Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Ruminant Research

Print ISSN: 2345 - 4261
Online ISSN: 2345 - 4253

Effect of different levels of oak acorns on the biodiversity of rumen content bacterial populations using molecular techniques of PCR-SSCP in Markhoz goats

Badri Amiri[1*], Osman Azizi[2], Jalal Rostamzadeh[3]

[1]Ph.D. student, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Iran, Email: badriamiri1394@gmail.com
[2]Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Iran, Email: o.azizi@uok.ac.ir
[3]Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Iran, Email: j.rostamzadeh@uok.ac.ir

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 11/13/2022
Revised: 03/11/2023
Accepted: 03/12/2023

Keywords:
Bacterial populations
Biodiversity
Markhoz goats
Oak Acorns
PCR-SSCP
Rumen content

ABSTRACT

Background and Objectives: Oak Acorns contain significant amounts of biologically active compounds including tannins. Tannins are plant polyphenolic compounds that affect ruminal microorganisms. The effect of tannin depends on the species of microorganism or the source of dietary tannin. Although research has been done on the effect of tannins on the ruminal bacterial population, the effect of oak nutrition on the ruminal bacterial population needs to be investigated. The evaluation of the effects of different levels of oak acorns on the biodiversity of rumen bacterial populations was investigated using the PCR-SSCP molecular technique in Markhoz goats.

Materials and Methods: Twenty-four Markhoz goats (mean weight 16.93 ± 1.25 kg and mean age 4 to 5 months) were assigned to four diets using a completely randomized design. The duration of feeding with experimental diets was 105 days. The experimental treatments included 1) control diet, 2) diet containing 8% oak acorn, 3) diet containing 17% oak acorn and 4) diet containing 25% oak acorn.

Results: The results obtained from this experiment showed that the use of different levels of oak acorns in the livestock diet significantly affects the diversity of rumen microorganisms. The use of oak acorns, in comparison with the control diet, increased the diversity of the bacterial population within the rumen. However, with an increase in the level of oak acorns in the diet, the diversity of bacterial population within the rumen was significantly reduced. The effect of diet on the biodiversity of the ruminal bacterial population was significant ($P<0.001$). The lowest value of the Shannon index was associated with the control treatment, which was significantly different from other treatments ($P< 0.05$). The highest value of Shannon index was related to 8% oak acorns treatment which was significantly different from 25% oak acorns treatment and control treatment ($P<0.05$). The sampling location demonstrated a significant effect on the biodiversity of the ruminal bacterial population ($P<0.001$). The highest value of Shannon index was

related to ventral and ruminal positions, while the lowest value of Shannon index was in the dorsal ruminal position, indicating a significant difference ($P<0.05$). No significant differences were observed among other sites ($P> 0.05$).

Conclusion: The results showed that the use of oak acorns up to 17% in the diet increased the biodiversity of the rumen content bacterial populations, while the inclusion of 25% oak acorns in the diet decreased the biodiversity of the rumen content bacterial populations. The sampling location had a significant effect on the biodiversity of the ruminal bacterial population. The highest value of Shannon index was associated with the ventral and ruminal position, whereas the lowest value of Shannon index was linked to the dorsal ruminal position, demonstrating a significant difference.

Cite this article: Amiri, B., Azizi, O., Rostamzadeh, J. (2023). Effect of different levels of oak acorns on the biodiversity of rumen content bacterial populations using molecular techniques of PCR-SSCP in Markhoz goats. *Journal of Ruminant Research*, 11(2), 1-18.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/ejrr.2023.19667.1816
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

پژوهش در نشخوارکنندگان
شاپا چاپی: ۴۲۶۱-۲۳۴۵
شاپا الکترونیکی: ۴۲۵۳-۲۳۴۵

بررسی اثر سطوح مختلف میوه بلوط بر ساختار جمعیت و تنوع ژنتیک باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در بز مرخز

بدری امیری[1*]، عثمان عزیزی[2]، جلال رستم‌زاده[3]

[1]دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، ایران، رایانامه: badriamiri1394@gmail.com
[2]دانشیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، ایران، رایانامه: o.azizi@uok.ac.ir
[3]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، رایانامه: j.rostamzadeh@uok.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴

واژه‌های کلیدی:
بزغاله‌های مرخز
تنوع زیستی
جمعیت باکتریایی
محتوی شکمبه
میوه بلوط
PCR-SSCP

چکیده

سابقه و هدف: میوه بلوط با نام علمی *کوئرکوس پرسیکا* حاوی مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله تانن است. تانن‌ها ترکیبات پلی‌فنولیک گیاهی تأثیرگذار بر میکروارگانیسم شکمبه می‌باشند. تأثیر تانن وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن جیره است. علیرغم اینکه پژوهش‌هایی در مورد تأثیر تانن بر جمعیت باکتریایی شکمبه انجام‌گرفته است اما بررسی اثر تغذیه میوه بلوط بر جمعیت باکتریایی شکمبه نیاز به تحقیق دارد. ارزیابی اثرات سطوح مختلف میوه بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های مرخز موردبررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ۲۴ رأس بزغاله مرخز (میانگین وزنی ۱/۲۵ ± ۱۶/۹۳ و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماه) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار جیره غذایی اختصاص داده شدند که در هر تیمار ۶ رأس بزغاله مرخز مورد آزمایش قرار گرفت. طول دوره تغذیه با جیره‌های آزمایشی ۱۰۵ روز بود. جیره‌های غذایی شامل ۱) جیره شاهد، ۲) جیره حاوی ۸ درصد میوه بلوط، ۳) جیره حاوی ۱۷ درصد میوه بلوط و ۴) جیره حاوی ۲۵ درصد میوه بلوط بود. از پنج جایگاه مختلف شکمبه- نگاری که عبارتنداز: نگاری، قسمت‌های پشتی، شکمی، جانبی، خلفی و پیلار شکمبه نمونه‌برداری انجام شد. جهت استخراج DNA از نمونه‌ها از پروتکل فنل کلروفرم ارائه‌شده توسط تاجیما و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد. با استفاده از گسترش PCR و آنالیز الگوی SSCP از ژن 16SrRNA تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه موردبررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت بلوط در جیره غذایی دام به‌طور معنی‌داری بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم شکمبه تأثیرگذار است. استفاده از میوه بلوط در مقایسه با جیره شاهد موجب افزایش تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد اما با افزایش سطح میوه بلوط در جیره غذایی تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه- نگاری به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد. تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر

تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار ۸ درصد بلوط بود که نسبت به تیمار ۲۵ درصد بلوط و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه تأثیر معنی‌داری داشت (P<۰/۰۰۱). بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش شکمی شکمبه و پیلار شکمبه و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش پشتی شکمبه بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان‌دادند (P<۰/۰۵). در بین سایر جایگاه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که استفاده از میوه بلوط تا سطح ۱۷ درصد در جیره غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد درحالی‌که استفاده از سطوح ۲۵ درصد میوه بلوط در جیره غذایی موجب کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد. جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه تأثیر معنی-داری داشت. بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش شکمی شکمبه و پیلار شکمبه و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش پشتی شکمبه بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان‌دادند.

استناد: امیری، ب.، عزیزی، ع.، رستم‌زاده، ج. (۱۴۰۲). بررسی اثر سطوح مختلف میوه بلوط بر ساختار جمعیت و تنوع ژنتیک باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در بز مرخز. *پژوهش در نشخوارکنندگان*، ۱۱(۲)، ۱۸-۱

DOI: 10.22069/ejrr.2023.19667.1816

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

عملکرد نشخوارکنندگان وابسته به فعالیت میکروارگانیسم‌ها در استفاده از خوراک‌های جیره است (Jenkins و همکاران، ۲۰۰۷). نشخوارکنندگان یک رابطه همزیستی با میکروارگانیسم‌های شکمبه ایجاد می‌کنند (Boubaker و همکاران، ۲۰۰۷؛ Jany و Georges ، ۲۰۰۸؛ Pitta و همکاران، ۲۰۱۰) که توسط آن مواد مغذی و شرایط محیطی بهینه را برای تخمیر خوراک، تجزیه فیبر و سنتز پروتئین میکروبی به‌عنوان انرژی و پروتئین مهیا شده برای حیوان تأمین می‌کنند (Boubaker و همکاران، ۲۰۰۷؛ Pitta و همکاران، ۲۰۱۰). تنوع بسیار اکوسیستم میکروبی شکمبه متشکل از باکتری (10^{10}-10^{11} سلول در میلی‌لیتر با حضور بیش از ۵۰ جنس)، پروتوزوآ مژکدار (10^{4}-10^{6} میلی‌لیتر از ۲۵ جنس)، قارچ‌های بی‌هوازی (10^{3}-10^{5} هاگ در میلی‌لیتر با حضور ۵ جنس) و باکتریوفاژها (10^{8}-10^{9} میلی‌لیتر) است (Jany و Georges ، ۲۰۰۸؛ Mccowan و همکاران، ۱۹۸۰) که شمار زیادی و حتی ممکن است اکثریت آن‌ها غیرقابل کشت باشند (Jany و Georges ، ۲۰۰۸). میان گروه‌های مختلف میکروب‌های ساکن پیش معده نشخوارکنندگان باکتری‌ها بیشترین تنوع و نقش ضروری را در سلامت و تغذیه دارند (Lawrence و همکاران، ۲۰۰۱). تفاوت در ساختار جمعیت باکتریایی در سه فاز جامد، مایع و اپیتلیوم شکمبه مشاهده‌شده است (Bretschger و همکاران، ۲۰۱۰). باکتری‌های موجود در فاز مایع مخلوطی از میکروارگانیسم‌هایی هستند که از ذرات خوراک جداشده‌اند و بر ترکیبات محلول خوراک در داخل مایع شکمبه زندگی می‌کنند. باکتری‌های این مجموعه به ذرات خوراک متصل شده و هضم اولیه را آغاز می‌کنند (Lorna و همکاران، ۱۹۸۱). باکتری‌های مرتبط با ذرات خوراک ازنظر عددی غالب هستند و به‌عنوان مهم‌ترین گروه برای تجزیه خوراک در نظر گرفته‌شده‌اند (Lawrence و همکاران، ۲۰۰۱؛ Ranilla و همکاران، ۲۰۰۹). این مجموعه ۷۰ تا ۸۰٪ از اجزا میکروبی شکمبه را تشکیل می‌دهد (Lorna و همکاران، ۱۹۸۱). عوامل تغییردهنده در جمعیت میکروبی شامل سن حیوان، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، سلامت حیوان میزبان، تفاوت موقعیت جغرافیایی، فصل سال و مهم‌تر از همه از دیدگاه کشاورزی جیره غذایی حیوان میزبان است (Jany و Georges ، ۲۰۰۸؛ Patra و Saxena، ۲۰۱۰). جیره یک فاکتور مؤثر بر ساختار و عملکرد جمعیت باکتریایی شکمبه است. طبیعت خوراک‌ها و نیز تغییرات فیزیکوشیمیایی القاشده با تخمیر آن‌ها در توسعه برخی از اعمال اکوسیستم میکروبی در فاز جامد و مایع شکمبه سودمند شناخته‌شده است (Ranilla و همکاران، ۲۰۰۹). بلوط ایرانی با نام علمی *کوئرکوس پرسیکا*[1] درختانی بزرگ به ارتفاع ۲۰ متر با تاج کروی بزرگ از خانواده *فاباسه*[2] (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۰۹) و جنس *کوئرکوس*[3] می‌باشند (Ghaderi و همکاران، ۲۰۱۱). حدود سه میلیون هکتار از جنگل‌های غرب ایران پوشیده از گونه‌های مختلف بلوط، به‌طور عمده *کوئرکوس پرسیکا*[4]، *کوئرکوس لیبانی*[5] و *کوئرکوس* این *فکتوریا*[6] است (Ebrahimi و همکاران، ۲۰۰۹). میوه بلوط حاوی مقادیر قابل‌توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی ازجمله تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزاهیدروکسی‌دی‌فنوئیل می‌باشد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (Firkins، ۲۰۱۰). تانن‌ها گروه پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی (Rosales، ۱۹۹۹)

1. *Quequs persica*
2. *Fagaceae*
3. *Querqus*
4. *Quequs persica*
5. *Querqus libani*
1. *Querqus infectoria*

پلی‌فنولیک حاضر در جیره غذایی حیوانات و انسان هستند (Russell و همکاران، ۲۰۰۸) که قابل حل در آب (Nocker و Camper، ۲۰۰۷) و دیگر حلال‌های قطبی بوده (Rosales، ۱۹۹۹) و قادر به رسوب با پروتئین‌ها، آلکالوئیدها و ژلاتین می‌باشند (Nocker و Camper، ۲۰۰۷) تانن‌ها به دو گروه تانن‌های قابل هیدرولیز و تانن‌های متراکم یا پروآنتوسیانیدین[1] طبقه‌بندی می‌شوند (Ghaderi و همکاران، ۲۰۱۱؛ Jany و Georges ، ۲۰۰۸؛ Russell و همکاران، ۲۰۰۸). اختلاف زیادی میان باکتری‌ها برای باندشدن با تانن و مقدار تانن موردنیاز برای مهار رشد وجود دارد (McSweeney و همکاران، ۲۰۰۹). تأثیر تانن بر باکتری شکمبه وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن موجود است (Nocker و Camper، ۲۰۰۷). تانن هر دو اثر مفید و مضر را بسته به غلظت و ماهیت خود دارد (Ghaderi و همکاران، ۲۰۱۱). سه مکانیسم سمیت تانن در باکتری‌های شکمبه پیشنهادشده است: ۱- مهار فعالیت آنزیم و از دسترس خارج کردن سوبسترا، ۲- فعالیت در غشاهای بیولوژیکی و ۳- از دسترس خارج کردن یون‌های فلزی (Firkins، ۲۰۱۰؛ Nocker و Camper، ۲۰۰۷). مکانیسم‌هایی که توسط آن باکتری‌ها می‌توانند اثر تانن را مهار کنند عبارتند از: ۱- تغییر تانن، ۲- تجزیه کمپلکس تانن_ سوبسترا، ۳- غیر فعال کردن تانن توسط ایجاد باندهای با تمایل بالا برای باندشدن با تانن، ۴- تغییر غشا، ۵- جداسازی یون‌های فلزی (Russell و همکاران، ۲۰۰۸) و ۶- تولید تانن‌آز میکروبی (Bretschger و همکاران، ۲۰۱۰؛ Patra و Saxena، ۲۰۰۹). در طول قرن بیستم مطالعه میکروبیولوژی شکمبه اصولاً براساس تکنیک‌های محیط کشت بوده است (Ephraim و همکاران، ۲۰۰۵) که تنوع میکروبی را به میزان بسیار کمی در حدود ۱۰-۵۰ درصد تخمین می‌زدند (Cheng و همکاران، ۱۹۸۱). ظهور تکنیک‌های ژنتیکی نشان داد که تنوع میکروبی بسیار گسترده است و تخمین این تنوع با استفاده از روش‌های وابسته به محیط کشت غیرقابل تشخیص می‌باشد (Ranilla و همکاران، ۲۰۰۹).

مشکل در کشت بسیاری از میکروب‌های حاضر در محیط کشت طبیعی یا مدیریت محیط میکروب شناسان را وادار به استفاده از ژن 16SrRNA[2] به‌عنوان مارکر یا نشانگر فیلوژنتیکی در بررسی‌های تنوع میکروبی و طبقه‌بندی میکروبی کرده‌است (Kamra و همکاران، ۲۰۰۵). براساس آنالیز 16SrRNA پیشنهاد شده‌است که ۴۰۰-۳۰۰ گونه مختلف باکتریایی در شکمبه وجود دارند (Donovan و همکاران، ۲۰۰۱). در آزمایش ژن موردنظر در گونه‌های مختلف، جنس و یا حتی واحدهای بالاتر طبقه‌بندی توسط PCR[3] با پرایمرهای عمومی گسترش می‌یابد. تکنیک‌های بر اساس PCR جهت شناسایی ژن شامل روش‌های مختلفی است که SSCP[4] یکی از آینده‌نگرترین و راحت‌ترین این روش‌ها است. اولین کاربرد تکنیک SSCP برای نظارت بر جامعه میکروبی بوده است و جهت شناخت جامعه میکروبی در سیستم‌های طبیعی به‌کاربرده می‌شود. در آنالیز SSCP قطعه DNA با اندازه مشابه اما توالی متفاوت می‌تواند به‌صورت باندهای مختلف در طول الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید به‌دلیل تفاوت تحریک‌پذیری ساختار تا خورده خود از هم جدا شوند درواقع DNA تک رشته به یک ساختار عالی بر اساس توالی نوکلئوتیدی خود و محیط فیزیکو شیمیایی آن تبدیل می‌شود (Sun و همکاران، ۲۰۰۹). گسترش PCR و آنالیز الگوی SSCP از ژن 16SrRNA، یک

1. Proanthocyanidin

2. 16S ribosomal RNA
3. Polymerase chain reaction
4. Single-stranded conformation polymorphism

ابزار مفید در جهت مطالعه ساختار جمعیت باکتریایی در اکوسیستم‌های مختلف است. با توجه به موارد ذکرشده هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سطوح مختلف تانن میوه بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های مرخز است.

مواد و روش‌ها

این پژوهش در ایستگاه آموزشی و پژوهشی و آزمایشگاه ژنتیک گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام شد. جهت انجام این پژوهش از ۲۴ رأس بزغاله مرخز (میانگین وزنی ۱/۲۵ ± ۱۶/۹۳ و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماه) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار جیره غذایی اختصاص داده شد که در هر تیمار ۶ رأس بزغاله مرخز مورد آزمایش قرار گرفت. جیره‌های غذایی شامل ۱) جیره شاهد، ۲) جیره حاوی ۸ درصد میوه بلوط، ۳) جیره حاوی ۱۷ درصد میوه بلوط و ۴) جیره حاوی ۲۵ درصد میوه بلوط بود. دلیل انتخاب درصدهای متفاوت میوه بلوط در جیره‌های آزمایشی بر اساس دیگر مطالعات صورت گرفته و تعیین ارزش غذایی میوه بلوط بود. قبل از شروع آزمایش یک دوره عادت دهی ۱۵ روزه اجرا شد. طول دوره انجام آزمایش خوراک‌دهی به دام‌ها ۱۰۵ روز بود و مدت‌زمان انجام آزمایشات آزمایشگاهی حدود ۱۸۰ روز بود.

بخش علوفه جیره شامل علوفه یونجه و کاه گندم بود و بخش کنسانتره جیره شامل سبوس گندم، کنجاله سویا، دانه جو، میوه بلوط و کربنات کلسیم بود. ترکیبات شیمیایی مواد خوراکی، اجزا تشکیل‌دهنده جیره‌های آزمایشی و مواد مغذی موجود در آن‌ها در جداول ارائه‌شده است. جیره‌ها به‌طور کاملاً مخلوط و تا حد اشتها در اختیار دام قرار می‌گرفت (جدول ۱). خوراک‌دهی در دو نوبت صبح و بعدازظهر انجام شد. ترکیبات شیمیایی شامل ماده خشک (دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت)، پروتئین (روش کجلدال)، چربی (دستگاه سوکسله) و خاکستر (۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت) با استفاده از روش انجمن رسمی شیمی‌دانان کشاورزی آنالیز شد (جدول ۱). میوه بلوط مورداستفاده قرارگرفته در این آزمایش از گونه *کوئرکوس پرسیکا* تهیه‌شده از جنگل‌های بلوط استان کردستان بود. میزان تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز موجود در میوه بلوط نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۲) و میزان تانن موجود در سطوح متفاوت از جیره غذایی اندازه‌گیری شد (جدول ۳).

بعد از ۱۰۵ روزگی به‌صورت تصادفی از هر تیمار ۳ رأس کشتار شدند. بلافاصله بعد از کشتار شکمبه‌نگاری دام جهت نمونه‌برداری آماده شد. شکمبه‌نگاری ابتدا به شش قسمت تقسیم شد و نمونه‌برداری از این شش جایگاه مختلف که عبارتنداز: نگاری[1]، قسمت‌های پشتی[2]، شکمی[3]، جانبی[4]، خلفی[5] و پیلار[6] شکمبه انجام شد. از هر جایگاه انتخاب‌شده یک نمونه از محتوی آن جایگاه گرفته‌شده و با استفاده از دولایه پارچه کتان فیلتر شدند. نمونه‌ها در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شدند و تا زمان استخراج DNA در ۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان استخراج DNA ابتدا نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه یخ‌گشایی شدند. جهت استخراج DNA از نمونه‌ها از پروتکل فنل کلروفرم ارائه‌شده توسط تاجیما و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد.

1. Reticulum
2. Dorsal
3. Ventral
4. Lateral
5. Caudal
6. Pilar

جدول ۱- مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده جیره‌ها (بر اساس ۱۰۰ درصد ماده خشک)

Table 1- Ingredients and chemical composition of the experimental diets (% DM)

اقلام خوراکی Ingredients	جیره‌های آزمایشی (درصد) Experimental diets (100%)			
	شاهد (بدون میوه بلوط) No oak acorns	۸ درصد میوه بلوط 8% oak acorns	۱۷ درصد میوه بلوط 17% oak acorns	۲۵ درصد میوه بلوط 25% oak acorns
یونجه (Alfalfa)	18.23	17.80	16.50	16.50
کاه گندم (Straw)	21.74	18.65	18.47	16.67
سبوس گندم (Wheat bran)	1.00	4.00	3.80	4.70
کنجاله سویا (Soybean meal)	3.06	3.60	5.30	6.24
جو (Barley)	55.50	47.50	38.50	30.50
بلوط (Oak)	0.00	8.00	17.00	25.00
کربنات کلسیم (Calcium carbonate)	0.47	0.45	0.43	0.39
ترکیب شیمیایی (Chemical composition)				
ماده خشک (Dry Matter) ٪	92.76	92.74	92.77	92.75
انرژی قابل متابولیسم (Metabolizable Energy) (کیلوگرم/ مگاکالری) (Mcal/kg)	2.55	2.55	2.55	2.55
پروتئین (Protein) ٪	11.09	11.09	11.09	11.09
کلسیم (Calcium) ٪	0.52	0.52	0.52	0.52
فسفر (Phosphorus) ٪	0.30	0.32	0.31	0.31
الیاف نامحلول در شوینده خنثی (NDF) ٪	38.67	38.00	38.00	37.46
الیاف نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) ٪	21.68	21.92	23.12	23.80

جدول ۲- میزان تانن موجود در بلوط

Table 2- The amount of tannins in the oak

مقدار Amount	کل تانن Total tannins	تانن قابل هیدرولیز Hydrolysable tannins	تانن متراکم Condensed tannins
گرم در کیلوگرم (gr/kg)	4.34	4.19	0.15
درصد (%)	100	96.5	3.5

جدول ۳- غلظت تانن موجود در سطوح متفاوت از بلوط استفاده شده در جیره

Table 3- The concentration of tannins found in different levels of oak used in the diet

جیره‌های آزمایشی Experimental diets	میزان بلوط Amount of oak (گرم در کیلوگرم) (gr/kg)	کل تانن Total tannins (گرم در کیلوگرم) (gr/kg)	تانن قابل هیدرولیز Hydrolysable tannin (گرم در کیلوگرم) (gr/kg)	تانن متراکم Condensed tannins (گرم در کیلوگرم) (gr/kg)
۸ درصد میوه بلوط 8% oak acorns	80.0	3.5	3.4	0.1
۱۷ درصد میوه بلوط 17% oak acorns	170.0	7.5	7.1	0.3
۲۵ درصد میوه بلوط 25% oak acorns	250.0	11.0	10.5	0.4

آغازگرهای مورداستفاده در این تحقیق دو آغـازگر رفت‌وبرگشت با طول ۱۷ باز مربـوط بـه قطعـه V_3 از ژن 16SrRNA بـز جهـت انجـام روش PCR-SSCP به‌کاربرده شدند. توالی آغازگرها در جدول (۴) نشـان داده‌شده است.

جدول ۴- آغازگرهای استفاده‌شده برای تکثیر قطعات موردنظر ژن 16SrRNA (۲۸)

Table 4- Primers used to propagate the desired 16SrRNA gene (28)

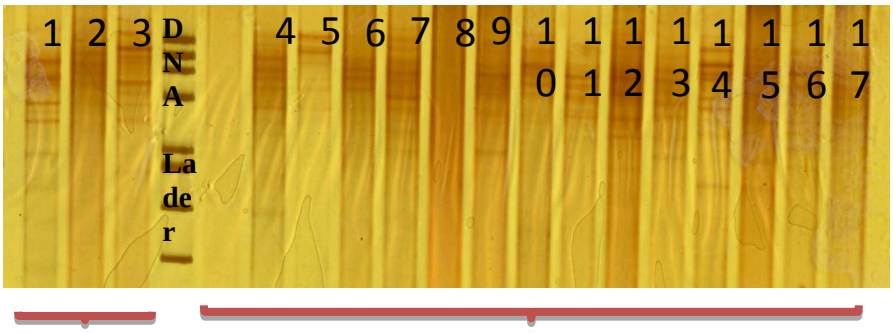
Forward Primer 341(5′- CCTACGGGAGGCAGCAG-3′)
Reverse Primer 534(5′- ATTACCGCGGCTGCTGG -3′)

برای انجام واکنش‌های PCR از میکروتیـوب‌هـای ۲۰۰µl استفاده شد. حجـم نهـایی بـرای هـر واکـنش ۱۰µl بـود. Master Mix مورداسـتفاده بـه‌صـورت کیت‌های آماده از شرکت فرمنتاز خریداری شد. بـرای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۱۰µl) روغـن معـدنی بـه هـر لولـه افـزوده شـد. غلظـت هـر پرایمـر ۰/۲ میکرومولار بود و از کیت شرکت سیناژن بـرایPCR اسـتفاده شـد. جهـت جلـوگیری از بـروز خطاهـای احتمالی در هنگـام برداشـتن مقـادیر کـم مـواد و نیـز افزایش سرعت عمل، محلول پایه‌ای شامل تمامی مواد موردنیاز برای انجـام PCR بـه‌جـز DNA الگـو، بـاهم مخلوط و بین میکروتیوب‌ها تقسیم شدند. چرخه‌هـای حرارتی PCR به روش Touchdown انجام گرفت کـه شامل ۴ مرحله بود. مرحله ۱ یا واسرشت اولیه شـامل ۱ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۱۵ دقیقـه، مرحله ۲ یا Touchdown شامل ۱۰ چرخه هر چرخـه به‌صورت ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مـدت ۳۰ ثانیـه، ۶۱ درجـه سـانتی‌گـراد (بـه ازای هـر سـیکل ۰/۵ درجـه سانتی‌گراد دما کاهش می‌یابد) به مدت ۳۰ ثانیـه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله ۳ یا اتصـال شـامل ۲۵ چرخـه هـر چرخـه بـه‌صـورت ۹۴ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتی‌گـراد بـه مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله ۴ یا تکثیر نهایی شامل ۱ چرخـه بـه‌صـورت ۷۲ درجه سانتی‌گراد بـه مـدت ۳۰ دقیقـه و ۴ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۶ دقیقه بود. جهت تعیین کمیت و کیفیـت DNA هـای اسـتخراج‌شـده از الکتروفـورز محصـول PCR بـر روی ژل‌آکریـل آمیـد ۸ درصـد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. در این پژوهش برای تهیه ژل‌آکریـل آمیـد ۸ درصـد از اسـتوک ۲۹:۱ آکریل‌آمید به بیس‌آکریل‌آمید استفاده شـد. بـرای تهیـه ۲۵ میلی‌لیتـر محلـول ژل ۸ درصـد ۶/۷ میلـی‌لیتـر از استوک ۲۹:۱، ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE 10X و ۱۷/۰۵ میلی‌لیتر آب مقطر با هم مخلوط شدند سپس به آن‌هـا ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم پـر سـولفات ۱۰ درصـد و ۳۰ میکرولیتر تترامتیل تیلندیامین[1] اضافه شد.

جهت انجام روش SSCP از ژل پلـی‌آکریـل آمیـد ۱۲ درصد استفاده شد. از استوک‌هـای ۴۹:۱ و ۳۷.۵:۱ برای تهیه ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد اسـتفاده شـد. برای تهیه ۲۵ میلـی‌لیتـر محلـول ژل ۱۰ میلـی‌لیتـر از اسـتوک ۴۹:۱، ۱/۲۵ میلـی‌لیتـر بـافر TBE 10X، ۵ میلی‌لیتر گلیسـرول ۵۰ درصـد و ۸/۷۵ میلـی‌لیتـر آب دوبـار تقطیـر بـا هـم مخلـوط شـدند. سـپس، ۲۰۰ میکرولیتـر آمونیـوم پـر سـولفات ۱۰ درصـد و ۲۵ میکرولیتـر TEMED اضـافه شـد. پـس از بارگـذاری نمونه‌هـا بـر روی ژل پلـی آکریـل آمیـد ۱۲٪، تانـک الکتروفـورز بـه درون یخچـال (دمـای ۴ درجـه سانتی‌گراد) منتقل گردید. دستگاه الکتروفورز بـه منبـع برق متصل و ولتاژ ثابت ۱۷۰ ولت برقرار گردید. پس

1. Tetra-methyl-ethylene-di-amine (TEMED)

از ۲۲ ساعت جریان برق قطع شده و ژل وارد مرحله رنگ‌آمیزی با نیترات نقره گردید. پس از رنگ‌آمیزی ژل با استفاده از نیترات نقره، عکس ژل با استفاده از دستگاه اسکنر تهیه شد. جهت تعیین باندهای موجود در ژل SSCP از نرم‌افزار OneDscan V.1.3 استفاده شد. پس از تعیین تعداد و نوع باندهای موجود در هر نمونه با استفاده از نرم‌افزار واندی اسکن، ماتریکس مشخص‌کننده تعداد و نوع باند به‌صورت اعداد ۰ و ۱ که به ترتیب نشان‌دهنده عدم حضور و حضور باند بود تهیه گردید. در این بررسی هر باند نشان‌دهنده یک واحد تاکسونومی است. ماتریکس ۰ و ۱ به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار PopGene V.1.3 جهت برآورد شاخص شانون استفاده شد. جهت بررسی تنوع زیستی جمعیت باکتریایی نمونه‌های شکمبه- نگاری با استفاده از شاخص شانون از رویه GLM بسته نرم‌افزاری SAS استفاده شد (SAS، ۲۰۰۲). این مدل آماری شامل جیره، جایگاه نمونه گیری و فاز نمونه‌گیری بود.



شکل ۱- ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد (نمونه محتوی دورسال)

Figure 1- 12% polyacrylamide gel (sample containing dorsal)

نتایج و بحث

تحقیقات زیادی در ارتباط با مصرف خوراک و بررسی عملکرد دام انجام‌گرفته است؛ اما بررسی تأثیر خوراک بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه به‌عنوان یک جزء ضروری در هضم خوراک و درنهایت متابولیسم حیوان میزبان بسیار کم بوده است. بررسی تأثیر خوراک بر تنوع جمعیت و باکتریایی و مشخص شدن سویه‌های باکتریایی تأثیرپذیر نقش بسیار مهمی در بررسی تأثیر جیره بر عملکرد دام دارد. این تحقیق به‌منظور تأثیر گونه بلوط ایرانی به‌عنوان یک منبع خوراکی حاوی تانن بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه در نژاد بز مرخز انجام‌گرفته است. نتایج به‌دست‌آمده از این آزمایش نشان‌داد که استفاده از سطوح متفاوت بلوط در جیره غذایی دام به‌طور معنی‌داری بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم شکمبه تأثیرگذار است. استفاده از میوه بلوط در مقایسه با جیره شاهد موجب افزایش تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد اما با افزایش سطح میوه بلوط در جیره غذایی تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه- نگاری به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد.

جدول ۵: تأثیر سطوح مختلف میوه بلوط و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه

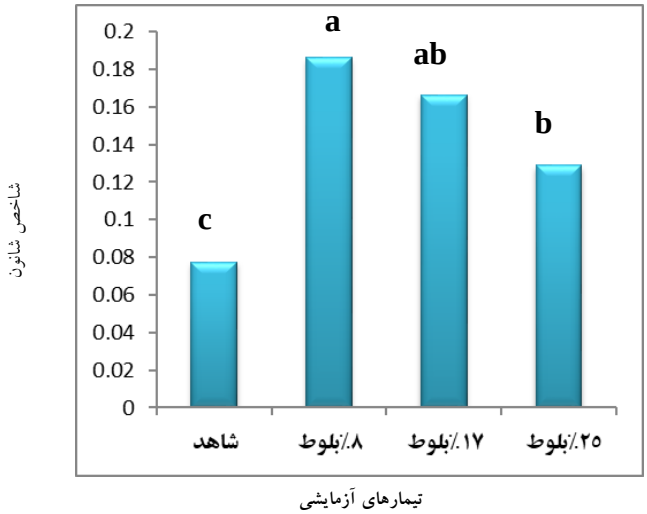
Table 5- The effect of different levels of oak acorns and sampling site on the biodiversity of the ruminal bacterial population

شاخص شانون Shannon Indicator	جیره (درصد) (٪) Diet	نمونه Sample
0.07741[c]	0	محتوی شکمبه Rumen contents
0.18636[a]	8	محتوی شکمبه Rumen contents
0.16629[ab]	17	محتوی شکمبه Rumen contents
0.12902[b]	25	محتوی شکمبه Rumen contents
P Value < 0/0001		شاخص P
شاخص شانون Shannon Indicator	جایگاه نمونه‌گیری Sampling Position	نمونه Sample
0.09461[b]	قسمت پشتی شکمبه Dorsal rumen	محتوی شکمبه Rumen contents
0.16773[a]	قسمت شکمی شکمبه Ventral rumen	محتوی شکمبه Rumen contents
0.10322[ab]	قسمت خلفی شکمبه Caudal rumen	محتوی شکمبه Rumen contents
0.14622[ab]	قسمت جانبی شکمبه Lateral rumen	محتوی شکمبه Rumen contents
0.16773[a]	پیلار شکمبه Pilar rumen	محتوی شکمبه Rumen contents
0.15913[ab]	نگاری Reticulum	محتوی نگاری Reticulum contents
P Value < 0/01		شاخص P
***	-	معنی‌داری Significant تأثیر جیره Effect of Diet
*	-	تأثیر جایگاه نمونه‌گیری Position Effect of Sampling
ns	-	جیره در جایگاه نمونه‌گیری Diet at the Sampling Position

تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه- نگاری: تأثیر جیره بر تنوع زیستی باکتریایی محتوی شکمبه- نگاری با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۵ ارائه‌شده است. نتایج نشان داد که تأثیر جیره بر تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد است که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار ۸ درصد بلوط است که نسبت به تیمار ۲۵ درصد بلوط و تیمار شاهد اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). تیمار ۱۷ درصد بلوط نسبت به تیمار ۸ درصد بلوط و تیمار ۲۵ درصد بلوط اختلاف معنی‌داری نداشت (P>۰/۰۵).

با توجه به تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری در جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه درنتیجه استفاده از

جیره غذایی حاوی سطوح ۸۰، ۱۷۰ و ۲۵۰ گرم بلوط در کیلوگرم جیره غذایی با میزان ۳/۵، ۷/۵ و ۱۱ گرم تانن در کیلوگرم جیره غذایی (به ترتیب) نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد. تیمار حاوی سطوح ۳/۵ گرم تانن در کیلوگرم جیره نسبت به تیمار شاهد و تیمار حاوی سطوح ۲۵ درصد بلوط اختلاف معنی‌دار داشت. تیمار حاوی سطوح ۳/۵ گرم تانن در کیلوگرم جیره بیشترین شاخص تنوع را نسبت به تیمار حاوی سطوح ۷/۵ و ۱۱ گرم تانن در کیلوگرم جیره داشت. اگرچه شاخص تنوع اختلاف معنی‌داری را میان تیمار ۱۷ درصد بلوط نسبت به تیمار ۸ درصد بلوط و تیمار ۲۵ درصد بلوط نشان نداد اما با افزایش در سطوح مقدار تانن جیره شاخص تنوع در بین تیمارهای آزمایشی کاهش پیدا کرد.



شکل ۲- تأثیر جیره بر تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از شاخص شانون

Figure 2- Effect of diet on the diversity of the ruminal bacterial population using Shannon index

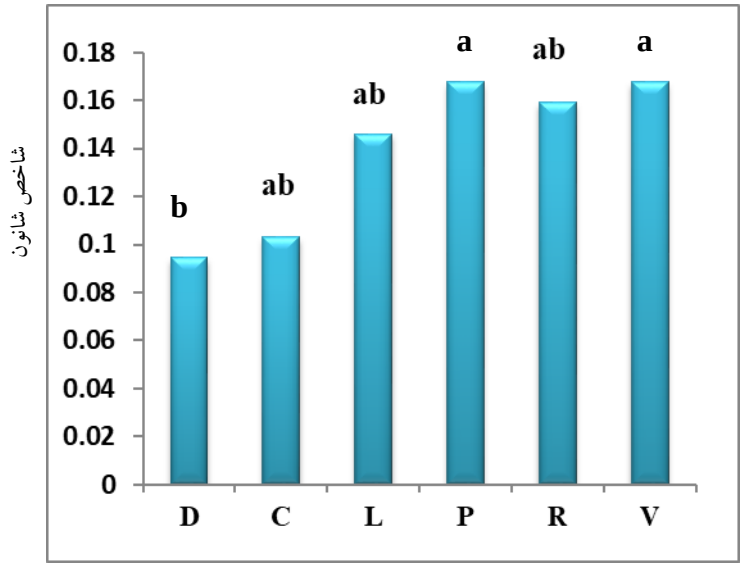
Singh و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تانن بالای برگ پاکار بر پروفایل میکروبی شکمبه بز گزارش کردند که جمعیت باکتری‌های سلولایتیک کاهش نشان داد در حالیکه جمعیت باکتری‌های مقاوم به تانن با تغذیه برگ پاکار افزایش پیدا کرد. گروه‌های مختلف میکروب‌ها نسبت به تانن مقاومت متفاوت دارند. قارچ، باکتری پرولایتیک و پروتوزوآ در مقایسه با دیگر میکروب‌ها بیشترین مقاومت را به تانن دارند. Donovan و همکاران (۲۰۰۱) با بررسی اثر تانن در شرایط آزمایشگاهی بر جمعیت باکتریایی گزارش کردند که *استرپتوکوکوس گالولایتیکوس* به حداقل ۷ درصد تانیک اسید و ۴ درصد تانن متراکم اقاقیا مقاوم است که در محیط مایع با افزایش میزان تانن این مقاومت کاهش پیدا کرد. شمار کل باکتری‌ها در شکمبه بز هنگامی‌که حیوانات با گیاهان حاوی تانن بالا تغذیه شدند. به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد و کاهش در تعداد به‌طور مستقیم با سطح این خوراک در جیره مرتبط بود (Jill، ۲۰۰۴). حدود ۱۰ دقیقه بعد از اضافه کردن تانن به محیط، تانن با باکتری‌ها باند می‌شود. اختلاف زیادی میان باکتری‌ها برای باند شدن با تانن و مقدار تانن موردنیاز برای مهار رشد وجود دارد (Muetzel و Becker، ۲۰۰۶). تأثیر تانن بر باکتری شکمبه وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن موجود در خوراک است (Patra و Saxena، ۲۰۰۹b).

بلوط استفاده‌شده در تحقیق حاضر جایگزین جو در جیره‌های غذایی شده است با توجه به ترکیب شیمیایی میزان فیبر نامحلول در شوینده اسیدی موجود در بلوط ۲۵/۵ درصد در برابر ۷/۲ درصد میزان فیبر نامحلول در شوینده اسیدی موجود در دانه جو می‌باشد؛ که این تفاوت در میزان فیبر نامحلول در شوینده اسیدی با افزایش در سطح بلوط (۸، ۱۷ و ۲۵ درصد) موجود در جیره بیشتر مشهود می‌گردد. نتایج نشان داد که با افزایش سطح بلوط در جیره شاخص تنوع شانون به‌طور معنی‌داری کاهش پیدا کرد.

Mcallister و همکاران (۱۹۹۴) گزارش کردند که تانن متراکم علوفه‌های لگومی مختلف تأثیر مهارکنندگی متفاوتی بر باکتری‌های فیبرولایتیک و *فیبروباکترسوکسینوژنز* شکمبه داشت. تانن با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از کئوبراچو، میموزیا و شاه‌بلوط با کاهش در شمار میکروب‌ها و از جمله کاهش *فیبروباکتر سوکسینوژنز* و *رومینوکوکوس فلاوفاسینس* باعث کاهش تجزیه فیبر شد (Jany و Georges ، ۲۰۰۸). هضم ظاهری کربوهیدرات‌های محلول ظاهراً تحت تأثیر تانن قرار ندارد. تانن یا به‌وسیله ممانعت مستقیم با میکروارگانیسم سلولایتیک (تجزیه‌کننده سلولز) و ممانعت از فعالیت آنزیم‌های فیبرولایتیک یا به‌طور غیرمستقیم با تشکیل کمپلکس با لیگنوسلولز (سلولز و لیگنین) و یا هردوی این موارد هضم فیبر را کاهش می‌دهد (Patra و Saxena، ۲۰۰۹b). تشکیل کمپلکس تانن- سلولز به هضم آنزیمی مقاوم است و در اتصال میکروب‌های فیبروباکتر به سوبسترا اختلال ایجاد می‌کند (Jany و Georges ، ۲۰۰۸).

هرچند که انتظار می‌رفت شاخص تنوع جمعیت باکتریایی تیمارهای حاوی میوه بلوط نسبت به تیمار شاهد کمتر باشد اما این شاخص در تیمار شاهد کمترین مقدار را داشت که می‌تواند درنتیجه سازگاری نسبی میکروارگانیسم‌های شکمبه به میزان تانن و فیبر موجود در جیره حاوی بلوط و ایجاد مکانیسم‌های مقاومت به تانن در باکتری‌های مقاوم به تانن باشد. هرچند که استفاده از سطح ۲۵ درصد بلوط در این آزمایش تنوع جمعیت باکتریایی شکمبه را به‌طور معنی‌داری کاهش داد. افزایش سطح بلوط در جیره با افزایش فیبر جیره همراه است که موجب افزایش رشد باکتری‌های فیبرولایتیک می‌گردد. در ارتباط با مواد جامد جیره تنوع بالاتری از جمعیت میکروارگانیسم‌ها را در فاز جامد می‌توان یافت (Chen و همکاران ، ۲۰۱۱؛ Martin ، ۲۰۱۱). شرایط محیطی مانند pH، درجه بی‌هوازی بودن و نیز منابع و مقدار سوبسترا بر جمعیت باکتریایی شکمبه بسیار تأثیرگذار است (Michelland و همکاران، ۲۰۰۹). درزمانی که بلوط به همراه جو به جیره افزوده‌شده است دو منبع کنسانتره‌ایی دانه جو و میوه بلوط تأمین‌کننده میزان کنسانتره موردنیاز دام می‌باشند که این خود موجب افزایش تنوع در منابع خوراکی جیره می‌گردد و این بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار است.

تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه- نگاری: تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۵ ارائه‌شده است. نتایج نشان داد که تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی معنی‌دار است ($P<۰/۰۱$). بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش شکمی شکمبه و پیلار شکمبه و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به بخش پشتی شکمبه بود که تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نشان‌دادند ($P<۰/۰۵$). در بین سایر جایگاه‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).



شکل ۳- تأثیر جایگاه نمونه‌گیری بر تنوع جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از شاخص شانون

Figure 3 -The effect of sampling position on the diversity of the ruminal bacterial population using Shannon index

نتایج آزمایش حاضر با یافته‌های Michelland و همکاران (۲۰۰۹) مغایرت دارد. این محققین با بررسی تنوع جمعیت باکتریایی شکمبه گاو و ارتباط آن با پارامترهای محیطی گزارش کردند که در ساختار و شاخص تنوع جمعیت باکتریایی میان بخش شکمی شکمبه، بخش پشتی شکمبه و رتیکولوم تفاوتی مشاهده نشد (Michelland و همکاران، ۲۰۰۹). بسیاری از مطالعات نشان‌داده‌اند (Russell و همکاران، ۲۰۰۸؛ Sadet و همکاران، ۲۰۰۷) که ذرات جامد و مایع شکمبه گیاهخواران دو جامعه باکتریایی کاملاً متمایز دارند. ذرات جامد به‌طور اساسی حاوی باکتری‌های فیبرولایتک متصل به ذرات می‌باشد. در تحقیق Michelland و همکاران (۲۰۰۹) نمونه‌گیری از کل محتویات شکمبه انجام‌گرفته است و فاز جامد و مایع شکمبه از هم جدا نشده است. بخش شکمی شکمبه به‌واسطه داشتن هر دو ذرات جامد فیبر و ذرات فروافتاده در مایع تحت تأثیر گرانش از تنوع بیشتری برخوردار است درحالی‌که بخش پشتی شکمبه اساساً حاوی ذرات جامد فیبر است (Mehansho و همکاران، ۱۹۹۲). بیشترین محتوی بخش پشتی شکمبه را فاز جامد تشکیل می‌دهد در حالیکه بخش شکمی شکمبه حاوی ذرات موجود در فاز مایع و جامد می‌باشد.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده و تأثیر معنی‌دار جیره غذایی بر جمعیت باکتریایی شکمبه در فاز جامد می‌توان نتیجه گرفت که تنوع جمعیت باکتریایی در فاز جامد شکمبه موجب تغییر در جمعیت باکتریایی در پنج جایگاه نمونه‌گیری از شکمبه و اساساً تفاوت در بخش شکمی شکمبه و بخش پشتی شکمبه شد. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش در میزان فیبر جیره تنوع جمعیت باکتریایی شکمبه به‌طور معنی‌داری کاهش پیداکرده است؛ که تأثیر این تغییر بر جمعیت باکتریایی فاز جامد شکمبه در بخش شکمی شکمبه و بخش پشتی شکمبه بیشتر مشهود بوده است.

اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه: اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۵ ارائه‌شده است. نتایج نشان داد که اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه غیرمعنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌داد که استفاده از میوه بلوط تا سطح ۱۷ درصد در جیره غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد درحالی‌که استفاده از سطوح ۲۵ درصد میوه بلوط در جیره غذایی موجب کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه شد. اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار شد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر در دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام‌گرفته است که بدین‌وسیله از تمامی کسانی که در این مجموعه فعالیت دارند تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Abadi, T. M. and Chaji, M. 2011. The Influence of the plant tannins on *in vitro* ruminal degradation and improving nutritive value of sunflower meal in ruminant. Journal of Pakistan Veterinary, 32: 225-228.

Ebrahimi, A., Khayami, M. and Nejati, V. 2009. Evaluation of antibacterial activity of hydroalcoholic extract of Iranian oak fruit by diffusion method. Journal of Medicinal Plants Quarterly, 9: 34-26.

Boubaker, A. G., Abdouli, H., Mosquera Losada, M.R., Tayachi, L., Mnsouri, M. and Zidib, L. 2007. Cork oak (*Querqus Suber L.*) acorn as a substitute for barley in the diet of rabbits: Effect on *in vivo* digestibility, growth and carcass characteristics. Journal of Animal and Veterinary Advances, 6: 1219-1222.

Bretschger, O., Osterstock, J.B., Pinchak, W.E., Ishii, S. and Nelson, K.E. 2010. Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. Journal of Microbial Ecology, 59: 415–427.

Chen, Y., Penner, G.B., Li, M., Oba, M. and Guan, L.L. 2011. Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 77: 5770–5781.

Cheng, K.J., Fay, J.P., Coleman, R. N., Milligan, L.P. and Costerton, J.W. 1981. Formation of bacterial microcolonies on feed particles in the rumen. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 41: 298-305.

Donovan, L.O. and Brooker, J.D. 2001. Effect of hydrolysable and condensed tannins on growth, morphology and metabolism of *Streptococcus gallolyticus* (*S. caprinus*) and *Streptococcus bovis*. Journal of Microbiology, 4: 1025–1033.

Ephraim, E., Odenyo, A. and Ashenafi, M. 2005. Screening for tannin degradation by rumen and faecal samples of wild and domestic animals in Ethiopia. Journal of Microbiology and Biotechnology, 21: 803–809.

Firkins, J.L. 2010. Reconsidering rumen microbial consortia to enhance feed efficiency and reduce environmental impact of ruminant livestock production systems. Journal of Revista Brasileira de Zootecnia, 39: 445-457.

Ghaderi, Q.M., Mahonak, A.S., Aalmi, M., Victim, M. and Azizi, M.H. 2011. Evaluation of anti-radical activity, regenerative power and antioxidant capacity of phenolic extract of an oak variety (*Q.branti* var. Persica). Journal of Food Industry Research, 1: 104-93.

Jany, J.L. and Georges, B. 2008. Culture-Independent methods for dentifying microbial communities in cheese. Journal of Food Microbiology, 25: 839-848.

Jenkins, T.C., Wallace, R.J., Moate, P.J. and Mosley, E.E. 2007. Board-Invited review: recent advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. Journal of Animal Science, 86: 397-412.

Jill, E. C. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. Journal of Clinical Microbiology Reviews, 17: 840–862.

Kamra D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. Journal of Current Science, 89: 124-135.

Lawrence, G., Gunton, J., Turenne, Ch. Y., Wolfe, J. and Kabani, A. M. 2001. Identification of mycobacterium species by multiple-fluorescence PCR–single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. Journal of Clinical Microbiology, 39: 3085–3091.

Lorna, J. M. and Jones, G. A. 1981. Isolation and presumptive identification of Adherent epithelial bacteria ("epimural" bacteria) from the ovine rumen wall. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 41: 1020-1028.

Martin, M. L. 2011. Sainfoin tannins and their impact on protein degradation during silage and rumen fermentation and testing of novel techniques. Doctoral thesis swedish university of ugricultural sciences uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.

Mcallister, T.A., Bae, H.D., Jones, G.A. and Cheng, K.J. 1994. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. Journal of Animal Science, 72: 3004-3018.

Mccowan, R.P., Cheng, K. J. and Costerton, J. W. 1980. Adherent bacterial populations on the bovine rumen wall: distribution patterns of adherent bacteria. Journal of Applied and Environmental Microbiology, 39: 233-241.

McSweeney, Ch., Kang, S., Davis, E.G.C., Morrison, M. and Denman, S. 2009. Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. Journal of Sociedade Brasileira de Zootecnia, 38: 341-351.

Mehansho, H., Asquith, T. N., Butler, L. G., Rogler, J. C. and Carlson, D. M. 1992. Tannin-mediated induction of proline-rich protein synthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(1): 93-97.

Michelland, R. J., Monteils, V., Zened, A., Combes, S., Cauquil, L., Gidenne,T., Hamelin, J. and Fortun-Lamothe, L. 2009. Spatial and temporal variations of the bacterial community in the bovine digestive tract. Journal of Applied Microbiology, 107: 1642–1650.

Muetzel, S. and Becker, K. 2006. Extractability and biological activity of tannins from various tree leaves determined by chemical and biological assays as affected by drying procedure. Journal of Animal Feed Science and Technology, 125: 139–149.

Nocker, A, Burr, M. and Camper, A, K. 2007. Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. Journal of Microbial Ecology, 54: 276–289.

Patra, A.K. and Saxena, J. 2009a. The effect and mode of action of saponins on the microbial populations and fermentation in the rumen and ruminant production. Journal of Nutrition Research Reviews, 22: 204–219.

Patra, A.K. and Saxena, J. 2009b. Dietary phytochemicals as rumen modifiers: a review of the effects on microbial populations. Journal of Antonie van Leeuwenhoek, 96: 363–375.

Patra, A.K. and Saxena, J. 2010. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. Journal of Phytochemistry, 71: 1198–1222.

Pitta, D., Pinchak, W. W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B. R., Fulford, J. D., Wickersham, T. A. and Malinowski. D. P. 2010. Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. Journal of Microbial Ecology, 59: 511–522.

Ranilla, M. J., Garcia, A. I. M., Alcaide, E. M. and Carro, M. D. 2009. Analysis of microbial communities in rusitec and single- flow continuous culture fermenters by PCR-SSCP: effects of basal dite. Journal of Options Mediterraneennes, 85: 239- 243.

Rosales, R.B. 1999. Condensed tannins in tropical forage legumes: their characterisation and study of their nutritional impact from the standpoint of structure-activity relationships. Department of Agriculture, the University of Reading.

Russell, J.B., Muck, E.R. and Weimer, P.J. 2008. Quntitative analysis of cellulose degradation and growth of cellulolytic bacteria in the rumen. Journal of FEMS Microbiology Ecology, 67: 183-197.

Sadet, S., Martin, C., Meunier, B. and Morgavi, D.P. 2007. PCR-DGGE analysis revelas a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. Journal of Animal Bioscience, 1: 939-944.

SAS. 2002. User's guide: Statistics, Version 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.

Singh, B., Chaudhary, L. C., Agarwal, N. and Kamra, D. N. 2011. Effect of feeding *ficus infectoria* leaves on rumen microbial profile and nutrient utilization in goats. Journal of Animal Science, 24:810-817.

Sun, Y.Z., Maob, S.Y. and Zhu, W.Y. 2009. Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. Journal of the Animal Consortium, 4: 210–217.