donc pas être représentée par un pool d'échantillons provenant d'un nombre raisonnable d'individus. Plusieurs pools doivent donc être utilisés pour représenter une situation donnée dans le but d'étudier les facteurs de variation de la flore digestive.

ABSTRACT

Since the banning of antibiotic growth promotants that allowed controlling the digestive microflora, other means must be used. Various alternatives are proposed. In order to know their effects on flora, it is necessary to know it, as well as its inter-individual variability, in order not to confuse it with effects of alternatives. In order to be free oneself from this variability, it is commonly use to pool samples from various individuals with the hypothesis that the pooled sample will be representative of the population. In order to know if this approach is satisfying, we studied inter-individual variability of digestive microflora of broiler chickens for pooled samples from 5, 10, 15 or 20 individuals. Samples were taken from digestive contents and mucosa of crop, ileum and caeca of 8-9d, 22-23d and 43-44d old broilers. Digestive microflora was studied by a molecular fingerprint method on gel: Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis. Similarities between fingerprints were determined with Pearson coefficient.

Molecular fingerprint analyses of all digestive contents or mucosa associated microflora showed high inter-pool variability. Similarity between pooled samples from 20 individuals varied between 39% and 97.5%, that is inferior to positive similarity coefficient (98%) from which two samples can be considered as similar. These results show that a pool of a moderate number of individual samples can not be representative of a population. In conclusion, in order to study factors affecting digestive microflora, for each status, several pooled samples must be used.

INTRODUCTION

De nombreuses alternatives aux antibiotiques facteurs de croissance (AFC) telles que des acides organiques, des probiotiques, prébiotiques et extraits végétaux sont couramment utilisées dans l'objectif de modifier la flore digestive des animaux d'élevage afin d'optimiser leurs performances de croissance (Patterson et Burkholder, 2003; Franco et al, 2006; Biggs et Parsons, 2008; Windisch et al., 2008). Cette flore digestive présente une forte variabilité inter-individuelle (Knarreborg et al, 2002; Zhu et al., 2002; Gabriel et al., 2007) ce qui rend difficile les études visant à étudier ses modifications. L'une des approches utilisées pour s'affranchir de la variabilité individuelle consiste à utiliser plusieurs pools provenant d'un nombre restreint d'individus (3 à 6), ce qui entraîne une multiplication du nombre d'analyses et l'utilisation de nombreux individus (Pissavin et al, 2006; Johansen et al, 2007; Gabriel et al, 2008). Une autre approche, moins coûteuse, consiste à regrouper des échantillons individuels afin d'obtenir un échantillon représentatif d'une situation donnée, le nombre d'individus utilisés pouvant varier de 5 à 36 (Massias et al., 2006; Zhou et al 2007; Gabriel et al, 2008; Thompson et al, 2008). Pour déterminer quelle approche peut être utilisée pour analyser la flore aux différents niveaux du tube digestif des oiseaux, nous avons au cours de ce travail, étudié la variabilité inter-individuelle de celle-ci. Pour cela, nous nous sommes intéressés à la flore des trois segments digestifs les plus importants chez les volailles (jabot, iléon pour l'intestin grêle, et caeca), aussi bien celle des contenus digestifs qui est la plus couramment étudiée, que celle des muqueuses en contact direct avec l'animal, et ce, en fonction de l'âge des animaux. Notre objectif était de déterminer si l'approche de l'étude de la flore par regroupement représentatif d'un nombre raisonnable d'échantillons individuels peut être satisfaisante. Pour étudier la flore digestive, nous avons utilisé une méthode indépendante de la culture, c'est-à-dire une approche moléculaire, et plus précisément une méthode d'empreinte moléculaire sur gel, l'électrophorèse en gradient de température dans le temps (Temporal Temperature gradient Gel Electrophoresis : TTGE).

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux : élevage et prélèvements

Les animaux utilisés sont des poulets de chair mâles (Ross PM3 blanc). A leur arrivée à 1j, 480 poussins sont répartis dans 16 parquets à raison de 12 animaux/m² soit 30 animaux par case. Durant la période d'étude les animaux reçoivent un programme alimentaire en 4 phases : démarrage (1-10j), croissance (10-24j), finition (24-36j) et retrait (36-44j). Les aliments sont composés principalement de blé, de soja, de maïs et contiennent des acides aminés

de synthèse (Lys, Met), des vitamines et oligoéléments. L'anticoccidien utilisé jusqu'à 36j (diclazuril, Clinacox[®] 200 ppm) n'a pas d'effet antibactérien. Les aliments sont présentés sous forme de granulés.

Des prélèvements sont effectués à 8-9j, et 22j-23j, dans 8 des 16 parquets choisis aléatoirement (5 poulets/parquet), ainsi qu'à 43-44j dans les 8 parquets restants. Pour homogénéiser le niveau de remplissage du tractus digestif des animaux entre chaque parquet, les animaux sont abattus après avoir subi un jeûne d'au moins 3h suivi d'un temps d'alimentation similaire entre animaux (entre 3 h et 4 h 30 en fonction du rang d'abattage au sein du parquet). De plus, les animaux prélevés sont choisis en fonction de leur poids vif (non à jeun) déterminé la veille des prélèvements, ce poids étant proche de la moyenne de poids de l'ensemble des animaux de leur parquet.

1.2. Prélèvements et échantillonnages

Les animaux sont abattus par inhalation de CO₂. Immédiatement après, le jabot, la moitié distale de l'iléon et les caeca sont prélevés avec du matériel chirurgical stérile. Les contenus digestifs de chaque segment digestif sont vidés par très légère pression manuelle sur les tissus. Les échantillons des 5 animaux provenant d'un même parquet sont regroupés et conservés à -70°C jusqu'à extraction ultérieure de l'ADN bactérien. Les bactéries des muqueuses sont ensuite obtenues d'après la méthode de Gong et al. (2002). Une fois les contenus digestifs prélevés, les organes sont ouverts longitudinalement puis lavés dans du sérum physiologique stérile (NaCl 9g/l) pour éliminer les résidus de contenu digestif (3 fois). Les bactéries sont alors séparées de la muqueuse digestive par rupture des liaisons bactérie - muqueuse par agitation vigoureuse dans du sérum physiologique stérile contenant un détergent (tween 80, 0.1%, v/v) (2 fois). Ces 2 derniers lavages des 5 animaux du même parquet sont regroupés et conservés à -20°C. Le lendemain, après décongélation, ils sont centrifugés une première fois 20 min à 27 000 g à 4°C, puis après élimination du surnageant le culot est à nouveau centrifugés 40 min à 17 000 g à 4°C. Le culot contenant les bactéries des muqueuses est conservé à -70°C jusqu'à l'extraction de l'ADN.

1.3. Analyse de la flore digestive

Formation des pools : De façon à pouvoir étudier la variabilité inter-pool pour des pools de tailles différentes, l'ADN bactérien est extrait à partir de 4 pools d'échantillons prélevés sur 5, 10, 15 ou 20 animaux. Les pools de 10, 15 et 20 animaux sont formés en regroupant les prélèvements de pools de 5 animaux issus de 2 parquets différents.

Extraction de l'ADN bactérien : Elle est effectuée avec le kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Li et al., 2003) (Qiagen S.A., Courtaboeuf) selon le protocole défini par le fournisseur auquel une étape avec du lysozyme est ajoutée pour améliorer l'extraction de

l'ADN en particulier des bactéries à Gram positif (Johansen et al, 2007). De plus pour les échantillons de faibles concentrations, 2 passages sur colonne QIAamp spin, utilisée lors de l'étape de purification de l'ADN, sont réalisées.

Amplification de l'ADNr 16S : Afin de visualiser l'ensemble des bactéries majoritaires, la région variable V6-V8 de l'ADNr 16S bactérien est amplifiée par PCR en utilisant des amorces ciblant le domaine Bacteria (Bact 968-GC-f et Bact 1401-r) (Nübel et al., 1996), et déjà utilisées pour l'analyse de la diversité de la flore digestive du poulet (van der Wielen et al., 2002; Zhu et al., 2002). Les produits de PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium pour contrôler leur taille (433 pb) et leur concentration.

Electrophorèse en gradient dénaturant de température (TTGE) : Les produits obtenus par PCR sont séparés par TTGE en utilisant un Dcode Universal Mutation Detection System (Biorad, France) (Gabriel et al., 2007). Dans un premier temps, un gel a été réalisé en déposant les produits de PCR provenant des contenus digestifs de l'iléon des 4 pools issus de 5, 10 et 15 animaux. Ensuite les pools issus de 15 animaux ont été comparés pour les contenus digestifs du jabot, de l'iléon, et des caeca. Enfin, les autres gels ont été réalisés en déposant l'ADN des pools de 20 animaux pour chaque type de flore (contenus digestifs ou muqueuse) et type de segment digestif (jabot, iléon ou caeca) et prélevés à 3 âges différents (8-9j, 22-23j, 43-44j).

Sur chaque gel, sont déposés 12 échantillons et 3 pistes sont utilisées pour un marqueur de migration. Celui-ci contient 8 ADN de clones issus de bactéries présentes dans les fèces humaines (Suau et al, 1999).

1.4. Détermination de la similarité

Les profils de TTGE obtenus sur un même gel, sont comparés en utilisant le logiciel Fingerprint II (Biorad, France). Le marqueur de migration est utilisé pour normaliser les profils. Les pourcentages de similarité entre les pistes sont calculés en tenant compte de la position et de l'intensité des bandes en utilisant la méthode des corrélations de Pearson.

Les analyses statistiques sont effectuées à l'aide du logiciel StatView® (Abacus concepts, Berkeley, CA, USA). Le test de Student-Newman-Keuls ($p \leq 0,05$) est utilisé pour comparer la similarité des différents types d'échantillons déposés sur un même gel. Ainsi, on compare entre chaque type d'échantillon les coefficients de similarité calculés pour chaque paire de profils des 4 pools d'un même type (même localisation de prélèvement, même âge, même nombre d'individus prélevés).

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un seuil de similarité positive tenant compte des

variations liées à l'extraction de l'ADN, son amplification et le dépôt sur le gel a été déterminé. Il est de 98%.

La comparaison, sur un premier gel, des pools d'échantillons provenant de contenus d'iléon de 5, 10 ou 15 animaux âgés de 22-23j montre des similarités inférieures au seuil de similarité positive. L'augmentation de la taille du pool de 5 à 15 animaux entraîne une augmentation significative de la similarité inter-pool (Tableau 1). La similarité entre les 4 pools de 15 animaux atteint 97% (Tableau 1), valeur très proche du seuil de similarité positive.

Tableau 1: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de contenus digestifs d'iléons de 5, 10 ou 15 animaux âgés de 22-23j (n=4)

	Taille de pool			ESM ¹	Valeur de P
	5 animaux	10 animaux	15 animaux		
Contenu d'iléon (22-23j)	90,7 ^b	92,2 ^{ab}	97,0 ^a	1,61	*

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

(a-b) les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement ($P < 0,05$)

* : $P \leq 0,05$

La comparaison, sur un second gel, de similarité inter-pools de 15 animaux entre les contenus digestifs du jabot, de l'iléon et des caeca à 22-23j montre une différence entre segments digestifs (Tableau 2).

Tableau 2: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de contenus digestifs de 15 animaux âgés de 22-23j (n=4)

	Segment digestif			ESM ¹	Valeur de P
	Jabot	Iléon	Caeca		
Pool de 15 animaux (22-23j)	70,0 ^b	96,8 ^a	87,4 ^a	4,65	**

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

(a-b) les moyennes suivies de lettres différentes diffèrent significativement ($P < 0,05$)

** : $P < 0,01$

La similarité inter-pool est significativement plus faible dans le jabot (70%) par rapport à l'iléon (97%) et aux caeca (87%) (Tableau 2). Les similarités (Pearson) obtenues pour les pools de 15 sont comparables à celles obtenues par Zhou et al. (2007), de 86% et 94% pour l'iléon et les caeca respectivement. Alors que dans le cas de l'iléon, la similarité est proche du seuil de similarité positive (98%), comme observé précédemment (Tableau 1), dans le cas du jabot et des caeca, la similarité est beaucoup plus éloignée. L'analyse a donc été poursuivie avec des pools de 20 animaux pour tous les types de flore étudiés.

Les similarités inter-pool de 20 animaux varient entre 45% et 96 %, pour les contenus digestifs, et entre 39% et 97,5%, pour les muqueuses (Tableau 3).

Tableau 3: Similarité (coefficient de Pearson) entre pools d'échantillons provenant de 20 animaux en fonction de l'âge (n=4)

		Age			ESM ¹	Valeur de P
		8-9j	22-23j	43-44j		
Cont.	Jabot	84,1	92,3	75,9	4,42	NS
	Iléon	45,3 ^b	89,9 ^a	78,8 ^a	10,16	*
	Caeca	87,9 ^b	93,7 ^a	96,2 ^a	1,36	**
Muq.	Jabot	82,8 ^b	93,8 ^{ab}	97,5 ^a	3,86	*
	Iléon	38,9 ^b	92,6 ^a	71,9 ^a	8,49	**
	Caeca	95,5	96,8	95,7	0,50	NS

¹ ESM : Erreur standard de la moyenne

Les résultats comparés sur une même ligne proviennent d'un même gel TTGE

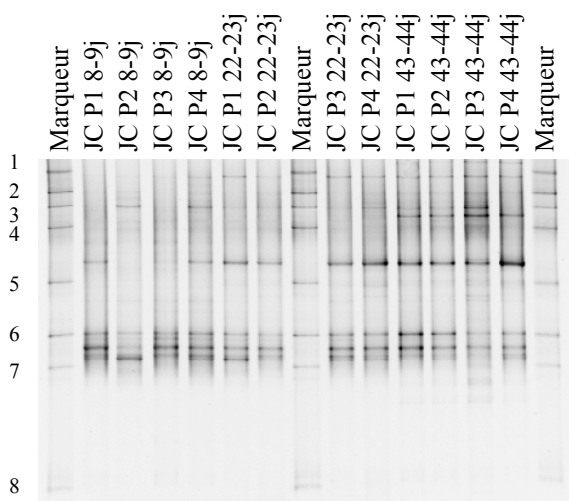
(a-b) les moyennes dans la même ligne suivies de lettres différentes diffèrent significativement (P<0,05)

NS : P>0,05 ; * : P≤0,05, ** : P<0,01

Cont : contenu, Muq : muqueuse

Dans la plupart des cas, la similarité inter-pool de 20 animaux est bien inférieure au seuil de similarité positive de 98%. Ces différences entre profils sont dues à la fois à l'existence de bandes spécifiques à un ou plusieurs pools, et à des variations d'intensité de bandes entre les pools. C'est ce qui est illustré dans le cas du contenu du jabot (Figure 1).

Figure 1 : Profil d'ADN (TTGE) de la flore du contenu du jabot (pools de 20 animaux)



Marqueur : profil du marqueur de migration

JCP1-JCP4: profils des pools 1 à 4 d'échantillons de contenus (C) digestifs de jabot (J) d'animaux de 8-9j, 22-23j ou 43-44j.

Cependant les valeurs mesurées pour la muqueuse du jabot d'animaux de 43j (97,5%), et pour les caeca, au niveau du contenu pour les animaux de 43j (96%), et de leur muqueuse quelque soit l'âge des animaux considérés (95,5%-97%), sont très proches du seuil de similarité positive (Tableau 3).

Aussi bien dans le cas des contenus digestifs, que des muqueuses, on observe dans certains segments

digestifs, une augmentation de la similarité inter-pool. Ainsi dans le cas du jabot, on observe pour les échantillons de muqueuse une augmentation significative de la similarité inter-pool à 43j par rapport à 8j. Au niveau de l'iléon, on observe une augmentation à la fois au niveau de son contenu et de sa muqueuse à partir de 22-23j. Au niveau de la muqueuse des caeca, la similarité inter-pool étant déjà très élevée à 8-9j, on observe une augmentation de similarité à partir de 22-23j uniquement au niveau du contenu.

La faible similarité inter-individuelle de la flore digestive chez le jeune animal pourrait être due à une forte influence de la génétique de l'individu comme le montre la plus forte similarité de flore entre enfants jumeaux homozygotes que celle entre jumeaux dizygotes ou enfants non apparentés (Stewart et al, 2005). Par la suite, des facteurs extérieurs à l'animal, tels que l'alimentation ou l'environnement d'élevage (Gabriel et al, 2006), pourraient avoir un rôle prépondérant dans la composition de la flore.

Dans le cas des contenus digestifs, les valeurs que nous observons sont supérieures à celles rapportées dans la littérature. Ainsi, van der Wielen et al (2002) rapportent un coefficient de Pearson proche de 50% quelque soit le segment digestif, du jabot au caeca, et l'âge des animaux de 4 à 39j. De leur côté, Hume et al (2006) observent des coefficients de Pearson de 67 et 86% pour l'iléon et les caeca respectivement. Ces faibles valeurs pourraient s'expliquer en partie par le faible nombre d'animaux utilisés dans ces études pour chaque traitement (3 et 6 animaux respectivement).

Dans notre travail, nous avons en plus de la flore des contenus digestifs des trois principaux sites de présence de la flore chez le poulet, étudié la flore digestive des muqueuses. Celle-ci, bien que moins étudiée que celle des contenus digestifs, a fait l'objet de plusieurs travaux dès le début des études sur la flore digestive des oiseaux (Fuller et Turvey, 1971). Cependant, chez ces derniers animaux, seules quelques études utilisant des approches moléculaires ont été réalisées (Gong et al., 2002; Collado et Sanz, 2007; Gong et al., 2007; Thompson et al., 2008). Seule l'étude réalisée par Thompson et al. (2008) sur la muqueuse iléale d'animaux nous donne une indication sur la variabilité inter-individuelle. Ces auteurs trouvent un coefficient de similarité de Dice de 52,5% pour des animaux de 42j. Cette plus faible valeur s'explique probablement par une comparaison de flore individuelle (6 animaux), et non pas de pools d'individus.

L'étude de la variabilité inter-pool de 20 animaux de la flore des contenus digestifs et des muqueuses du jabot, de l'iléon et des caeca montre que celle-ci demeure importante, particulièrement chez les jeunes animaux. Dans les conditions de cette étude, réalisée pour limiter au maximum la variabilité inter-individuelle de la flore digestive, nous ne pouvons donc pas conclure qu'il est possible de s'affranchir de

cette variabilité en regroupant des échantillons provenant d'un nombre raisonnable d'animaux (5 à 20). La meilleure approche pour s'affranchir de cette variabilité semble donc de regrouper des échantillons provenant d'un petit nombre d'individus tout en conservant une visualisation de cette variabilité en utilisant plusieurs pools. L'âge des animaux étudiés doit être pris en compte pour le choix du nombre de pools à comparer. Une modification de la flore entre traitements peut alors être mise en évidence lorsque les empreintes moléculaires montrent des différences globales observables par exemple après analyse par classification ascendante hiérarchique représentée par un dendrogramme (Pissavin et al., 2006 ; Johansen et al., 2007) ou par analyse en composante principale (Gérard et al., 2008). Une différence peut aussi être détectée si ces empreintes montrent l'apparition ou la disparition, et/ou la modification de l'intensité d'une ou plusieurs bandes entre les différents pools des différents traitements étudiés (Knarreborg et al.,

2002 ; Gabriel et al., 2008). Ces différences peuvent alors être quantifiées par des méthodes telles que la fluorescence *in situ* (FISH) ou la PCR en temps réel.

CONCLUSION

La variabilité inter-individuelle de la flore digestive du poulet est importante, tout particulièrement chez le jeune animal âgé d'une semaine. Le regroupement d'échantillons provenant d'un nombre d'individus compris entre 5 et 20 ne permet pas d'obtenir une flore représentative d'une situation donnée. En effet, si on compare des échantillons de flore provenant de regroupements de 20 individus, on observe une variabilité inter-pool non négligeable. Pour pouvoir étudier les modifications de la flore liées à des facteurs extérieurs comme des alternatives aux AFC, il faut donc tenir compte de cette variabilité. Plusieurs pools doivent donc être utilisés pour représenter une situation donnée.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Biggs, P., Parsons, C.M., 2008. Poul. Sci.(87), 2581-2589.
- Collado, M.C., Sanz, Y. 2007. J. Food Prot., (70), 2799-2804.
- Franco, R.M., Oliveira, L.A.T.d., Carvalho, J.C.A.d.P., 2006. Higi.Alim. (20), 22-33.
- Fuller, R., Turvey, A., 1971. J Appl Bacteriol, (34), 617-622.
- Gabriel, I., Leconte, M., Guillon, J., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C. 2007.16th European Symposium on Poultry Nutrition, Strasbourg, France.
- Gabriel, I., Pissavin, C., Williams, J., Mallet, S., Beven, V., Burel, C., Leconte, M., Rideaud, P., Moreau-Vauzelle, C., Dupont, C., Fravalo, P., Lessire, M., 2008. 6th INRA-RRI Symposium on Gut Microbiome, Clermont-Ferrand, France, pp. 81-82
- Gerard, P., Brezillon, C., Quere, F., Salmon, A., Rabot, S., 2008. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology (14), 115-122.
- Gong J., Forster, R.J., Yu, H., Chambers, J.R., Sabour, P.M., Wheatcroft, R., Chen, S. 2002. FEMS Microbiol. Lett., (208), 1-7.
- Gong, J., Si, W., Forster, R.J., Huang, R., Yu, H., Yin, Y., Yang, C., Han, Y. 2007. FEMS Microbiol. Ecol., (59), 147-157.
- Hume, M.E., Clemente-Hernandez, S., Oviedo-Rondon, E.O., 2006. Poult. Sci. (85), 2106-2111.
- Johansen, C.H., Bjerrum, L., Pedersen, K., 2007. Acta Vet. Scand. (49), 30 Journal Open access.
- Knarreborg, A., Simon, M.A., Engberg, R.M., Jensen, B.B., Tannock, G.W., 2002. Appl Environ Microbiol (68), 5918-5924.
- Li, M., Gong, J., Cottrill, M., Yu, H., Langes C.d., Burton, J., Topp, E. 2003. J. Microbiol. Methods, (54), 13-20.
- Massias, B., Arturo-Schaan, M., Elie, A.M., Bebin, K., Hocde, V., Denayrolles, M., Urdaci, M.C., 2006. Reprod. Nutr. Develop. (46), S105.
- Nübel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., Backhaus, H. 1996. J. Bacteriol., (178), 5636-5643.
- Patterson, J.A., Burkholder, K.M., 2003. Poult.Sci. (82), 627-631.
- Pissavin, C., Gabriel, I., Burel, C., Mallet, S., Maurice, R., Lessire, M., Fravalo, P. 2006. Reprod. Nutr. Develop. (46), S26.
- Stewart, J.A., Chadwick, V.S., Murray, A. 2005. J. Med. Microbiol., (54), 1239-1242.
- Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.J., Gibson, G.R., Collins, M.D., Dore, J., 1999. Appl Environ Microbiol (65), 4799-4807.
- Thompson, K., Burkholder, K., Patterson, J., Applegate, T.J. 2008. Poult. Sci., (87), 1624-1632.
- van der Wielen, P.W.J.J., Keuzenkamp, D.A., Lipman, L.J.A., van Knapen, F., Biesterveld, S. 2002. Microb. Ecol., (44), 286-293.
- Windisch, W.M., Schedle, K., Plitzner, C., Kroismayr, A. 2008. J. Anim. Sci., (86), E140-8.
- Zhou, H., Gong, J., Brisbin, J.T., Yu, H., Sanei, B., Sabour, P., Sharif, S. 2007. Poult. Sci., (86), 2541-2549.
- Zhu, X.Y., Zhong, T., Pandya, Y., Joerger, R.D. 2002. Appl. Environ. Microbiol., (68), 124-137.