JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۱۰-۱

تعیین تنوع ژنتیکی باکتری‌ها در شکمبه بز با استفاده از توالی یابی 16S rRNA

سید مهدی اصحابی [۱]، محمد چمنی [۲]، کاوه جعفری خورشیدی [۳]، مهدی امین افشار [۴]

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

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

۳- استادیار گروه علوم دامی، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

۴- استادیار گروه علوم دامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۱۰ پذیرش: ۹۶/۶/۱۲

چکیده

تنوع ژنتیکی جمعیت باکتریایی در شکمبه بز با استفاده از یک روش مولکولی و مستقل از کشت مورد بررسی قرار گرفت. به دلیل شرایط منحصر به‌فرد تغذیه‌ای و زندگی، این انتظار وجود دارد که بزها دارای جمعیت باکتریایی متفاوتی نسبت به سایر نشخوارکنندگان باشند. در نتیجه درک صحیح این جمعیت میکروبی در نژادهای مختلف بز و بررسی تغییرات آن‌ها در پاسخ به رژیم‌های مختلف تغذیه‌ای و بررسی تنوع آن‌ها در زیستگاه‌های مختلف بسیار ضروری است. از این رو فرآیند PCR و تعیین توالی کتابخانه کلون ژن 16S rRNA با استفاده از یک نمونه مخلوط حاصل از کل محتویات شکمبه مربوط به ۱۲ بز بومی شمال ایران با استفاده از پرایمرهای عمومی برای باکتری‌ها انجام پذیرفت. بزها از گله‌های پرواری تغذیه شده با خوراک مخلوط کنسانتره و علوفه انتخاب شدند. مجموعاً ۱۵ توالی 16S rRNA مورد آنالیز قرار گرفت. از این ۱۵ توالی ۴ توالی دارای شباهت با Streptococcus bovis بودند و ۳ توالی با Selenomonas ruminantium همخوانی داشتند. همچنین ۲ توالی شبیه به Megasphera elsdenii بودند و ۲ توالی دیگر با Prevotella ruminicola شباهت داشتند. ۲ کلون نیز با باکتری‌های کشت نیافته شکمبه گاو شباهت داشتند. از این ۱۵ توالی یک توالی به Lactobacillus plantarum شبیه بود و یک توالی باقیمانده نیز دارای شباهت با Prevotella multiformis بود. این تحقیق برای اولین بار تنوع مولکولی جمعیت باکتری‌ها را در شکمبه بزها در ایران مورد مطالعه قرار داد. بررسی نتایج این تحقیق نشان داد که این حیوانات دارای جمعیت باکتریایی مشابه با سایر نشخوارکنندگان در سایر نقاط دنیا می‌باشند. هر چند که ما توالی‌هایی را نیز جداسازی نمودیم که با میکروارگانیسم‌های شناخته شده در دستگاه گوارش در یک خوشه قرار نمی‌گرفتند که این مساله می‌تواند به علت اختلافات فردی در حیوانات میزبان در حین نمونه گیری، نوع جیره، روش‌های استخراج DNA یا پرایمرهای مورد استفاده برای PCR بوده باشد.

واژگان کلیدی: شکمبه، تنوع ژنتیکی، بز

** نویسنده مسئول: محمد چمنی*

آدرس: گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران. تلفن: ۴۴۸۶۸۵۳۹-۰۲۱

پست الکترونیک: m.chamani@srbiau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

شکمبه اکوسیستم بسیار پیچیده‌ای است که دارای طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، تک‌یاخته‌ها، آرکی‌ها و قارچ‌ها می‌باشد (۱۳). وظیفه اصلی میکروارگانیسم‌ها، تبدیل مواد گیاهی به ترکیبات قابل هضمی است که بتوانند توسط حیوان میزبان مورد استفاده قرار گیرند (۱۹). این عملکرد از این‌رو حائز اهمیت است که امکان تبدیل انرژی ذخیره شده خورشیدی در الیاف گیاهی را به محصولات غذایی مانند شیر و گوشت فراهم می‌آورد. علاوه بر این از آن‌جایی که این جمعیت میکروبی طی گذر زمان دستخوش انتخاب و تکامل قرار گرفته، نوعی ارتباط داخلی بین حیوان میزبان و میکروب‌ها بوجود آمده است (۲۸). بنابراین مطالعه جمعیت میکروبی حاضر در شکمبه بخشی از تحقیقات تغذیه‌ای را در نشخوارکنندگان تشکیل می‌دهد و در بهبود درک ما از این جمعیت پیچیده میکروبی و اثرات متقابل آن‌ها کمک می‌کند.

در گذشته عمده اطلاعات در مورد ترکیب جمعیتی میکروارگانیسم‌ها در شکمبه، حاصل از روش‌های سنتی مانند تکنیک رول تیوب (۱۵) یا برآوردهای MPN (Most Probable Number) بوده‌است (۶). روش‌های سنتی نشان داده‌اند که باکتری‌های شکمبه متعلق به ۲۲ گونه غالب می‌باشند (۱۷). میکروارگانیسم‌های شکمبه به‌طور گسترده‌ای، هم به صورت کیفی (۳۷) و هم به صورت کمی (۳۱) توسط تکنیک‌هایی بر پایه DNA (مانند ژن 16S rRNA در پروکاریوت‌ها و 18S rRNA در یوکاریوت‌ها) مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. از این تکنیک‌ها بعداً جهت ترسیم کتابخانه کلون‌های 16S rRNA میکروب‌های شکمبه و تشریح تنوع قابل ملاحظه‌ای از باکتری‌های شکمبه استفاده شده است. تحقیقات مولکولی در زمینه اکولوژی میکروبی حیوانات به‌طور گسترده در رشته علوم دامی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳).

طبق اسناد تاریخی در گذشته‌های بسیار دور در ایران بز به همراه گوسفند پرورش می‌یافته است. این دام به‌واسطه ساختار فیزیولوژیکی خاص، یکی از مناسب‌ترین دام‌های اهلی ایران است که می‌تواند از مراتع و پس‌چرهای زراعی تغذیه نماید و به‌واسطه سرشاخه خواری و استفاده از بوته‌ها و خارها این انتظار وجود دارد که دارای جمعیت میکروبی متنوع‌تری نسبت به سایر نشخوارکنندگان باشد که شناسایی این جمعیت میکروبی به خصوص جمعیت باکتری‌ها در شکمبه می‌تواند به کامل کردن درک صحیح ما از پتانسیل بزها در هضم مواد خوراکی غیر معمول کمک شایانی نماید. تقریباً در اکثر نقاط کشور پهناور ایران و به‌خصوص مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری، بز به دو شیوه‌ی اصلی دامداری روستایی و عشایری (کوچنده) پرورش می‌یابد (۱). در ایران ۱۲۸/۷ میلیون واحد دامی زندگی می‌کنند که از این تعداد ۲۵/۹ میلیون رأس مربوط به بز می‌باشد (۲۳).

بر اساس اطلاعات ما، این تحقیق اولین مطالعه بر روی تنوع باکتری‌های شکمبه بزها در ایران است که به‌وسیله تکثیر، کلونینگ و توالی یابی ژن 16S rRNA و پس از آن مقایسه توالی‌ها و آنالیز فیلوژنتیک به بررسی این جمعیت میکروبی می‌پردازد.

مواد و روش کار

۱- جمع آوری نمونه‌ها

آزمایش بر روی ۱۲ بز ایرانی از شمال ایران (۶ حیوان از استان مازندران و ۶ حیوان از استان گیلان) انجام پذیرفت که تقریباً دارای ۱ سال سن و وزن

Archive of SID

www.SID.ir

زنده ۳ ± ۴۰ کیلوگرم بودند. جمع آوری نمونه‌ها در اواخر فصل بهار انجام گرفت و حیوانات نیز از گله‌های پرواری تغذیه شده با خوراک مخلوط کنسانتره و علوفه انتخاب شدند که دسترسی به علوفه تازه نداشتند. نمونه‌ها پس از کشتار حیوانات از قسمت‌های مختلف شکمبه جداسازی شدند تا از حضور حداکثر گونه‌های باکتریایی از بخش‌های مختلف شکمبه اطمینان حاصل شود. نمونه کامل حاصل از محتویات شکمبه ۱۲ بز با یکدیگر مخلوط شدند و یک نمونه نهایی به میزان ۱۰۰ گرم تهیه گردید که جهت جلوگیری از فعالیت‌های بعدی میکروبی و تولید آنزیم‌های مختلف میکروبی، سریعاً به فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد منتقل شد.

۲- استخراج DNA

استخراج DNA از کل محتویات شکمبه انجام گرفت. محتویات شکمبه بر روی یخ، یخ گشایی شدند. استخراج DNA با استفاده از کیت DNP (سیناکلون، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد و در نهایت DNA در ۵۰ میکرولیتر بافر Tris-EDTA (pH=8.0) که حاوی DNase-free RNase بود استخراج گردید. پس از استخراج DNA از نمونه‌ها، DNA ها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد قرار داده شدند و برای بررسی کیفیت و وزن مطلوب مورد سنجش قرار گرفتند. همچنین غلظت‌های DNA توسط Nano Drop ۱۰۰۰ سنجیده شد. در نهایت نمونه‌ها تا مرحله بعدی آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۳- پرایمرها و انجام تکثیر ژنی با استفاده از PCR

تکثیر ژن 16S rRNA با استفاده از یک جفت پرایمر عمومی برای باکتری‌ها با پرایمر رفت (5′-TAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG -3′) و پرایمر برگشت (5′-ACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGC -3′) انجام پذیرفت. واکنش PCR به این صورت انجام گرفت که هر واکنش شامل ۵ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR Buffer، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت به غلظت ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۷۵ میکرولیتر از $MgCl_2$ ۵۰ میلی مولار، ۰/۵ میکرولیتر dNTP(dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ۱۰ میلی مولار و ۰/۴ میکرولیتر 5U/ml Taq DNA Polymerase در حجم کلی ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش PCR توسط Mastercycler 5333 (Ependorf Germany) انجام پذیرفت. واکنش PCR با استفاده از برنامه زیر انجام گرفت: واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۴۰ چرخه ۳۰ ثانیه‌ای شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه مرحله اتصال در دمای ۴۹ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ ثانیه طویل‌سازی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به همراه گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۵ دقیقه. محصولات PCR توسط الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ تفکیک شدند و توسط SYBR 0/0001 safe (سینا کلون، ایران) رنگ آمیزی گردیدند.

۴- کلونینگ و توالی یابی

محصولات خالص‌سازی شده PCR با استفاده از کیت T/Acloning (Fermentase, USA) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده کلون شدند و به سلول‌های مستعد E.coli JM107 ترانسفرم گردیدند. سپس پلاسمیدهای نوترکیب با استفاده از کیت استخراج پلاسمید (سینا کلون، ایران) استخراج شدند. توالی‌های نوکلئوتیدی ژن‌های کلون شده، جهت

Archive of SID

تعیین توالی ژن 16S rRNA به شرکت Bioneer واقع در کشور کره جنوبی ارسال شدند.

۵- آنالیز توالی‌ها و ساختار ثانویه

تمام توالی‌های مرجع از بانک ژنی و RDP (Ribosomal Database Project) تهیه شدند (۵). توالی‌های به‌دست آمده، توسط برنامه CHECK-CHIMERA به منظور حذف هر گونه کلون ژن rRNA غیر واقعی مورد آنالیز قرار گرفتند (۲۱). میزان تشابه با اطلاعات روی پایگاه داده‌ها با استفاده از جستجوی آنلاین BLAST انجام گرفت و مشابه‌ترین توالی‌ها به عنوان مرجع در درخت فیلوژنتیک انتخاب شدند (۲۰). متوازن کردن توالی توسط نرم افزار توازن توالی چندگانه CLUSTAL W version 1.81 انجام گرفت (۳۸).

۶- آنالیز فیلوژنتیک

درخت فیلوژنتیک با استفاده از روش neighbor-joining(۳۰) و با کمک نرم افزار MEGA 4 (http://www.megasoftware.net/mega4/mega.html) جهت تشریح روابط خویشاوندی رسم گردید و درخت با استفاده از آزمون bootstrap بر اساس ۱۰۰۰ تکرار نمونه‌گیری (۸) طبق توصیه Paster و همکاران (۱۹۹۱) ارزیابی شد (۲۶).

نتایج

۱-آنالیز تجزیه توالی کتابخانه کلون 16S rRNA باکتری‌ها

در مجموع ۱۵ کلون ژن 16S rRNA مربوط به باکتری‌ها از کل محتویات شکمبه بزها جداسازی شدند و تمامی آن‌ها مورد آنالیز قرار گرفتند. سپس جستجوی میزان همخوانی آن‌ها با پایگاه داده‌ها شامل بانک ژنی و پروژه پایگاه ژنی ریبوزومی انجام پذیرفت. در این مطالعه ۴ توالی (۲۶/۶۶ درصد از کلون‌ها) متشکل از کلون ۹، کلون ۳۶، کلون ۱۰ و کلون ۳۰ دارای شباهت ۹۴ درصدی با *Streptococcus bovis* بودند و ۳ توالی (۲۰ درصد از کلون‌ها) شامل کلون ۷، کلون ۱۹ و کلون ۳۳ با *Selenomonas ruminantium* همخوانی ۹۰ درصدی داشتند. همچنین ۲ توالی (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) متشکل از کلون ۱۶ و کلون ۳۲، ۸۹ درصد شبیه به *Megasphera elsdenii* بودند و ۲ توالی دیگر (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) نیز شامل کلون ۱۳ و کلون ۳ دارای شباهت ۹۶ درصدی با *Prevotella ruminicola* بودند. ۲ کلون (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) دیگر نیز شامل کلون ۲۷ و کلون ۵ با باکتری‌های کشت نیافته شکمبه گاو شباهت ۸۹ درصدی داشتند. از این ۱۵ توالی یک توالی (۶/۶۶ درصد از کلون‌ها) با *Lactobacillus plantarum*، ۹۰ درصد شباهت داشت و یک توالی باقیمانده نیز (۶/۶۶ درصد از کلون‌ها) دارای شباهت ۹۲ درصدی با *Prevotella multiformis* بود.

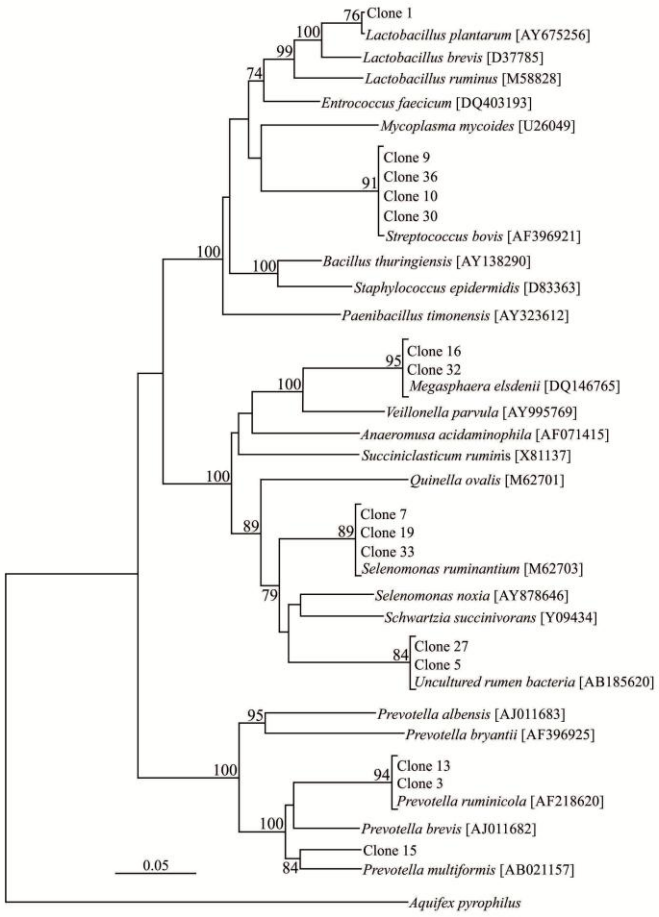
۲-آنالیز فیلوژنتیک کتابخانه کلون 16S rRNA باکتری‌ها

آنالیز فیلوژنتیک توالی‌های بدست آمده از کلون ژن 16S rRNA شکمبه بز در (تصویر – ۱) نشان می‌دهد که چیزی حدود ۸۰ درصد از کلون‌های جداسازی شده در این تحقیق متعلق به شاخه Firmicutes و ۲۰ درصد متعلق به شاخه Bacteroidetes بودند. یعنی در واقع کلون‌هایی که دارای شباهت با *Streptococcus bovis*، *Selenomonas ruminantium*، *Megasfera elsdenii*، Uncultured rumen bacteria و *Lactobacillus plantarum* بودند در شاخه *Firmicut* ها و باکتری‌هایی که شبیه به *Prevotella*

Archive of SID

www.SID.ir

ruminicola و *Prevotella multiformis* بودند در شاخه Bacteroidetes ها قرار می‌گیرند.



(نمودار ۴-۲) درخت فیلوژنتیک مربوط به توالی‌های ژن 16S rRNA باکتری‌های شکمبه بز

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق ما نشان می‌دهد که شکمبه بزهای ایرانی دارای طیف متفاوتی از گونه‌های باکتریایی با سایر نشخوارکنندگان در سایر نقاط دنیا نمی‌باشد. در این مطالعه ۱۲ کلون (۸۰ درصد توالی‌ها) متعلق به شاخه Firmicut ها و ۳ کلون متعلق به شاخه Bacteroidetes ها بودند. توزیع جمعیت‌های باکتریایی در شکمبه بزهای ایرانی تقریباً شبیه به این نسبت در مطالعاتی است که پیش از این بر روی اکولوژی میکروبی شکمبه انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط Han و همکاران (۲۰۱۵) بر روی بزها در سنین مختلف انجام گرفت نشان داده شده است که در گروه بزهای ۸۰ روزه Firmicute ها (۴۱/۰۱ درصد)، Synergistete ها (۳۶/۷۶ درصد)، Bacteroidete ها (۱۹/۷۰ درصد) شاخه‌های غالب بودند که این روند توزیع جمعیتی با افزایش سن به ازای هر ۱۰ روز تغییر یافت و نهایتاً در سن ۱۱۰ روزگی Bacteroidete ها با ۶۳/۹۶ درصد، Firmicute ها با ۱۷/۹۲ درصد، Proteobacteria با

www.SID.ir

۸/۰۵ درصد و Synergistete ها با ۷/۵ درصد شاخه‌های غالب در شکمبه بزها را تشکیل می‌دادند.

Patel و همکاران (۲۰۱۱) نیز در مطالعه‌ای که بر روی بزهای Surti هندوستان انجام دادند گزارش نمودند در این حیوانات که با خوراک مخلوطی از کنسانتره و علوفه تغذیه می‌شدند، ۳۵ درصد از کلون‌ها متعلق به شاخه Bacteroidete ها و ۳۳/۳۳ درصد متعلق به شاخه Firmicute ها بودند (۲۵). مقایسه نتایج این تحقیق با تحقیقات بالا نشان می‌دهد که علاوه بر وجود برخی تفاوت‌ها در میزان درصد توزیع جمعیت‌های باکتریایی و عدم وجود برخی شاخه‌ها در گزارش ما، با این حال می‌توان نتیجه گرفت که شاخه Firmicute ها و Bacteroidete ها در اکثر پستانداران شاخه غالب را تشکیل می‌دهند که مطابق با یافته‌های دیگران نیز می‌باشد.

در این تحقیق ۲۶/۶۶ درصد از کلون‌ها به *Streptococcus bovis* شبیه بودند. *Streptococcus bovis* یکی از ساکنین طبیعی دستگاه گوارش گاو، گوسفند، اسب و خوک می‌باشد (۱۴). این باکتری به طور گسترده‌ای به عنوان اصلی‌ترین باکتری تولید کننده اسید لاکتیک در گاو، گوسفند و اسب شناخته شده است (۲ و ۲۹). مشاهده این باکتری در این تحقیق می‌تواند تأیید کننده سطح بالای کنسانتره در جیره غذایی بزها باشد. سایر محققین نیز به حضور این باکتری در کتابخانه ژنی باکتری‌ها در توالی‌های جدا شده از دستگاه گوارش اشاره کرده‌اند.Sundset و همکاران (۲۰۰۷) به شباهت برخی از کلون‌های جدا شده از شکمبه گوزن‌های Svalbard به *Streptococcus bovis* اشاره کرده‌اند (۳۶). Petri و همکاران (۲۰۱۲) علاوه بر اشاره به حضور *Streptococcus bovis* در شکمبه گاوها، گزارش کردند که تغییرات جیره غذایی تاثیری بر جمعیت این باکتری نداشته است (۲۷). حضور *Streptococcus bovis* در دستگاه گوارش حیوانات دیگر مانند شترها نیز گزارش شده است (۹).

در این مطالعه ۲۰ درصد از توالی‌های بدست آمده که شامل ۳ کلون بودند به *Selenomonas ruminantium* شباهت داشتند. *Selenomonas ruminantium* یکی دیگر از گونه‌هایی است که معمولاً در شکمبه نشخوارکنندگانی که از جیره بر پایه غلات استفاده می‌کنند یافت می‌شود (۳۴). حضور این باکتری در شکمبه گیاهای تغذیه شده با برگ و چوب بامبو (۷)، در شکمبه گوساله‌های پرواری تیمار شده با ویرجینا مایسین (۱۱) و در شکمبه گاوهایی که جیره بر پایه کنسانتره و بدون علوفه استفاده کرده بودند گزارش شده است (۲۷) که می‌توانند تأیید کننده مشاهدات ما باشند.

۲ توالی (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) بازیافت شده از این گزارش شباهت ۹۰ درصدی را با *Megasphera elsdenii* نشان دادند. این باکتری عمدتاً در شکمبه نشخوارکنندگان جوان مانند گاو و گوسفند و در حیواناتی که جیره‌های با غلات زیاد دریافت می‌کنند مشاهده می‌شود (۳۴). همچنین این باکتری ممکن است در محتویات روده‌ای انسان‌ها و خوک‌ها نیز مشاهده شود (۲۲ و ۱۰).

۲ توالی دیگر نیز (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) در این تحقیق شبیه به *Prevotella ruminicola* و یک توالی نیز شبیه به *Prevotella multiformis* بودند. مطالعات بسیار زیادی به این موضوع اشاره کرده‌اند که جنس *Prevotella* فراوان‌ترین جنس در بین باکتری‌های موجود در شکمبه هستند. حتی مطالعات بر پایه روش‌های کشت نیز نشان دادند که گونه‌های جنس

Archive of SID

www.SID.ir

Prevotella بیش از ۵۰ درصد کل باکتری‌های شکمبه بزها را تشکیل می‌دادند (۴). یک مطالعه کمی نشان داد که جنس *Prevotella* ۴۲ تا ۶۰ درصد کل باکتری‌های شکمبه را تشکیل می‌دهد (۳۲) و مطالعه دیگری با استفاده از 16S rRNA gene pyrosequencing نشان داد که جنس *Prevotella* با دارا بودن ۵۲ درصد از کل جمعیت میکروبیوم شکمبه گاو فراوان‌ترین باکتری در این اکوسیستم می‌باشد (۱۶). این یافته‌ها با نتایج تحقیق ما مطابقت ندارد زیرا در این تحقیق جنس *Prevotella* تنها ۲۰ درصد باکتری‌های شناسایی شده را تشکیل می‌دادند و فراوان‌ترین جنس در بین توالی‌های شناسایی شده نبودند.

از بین گونه‌های مربوط به این جنس دو گونه *Prevotella ruminicola* و *Prevotella mutiformis* در توالی‌های شناسایی شده در این تحقیق مشاهده شدند.Pandya و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که ۸/۳۷ از کلون‌های شناسایی شده در شکمبه گاومیش‌های هندوستان متعلق به *Prevotella ruminicola* بودند (۲۴). همچنین حضور *Prevotella ruminicola* در شکمبه یاک‌ها و گایال‌ها نیز اشاره شده است (۷ و ۳۹). Patel و همکاران (۲۰۱۱) گزارش کردند که تنها ۲ کلون از ۶۰ کلون شناسایی شده متعلق به *Prevotella multiformis* در شکمبه بزهای هندوستان بودند (۲۵).Li و همکاران (۲۰۱۳) نیز به حضور *Prevotella mutiformis* در شکمبه گوزن‌های سیکا تغذیه شده با برگ بلوط اشاره کردند (۱۸).

تنها یک کلون از ۱۵ کلون شناسایی شده در این تحقیق شبیه به *Lactobacillus plantarum* بود که تنها در تعداد کمی از گزارشات مشاهده شده‌است.

۲ کلون (۱۳/۳۳ درصد از کلون‌ها) نیز شامل کلون ۲۷ و کلون ۵ با باکتری‌های کشت نیافته شکمبه گاو شباهت ۸۴ درصدی داشتند. کاملاً واضح است که بخش عمده‌ای از باکتری‌های دستگاه گوارش تا به حال کشت نشده و هنوز هم تعداد بسیار زیادی از گونه‌های غیر قابل کشت وجود دارند. سایر محققین نیز به حضور این گونه از باکتری‌های کشت نیافته در گزارشات خود از شکمبه بزها اشاره کرده‌اند (۱۲، ۲۵ و ۳۵).

بر اساس مطالعات ما، این تحقیق اولین گزارش در مورد بررسی تنوع جمعیت باکتریایی شکمبه نشخوارکنندگان در ایران است که با روشی بر پایه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و آنالیز کتابخانه ژن 16S rRNA بدست آمده از محتویات شکمبه انجام گرفته است. بررسی توالی‌های باکتریایی بدست آمده از شکمبه بزها نیز نشان داد که نتایج بدست آمده در راستای نتایج سایر محققین در کشورهای دیگر و در دام‌های دیگر است. با این وجود لازم است تا مطالعات بیشتری برای بررسی تنوع مولکولی میکروارگانیسم‌های شکمبه در نشخوارکنندگان در ایران انجام بگیرد تا بتوان تصور کامل‌تری از زیست توده میکروبی ساکن در دستگاه گوارش دام‌های ایران اعم از باکتری‌ها، آرکی‌ها، قارچ‌ها و تک‌یاخته‌ها بدست آورد.

منابع

۱- توکلیان، ج. (۱۳۷۸). نگرشی بر ذخایر ژنتیکی دام و طیور بومی ایران. با همکاری مراکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان‌ها و معاونت امور دام استان‌ها. کرج: موسسه تحقیقات علوم دامی کشور.

2. Al Jassim, R.A.M., Gordon, G.L.R., Rowe. J.B., (2003). The effect of basal diet on lactate-producing bacteria and the

Archive of SID

www.SID.ir

susceptibility of sheep to lactic acidosis. *Animal Science* **77:** 459–469.
3. An, D., Dong, X., Dong, Z. (2005). Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. *Anaerobe* **11:** 207–221.
4. Bekele, A.Z., Koike, S., Kobayashi, Y. (2010). Genetic diversity and diet specificity of ruminal Prevotella revealed by 16S rRNA gene-based analysis. *FEMS Microbiology Letters* **305:** 49–57.
5. Benson, D. A., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostelland, J., Wheeler. D. (2007). GenBank. *Nucleic Acids Research.* **35:** D1–D25.
6. Dehority, B.A., Tirabasso, P.A., Grifo, A.P. (1989). Most-probable-number procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Applied and Environmental Microbiology* **55:** 2789–2792.
7. Deng, D., Wanapat, M., Ma, S., Chen, J., Xi, D., He, T., Yang, Z., Mao. H. (2007). Phylogenetic analysis of 16S rDNA sequences manifest rumen bacterial diversity in gayals (*Bos Frontalis*) fed fresh bamboo leaves and twigs (*Sinarum dinaria*). *Asian-Australasian Journal of Animal Science* **20(7):** 1057– 1066.
8. Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39:** 783–791.
9. Ghali, M.B., Scott, P.T., Al Jassim, R.A.M. (2004). Characterization of Streptococcus bovis from the rumen of the dromedary camel and Rusa deer. *Letters in Applied Microbiology* **39:** 341–346.
10. Giesecke, D., Wiesmayr, S., Ledinek, M. (1970). *Peptostreptococcus elsdenii* from the caecum of pigs. *Journal of Genetic Microbiology* **64:** 123–126.
11. Guo, T.J., Wang, J.Q., Bu, D.P., Liu, K.L., Wang, J.P., Li, D., Luan, S.Y., Huo, X.K., (2010). Evaluation of the microbial population in ruminal fluid using real time PCR in steers treated with virginiamycin. *Czech Journal of Animal Science* **55(7):** 276–285.
12. Han, X., Yang, Y., Yan, H., Wang, X., Qu, L., Chen, Y. (2015). Rumen Bacterial Diversity of 80 to 110-Day-Old Goats Using 16S rRNA Sequencing. *PLOS ONE*. **10(2):** e0117811.
13. Hespell, R.B., Akin, D.E., Dehority, B.A. (1997). In: Mackie RI, White BA, Isaacson R (eds) Gastrointestinal microbiology, vol 2. New York: Chapman and Hall. pp. 59–186.
14. Hungate, R.E. (1966). The Rumen and Its Microbes. *Academic Press, New York*.
15. Hungate, R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in microbiology, Norris JR, Ribbons DW (Ed.) Vol. 3B. London and New York: Academic Press: pp. 117–132.
16. Jami, E., Mizrahi, I. (2012). Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals. *PlOS one*. 7: e33306.
17. Krause, D.O., Russell, J.B. (1996). How many ruminal bacteria are there? *Journal of Dairy Science* 79: 1467–1475.
18. Li, Z.P., Liu, H.L., Li, G.Y., Bao, K., Wang, K.Y., Xu, C., Yang, Y.F., Yang, F.H., Wright و A.D.G. (2013). Molecular diversity of rumen bacterial communities from tannin-rich and fiber-rich forage fed domestic Sika deer (Cervus nippon) in China. *BioMedCentral Microbiology* **13:** 151-158.
19. Mackie, R. I. (2002). Mutualistic fermentative digestion in the gastrointestinal tract: diversity and evolution.*Integr Comp Biol* **42:** 319–326.
20. Madden T.L, Tatusov, R.L., Zhan., J. (1996). Application of network BLAST server. *Methods in Enzymology* **266:** 131-141.
21. Maidak, B.L, Cole, J. R., Lilburn, T.G., Jr, C., Saxman P.R., Farris. R.J. (2001). The RDP-II (Ribosomal Database Project). *Nucl Acids Res* **29:** 173–174.
22. Marounek M., Fliegerova, K., Bartos, S. (1989). Metabolism and some characteristics of ruminal strains of *Megasphaera elsdenii*. *Applied and Environmental Microbiology* **55:** 1570–1573.
23. Ministry of Agricultural Jahad. (2001). Jahad of Agriculture in the mirror of statistics. *Ministry of Agricultural Jahad press*, Tehran Iran.www. maj.ir.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Pandya, P.R., Singh, K.M., Parnerkar, S., Tripathi, A.K., Mehta, H.H., Rank, D.N., Kothari, R.K., Joshi, C.G. (2010). Bacterial diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (Bubalus bubalis), assessed by 16S rDNA analysis. *Journal of Applied Genetics* **51(3):** 395–402.
25. Patel, J.K.M., Jhala, M.K., Soni, P., Shabir, N., Pandya, P.R., Singh, K. M., Rank, D.N., Joshi, C.G. (2011). Molecular characterization and diversity of rumen bacterial flora in Indian goat by 16S rDNA sequencing. *Vet scan journal* **6(1):** 77-87.
26. Paster, B.J., Dewhirst, F.E. Weisburg, W.G., Fraser, G. J., Tordoff, L.A., Hespell, R.B., Stanton, T.B., Zablen, L., Woese. C.R. (1991). Phylogenetic analysis of the spirochetes. *Journal of Bacteriology* **173:** 6101–6109.
27. Petri, R.M., Forster, R.J., Yang, W., McKinnon, J.J., McAllister, T.A., (2012). Characterization of rumen bacterial diversity and fermentation parameters in concentrate fed cattle with and without forage. *Journal of Applied Microbiology* **112:** 1152–1162.
28. Rawls, J.F., Samuel, B.S., Gordon, J.I. (2004). Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* **101:** 4596–4601.
29. Russell, J.B. (1991). Resistance of Streptococcus bovis to acetic acid at low pH: relationship between intracellular pH and anion accumulation. *Applied and Environmental Microbiology* **51:** 255–259.
30. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4:** 406–425.
31. Shin, E.C, Cho, K.M., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Kim, E.J., Kim, Y.K., Choi, B.R., An, J.M., Kang, J.M., Kim, H., Yun, H.D. (2004). Phylogenetic analysis of protozoa in the rumen contents of cow based on the 18S rDNA sequences. *Journal of Applied Microbiology* **97:** 378-383.
32. Stevenson, D.M., Weimer, P.J. (2007). Dominance of Prevotella and low abundance of classical ruminal bacterial species in the bovine rumen revealed by relative quantification real-time PCR. *Applied Microbiology Biotechnology* **75:**165–174.
33. Stewart C.S., Bryant, M.P. 1998. The rumen bacteria, pp. 21–76 in P. N. Hobson (Ed.): The Rumen Microbial Ecosystem. *Elsevier Applied Science*, London–New York.
34. Stewart, C.S., Flint, H.J., Bryant, M.P. (1997). The rumen bacteria. In: The Rumen Microbial Ecosystem. 2nd ED. (Ed. P. N. Hobson and C. S. Stewart). Chapman and Hall, New York, pp. 10-72.
35. Sun, Y.Z., Mao, S.Y., Yao, W., Zhu, W.Y. (2008). DGGE and 16S rDNA analysis reveals a highly diverse and rapidly colonising bacterial community on different substrates in the rumen of goats. *Animal* **2(3):** 391–398.
36. Sundset, M.A., Præsteng, K.E., Cann, I.K.O., Mathiesen, S.D., Mackie. R.I., 2007. Novel Rumen Bacterial Diversity in Two Geographically Separated Sub-Species of Reindeer. *Microbial Ecology* **54:** 424–438.
37. Sylvester, J.T., Karnati, S.K.R., Yu, Z., Morrison, M., Firkins, J.L. (2004). Development of an assay to quantify rumen ciliate protozoal biomass in cows using real-time PCR. *Journal of Nutrition* **134:** 3378–3384.
38. Thompson, J.D., Higgins D.G., Gibson. T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22:** 4673–4680.
39. Yang, L.Y., Chen, J., Cheng, X.L., Xi, D.M., Yang, S.L., Deng, W.D., Mao, H.M. (2010). Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals rumen bacterial diversity in Yaks (Bos grunniens). *Molecular Biology Reports* **37:** 553–562.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Identification of bacterial genetic diversity in the rumen of goat using 16S rRNA sequencing

Ashabi, S. M.[1], Chamani, M.[2*], Jafari-Khorshidi, K.[3], Aminafshar, M.[4]

1. Graduated of Department of Animal Sciences, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. Professor of Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
3. Assistant professor of Department of Animal Science, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran
4. Assistant professor of Department of Animal Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received Date: 2 October 2015 *Accepted Date: 3 December 2017*

Abstract

Genetic diversity of rumen bacterial population in goats was identified using a modern molecular culture independent method. It is probable that structure of bacterial colonies of goats show special characters and some differences, in comparison to the other ruminants because of their distinct diet and habitat. So that obtaining enough knowledge about bacterial diversity in various breeds of goats and their variations in response to diverse diets and also determination of bacterial diversity in various environments is essential. Therefore a mixture sample of whole rumen content of 12 native goats from the north of Iran was collected. PCR amplification was done by universal primers of bacteria and 16S rRNA gene clone library was sequenced. Samples were collected from herds that fed by a mixture of forage and concentrate. Totally fifteen sequences of 16S rRNA were analyzed. From these 15 sequences, 4 sequences showed similarity (94%) to Streptococcus bovis and 3 sequences were similar (90%) to Selenomonas ruminantium. Also 2 sequences were similar (89%) to Megasphera elsdenii and two others resembled (96%) to Prevotella ruminicola. Two sequences had similarity (89%) to uncultured bacteria from the rumen of cow. One sequence from these 15 sequences showed similarity (90%) to Lactobacillus plantarum and one last sequence was similar (92%) to Prevotella multiformis. This study is the first identification of rumen bacterial population diversity from the goats in Iran. The results of this study showed that bacterial population diversity in the rumen of goats is similar to other ruminants in other parts of the world. Although we isolated some sequences which are not clustered to common bacteria in digestive tract. It may as results of individual differences during sample collection, types of rations, methods of DNA extraction or used primers.

Keywords: Rumen, Genetic diversity, Goat

** Corresponding author: Chamani, M.*
Address: Department of Animal Sciences, Faculty of Agriculture and Natural Resources, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran. Tel: 021-44868539
E-mail: m.chamani@srbiau.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir