مجله دانش كشاورزی/ جلد 18 شماره 1/ سال 1387/ صفحه‌های 170-161

تشخيص و شمارش باكتري هاي سلولولتيك فيبروباكتر سوكسينوجنز (***Fibrobacter succinogenes***) و رومينوكوكوس فليوفسينز (***Ruminococcus flavefaciens***) در شكمبه گوساله هاي تغذيه شده با سطوح مختلف مخمر با استفاده از تكنيك **Quantitative-PCR**

بهنام صارمي[1*]، عباسعلي ناصريان[2] ، محمدرضا نصيري[2] و امير محمدي[2]

تاريخ پذيرش:85/10/2

1- مجتمع آموزش جهاد كشاورزي خراسان رضوي
2- گروه علوم دامي دانشكده كشاورزي دانشگاه فردوسي مشهد
*مسئول مكاتبه E-mail: behsa2001@yahoo.com

چكيده

به منظور انجام اين آزمايش از شكمبه هيجده گوساله ماده هلشتاين در سنين30، 60 و 90 روزگي نمونه گيري با استفاده از لوله مري از طريق دهان صورت گرفت. گوساله ها جيره پايه يكسان و سطوح مختلفي از مخمر ساكارومايسز سرويسيا (*Saccharomyces cerevisiae*) را به طور روزانه دريافت مي كردند (صفر، 0/5 و 1 درصد ماده خشك جيره پايه). نتايج نشان دادند كه تكنيك PCR توانايي تشخيص باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز را در سطح دو كپي از DNA خالص دارد. همچنين نشان داده شد كه با استفاده از اين روش مي توان به تشخيص باكتري هاي فيبروباكتر سوكسينوجنز و رومينوكوكوس فليوفسينز در مايع شكمبه پرداخت و قطعات توليد شده بر روي ژل آگارز پس از انجام الكتروفورز كاملاً با ساير گزارشات همخواني داشت. به علاوه نشان داده شد كه مي توان از روش Multiplex-PCR نيز براي تشخيص آنها استفاده نمود. نتايج نشان دادند كه با استفاده از Quantitative-PCR مي توان به شمارش تعداد باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز پرداخت و مشخص شد كه سطوح مختلف مخمر تاثير معني داري بر جمعيت باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز نداشته است. اثر دوره يا زمان نمونه گيري معني‌دار بود ($P< 0/0001$) و با توجه به مقادير مربوط به جمعيت اين باكتري در دوره هاي مختلف نمونه گيري (30، 60 و 90 روزگي) در هر يك از تيمارها به وضوح مي توان روند افزايشي جمعيت اين باكتري را در طي دوره رشد گوساله مشاهده نمود. به طور كلي به نظر مي رسد كه مي توان از روش Quantitative-PCR در شمارش باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز در شكمبه استفاده نمود.

واژه هاي كليدي: باكتري هاي سلولولتيك، شكمبه، Quantitative-PCR

Detection and Quantitation of Cellulolytic Bacteria *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* in Rumen of Holstein Calves, Using Quantitative PCR Technique

B Saremi[1*], AA Naserian[2], MR Nassiri[2] and A Mohmmadi[2]

[1]Education Center of Jihad-Keshavarzi, Animal Science Department, Mashhad, Iran
[2]Ferdowsi University of Mashhad, Animal Science Department, Mashhad, Iran
*Corresponding author: E-mail: behsa2001@yahoo.com

Abstract

Eighteen female Holstein calves were divided to three groups and received similar basal diet and different levels of yeast (*Saccharomyces cerevisiea*) daily (0, 0.5 and 1% DM basal diet). Rumen samples derived at 30, 60 and 90 days old. Results showed that PCR could detect Fibrobacter succinogenes up to two copy of pure DNA. Also it was shown that *Fibrobacter succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens* could be detected at rumen samples and introduced bands were similar to other studies. In addition multiple-PCR could be used for detection of them. Results showed that quantitative PCR could be used for enumeration of *Fibrobacter succinogenes* and showed that different levels of yeast had no significant effect on population of *Fibrobacter succinogenes.* Sampling time had a significant effect on population of *Fibrobacter succinogenes* ($P<0.0001$) and population of this bacteri in different sampling times (30, 60 and 90 days old) in each treatment increased by time. Generally, it seems that quantitative PCR technique could be used for enumeration of *Fibrobacter succinogenes* in rumen samples.

Key Words: Cellulolytic bacteria, Quantitative PCR, Rumen

مقدمه

نشخوارکنندگان موجوداتي هستند که وابستگي شديدي به همزيستي با ميکروب هاي شکمبه دارند به طوري که قسمت اعظم انرژي مورد نيازشان را از طريق جذب فرآورده هاي تخميري (اسيدهاي چرب) کسب مي کنند. همچنين 40 تا 80 درصد پروتئين مورد نياز خود را از جريان پروتئين ميکروبي بدست مي آورند. از آنجاييکه بازده مورد استفاده قرار گرفتن مواد غذايي توسط گروه هاي مختلف ميکروب هاي شکمبه يکسان نيست، لذا درك هر چه بيشتر عوامل موثر بر رشد و تغيير اين گروه‌هاي ميکروبي و همچنين بررسي تاثير دستکاري‌هاي تغذيه اي بر روي اين گروههاي ميکروبي بسيار مهم است. تعيين جمعيت گونه هاي ميکروبي شکمبه مي تواند منجر به قضاوت صحيحي در مورد

عملكـرد جيـره و افزودنـي هـاي خـوراكي در نـشخوار كنندگان گردد. فلـور ميكروبـي شـكمبه بـه شـدت تحـت تاثير: جيره، سن، استفاده از آنتي بيوتيك هـا و سـلامت حيوان ميزبان قرار داشته و بر اساس منطقه جغرافيايي، فـصل و رژيـم غـذايي تغييـر مـي كنـد (بريانـت 1959، هانگيت 1966، اوگيموتو و ايمـايي 1981 و اسـتوارت و بريانت 1988). فلور ميكروبي شكمبه توانـايي شكـستن فيبر گياهي را دارد، عملـي كـه حيـوان ميزبـان فاقـد آن است. سـلولز تركيـب عمـده موجـود در علوفـه اسـت و هضم و تخمير بعـدي آن توسـط ميكروارگانيـسم هـاي شكمبه بخش عمده انرژي مـورد نيـاز نـشخواركننده را تامين مي‌نمايد (وان سوئست 1994). هـضم شـكمبه اي سلولز در ابتدا توسط آنزيم هاي متصل به سطح سـلول انجام مي شود كـه توسـط چنـدين بـاكتري سـلولولتيك غالب موجود در شكمبه توليد مـي شـود (ويمـر 1992). سرعت و ميزان هضم فيبر در شكمبه تا حـد زيـادي بـه جمعيت اين باكتري هاي سـلولولتيك بـستگي دارد. اگـر چه ميكروارگانيسم هاي ساكن در شكمبه توسط محـيط ويژه شكمبه در طي ميليون ها سال انتخاب شده اند، اما چندين باكتري سلولولتيك در طـي ايـن انتخـاب برتـري يافتـه انـد. از ميـان بـاكتري‌هـاي سـلولولتيك شـكمبه، فيبروبـــاكتر سوكـــسينوجنز[1] ($ATCC\ 19169_T$) و رومينوكوكوس فليوفسينز[2] ($ATCC\ 19208_T$) از جمله مهمتـرين و بـاكتري هـاي غالـب نـوع سـلولولتيك در نشخوارکنندگان محسوب مي شوند (شي و ويمر1997). بنابراين تعيين جمعيت اين گونه هاي باكترياي مي تواند منجر به قـضاوت صـحيحي در مـورد عملكـرد خـوراك هـاي مـورد اسـتفاده گـردد. اكوسيـستم شـكمبه داراي شرايط خاصي است كـه زمينـه لازم جهـت رشـد انـواع ميكروب ها را فراهم مي كند ولي تغيير در ايـن شـرايط باعث تغييـر در كـارآيي دام مـي شـود. بـه طـور كلـي ميكروارگانيسم هـاي شـكمبه بـه سـه دسـته قـارچ هـا، پوتوزوآها و باكتري ها تقسيم مـي شـوند. عمـده تـرين گروه ميكروب هاي شكمبه بـاكتري هـا هـستند. تقـسيم بندي باكتري هـا بـر اسـاس خـصوصياتي چـون شـكل ظاهري، رنگ پذيري، حركت، حساسيت به اكسيژن، نوع محصول نهايي و نوع سوبستراي مـصرفي آنهـا انجـام مي شود بـه طوريكـه بـر اسـاس سوبـستراي مـصرفي باكتري هاي شكمبه به 11 گروه: تجزيه كنندگان سلولز، همـي سـلولز، نـشاسته، پكتـين، چربـي، پـروتئين، اوره، متان، اسيد لاكتيك و تانن تقسيم مي شـوند. در گذشـته تغييرات فلور ميكروبي با استفاده از روش هـاي مبتنـي بر كشت بررسي مـي گرديـد كـه روش هـايي سـخت و دشـوار و در خيلـي مـوارد فاقـد دقـت لازم بودنـد. محدوديت هاي اين روش ها و توسعه روش هاي دقيـق تر و حساس تر سبب توسعه علم ميكروبيولوژي شكمبه گرديـده اسـت (تاجيمـا و همكـاران 2001). امـروزه از روش هاي مختلفي براي شمارش باكتري هـاي شـكمبه استفاده مي شود. كشت ميكروبي از جمله قـديمي تـرين اين روش ها است و براي هر گونه باكتريـايي از محـيط كشت هاي مخصوص آن استفاده مي شود كه مي تواند بـه صـورت دسـته اي (بـاكتري هـاي سـلولولتيك و يـا آميلولتيك) و يا به صورت خاص به شمارش باكتري ها بپـردازد (وان سوئـسمت 1994). بتـازگي روش هـاي جديدي بر پايه بيوتكنولوژي طراحي شده اند و به طـور وسـيعي اسـتفاده مـي شـوند. PCR كمـي كـه از يـك استاندارد داخلي (PCR رقـابتي) اسـتفاده مـي نمايـد و قطعه مورد نظـر را بـه همـراه قطعـه اسـتاندارد در يـك زمان تكثيـر مـي نمايـد، يكـي از روش هـايي اسـت كـه گسترش زيـادي يافتـه اسـت. در ايـن روش تـواليي كـه آغازگر به DNA متصل مي شوند در استاندارد و هدف يكسان است (راي مايكرز 1993). استفاده از كاوشگرها

[1] *Fibrobacter succinogenes*
[2] *Ruminococcus flavefaciens*

با تعداد نوکلئوتید محدود و نشان دار که بر پایه 16S rRNA طراحي مي شوند نيز يكي از روش‌هايي است كه براي تعيين درصد نسبي هر يك از گونه هاي باكتريايي به كار مي‌رود (شي و همكاران 1997). روش Real-Time Quantitative PCR چندي است كه گسترش قابل توجهي يافته است، زيرا در اين روش از ترموسايكلري استفاده مي شود كه در طي واكنش PCR، غلظت محصول را لحظه به لحظه از طريق رسم نمودار گزارش مي‌كند (شي و همكاران 1997 و هيئت تحريريه 2001). به عنوان مثال تاجيما و همكاران (2001) به بررسي تغييرات در باكتري هاي شكمبه بر اساس تغييرات در جيره پرداختند و از روش هاي مختلفي به بررسي تغييرات جمعيت باكتريايي در شكمبه پرداختند. هدف اين مقاله نيز تشخيص و شمارش باكتري هاي سلولايتيك فيبروباكتر سوكسينوژنز و رومينوكوكوس فليوفسينز در شكمبه گوساله هاي هلشتاين در پاسخ به مصرف سطوح مختلف مخمر ساكارومايسز سرويسيا با به كار گيري تكنيك Quantitative-PCR است.

مواد و روش ها

براي انجام اين آزمايش از شكمبه هيجده گوساله ماده هلشتاين در سنين 30، 60 و 90 روزگي نمونه گيري صورت گرفت. گوساله ها جيره پايه يكسان (جداول 1 و 2) و سطوح مختلفي از مخمر ساكارومايسز سرويسيا[1] را به طور روزانه دريافت مي كردند (صفر، 0/5 و 1 درصد ماده خشك جيره پايه). در هر گروه آزمايشي 6 گوساله ماده هم سن و با وزن مشابه قرار داده شد. 10 ميلي‌ليتر مايع شكمبه با استفاده از لوله مري[2] و از طريق دهاني خارج و به سرعت به آزمايشگاه منتقل گرديد. ابتدا مايع شكمبه با سرعت 4264 دور در دقيقه سانتريفوژ (BECKMAN:J2-21M- آمريكا) گرديد.

جدول **1**- اجزاء كنسانتره شروع كننده مصرفي

اقلام خوراكي	درصد (بر اساس ماده خشك)
ذرت غلطك زده شده	**45/5**
جو غلطك زده شده	**8/5**
كنجاله سويا	**19**
ملاس چغندر قند	**4/35**
تفاله چغندر قند	**4/28**
سبوس گندم	**4/28**
آهك مرده	**0/86**
مكمل معدني و ويتاميني	**0/23**
برگ يونجه	**13**

سپس مايع رويي[3] جدا و با سرعت 12144 دور در دقيقه سانتريفيوژ شد. اين بار بخش رويي دور ريخته شد (ناصريان 1996) و رسوب با استفاده از 2 ميلي ليتر آب مقطر جدا شده و تا زمان استخراج DNA در 20- درجه سانتي گراد نگهداري شد. بدين وسيله باكتريهاي شكمبه اي مربوط به فاز مايع شكمبه استخراج گرديد. DNA ژنومي از 100 ميكروليتر محلول حاوي باكتري هاي شكمبه اي با روش بوم و همكاران (1990) تغيير يافته توسط شيخايف و همكاران (1995) استخراج گرديد. نمونه DNA خالصي از باكتري‌هاي سلولولتيك فيبروباكتر سوكسينوجنز و رومينوكوكوس فليوفسينز تهيه شده بود، كه داراي غلظت مشخصي بودند (آزمايشگاه دكتر فورانو، مركز تحقيقات كشاورزي فرانسه - INRA). از اين نمونه ها،

[1] *Saccharomyces cerevisiae*
[2] Stomach tube
[3] Supernatant

محلول هاي داراي تعداد كپي مشخصي از DNA تهيه و براي آزمون حساسيت در واكنش هاي PCR استفاده گرديد. توالي آغازگرها با استناد به توالي موجود در منابع تهيه گرديدند (تاجيما و همكاران 2001). مشخصات آغازگرها در جدول 3 آورده شده است. براي شمارش باكتري هاي موجود در مايع شكمبه از تعداد نسخه‌هاي DNA موجود در آن نمونه استفاده گرديد. بدين صورت كه رقت هاي دهدهي از نمونه DNA استخراج شده تهيه گرديد و براي هر يك از آنها واكنش PCR انجام شد. محلول ها به طور متوالي رقيق گرديدند تا در يكي از رقتها با چند بار تكرار واكنش PCR ، هيچ باندي به دست نيامد يا باند خيلي ضعيفي مشاهده شد. براي اطمينان دو رقت پايين تر نيز تست گرديد و در صورت عدم تشكيل باند، رقت مذكور به عنوان محلول حاوي دو كپي از DNA شناخته شد. بدين ترتيب عدد دو در ميزان رقت هاي ايجاد شده در باكتري و DNA ضرب شد و به عنوان تعداد كپي از DNA در نمونه اصلي گزارش شد كه نمايانگر تعداد باكتري موجود در مايع شكمبه استخراج شده بود (وانگ و همكاران 1996).

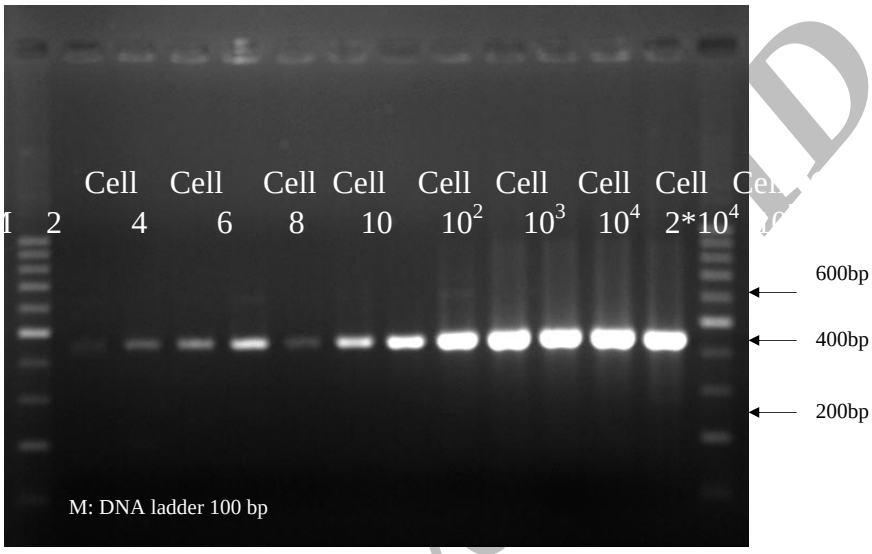
اعداد حاصل از آزمايش در قالب يك طرح كاملا تصادفي با استفاده از روش اندازه‌گيری‌های تكرار شده[1] آناليز شد. در اين طرح سه تيمار با هيجده گوساله در سه دوره مورد مقايسه قرار گرفتند. نتايج حاصل از آزمايش با رويه MIXED در نرم افزار SAS 9.1 آناليز گرديد (انستيتوي SAS). براي مقايسه ميانگين تيمارها از ميانگين حداقل مربعات[2] در سطح 5% خطا استفاده گرديد. واكنش هاي PCR و Multiplex-PCR در حجم 25 ميكروليتر و شامل 10 پيكومول از هر رشته آغازگر، 2/5 ميكروليتر بافر 10X، 2 ميلي مول $MgCl_2$، 250 ميكروموول از هر dNTP، 2 واحد آنزيم Taq Start Antibody و حدود 100 نانوگرم از DNA استخراج شده در دستگاه ترموسايكلر مدلMaxi-Gene (شركتStuart Scientific - USA) انجام گرديد. پس از يك مرحله دناتوره شدن در 95 درجه سانتي گراد به مدت 10 دقيقه، 35 سيكل واكنش هاي PCR شامل 95 درجه سانتي گراد به مدت 60 ثانيه، 62 درجه سانتي گراد به مدت 60 ثانيه و 72 درجه سانتي گراد به مدت 90 ثانيه تكرار گرديد و در انتها يك مرحله تكثير نهايي در 72 درجه سانتي گراد به مدت10 دقيقه اعمال گرديد (سايكي و همكاران 1988 و تاجيما و همكاران 2001). محصول PCR بر روي ژل آگارز 1/5% بارگيري شد و با استفاده از اتيديوم برمايد (1µg/ml) رنگ آميزي گرديد.

نتايج و بحث

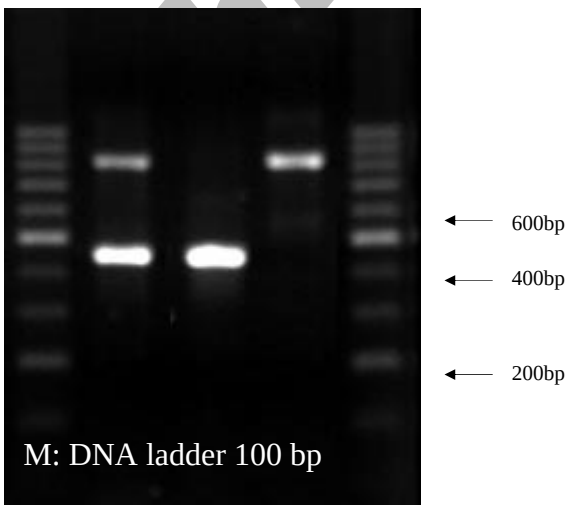
همانطور كه در شكل 1 نشان داده شده است، با افزايش رقت محلول استاندارد يا با كاهش تعداد كپي DNA در محلول، از پهناي باندها كاسته شده است و ضعيف ترين باند در دو كپي از DNA ديده مي شود و پس از آن ديگر باندي ديده نشد. لذا مشاهده ژل مذكور نشان مي دهد كه تكنيك PCR توانايي تشخيص باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز را در سطح دو كپي از DNA خالص دارد و اين روش براي تشخيص باكتري فوق در غلظت هاي بسيار پايين در محيط شكمبه، از كارآيي بالايي برخوردار است. شكل 2 نشان مي دهد كه با استفاده از تكنيك PCR مي توان به تشخيص باكتري هاي فوق پرداخت و قطعات توليد شده كاملاً با نتايج مطالعه تاجيما و همكاران (2001) مطابقت داشت. با اين تفاوت كه در آزمايش تاجيما و همكاران از تكنيك Real-Time PCR استفاده شده بود كه دقت و سرعت خوبي دارد اما ترموسايكلر مذكور، دستگاهي گران قيمت است و استفاده از آن نياز به مهارت دارد. اما در

[1] Repeated measurments
[2] Least Squares Means

روش ذكر شده در بالا، گرچه قدري زمان طولاني تر است اما تنها با آشنايي مختصر با روش PCR مي توان به شمارش باكتري هاي مختلف پرداخت. در اين آزمايش شمارش با موفقيت بر روي باكتري هاي فيبروباكتر سوكسينوجنز و رومينوكوكوس فليوفسينز انجام شد. به علاوه در شكل 2 مشاهده مي شود كه مي توان از روش Multiplex نيز براي تشخيص استفاده نمود و در يك واكنش PCR به تشخيص همزمان هر دو باكتري اقدام نمود. اين امر سبب مي شود تا در وقت و هزينه بيش از پيش صرفه جويي به عمل آيد و مي توان چند باكتري را در يك واكنش PCR مورد شناسايي قرار داد.



شكل **1** - تست حساسيت باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز $ATCC\ 19169_T$



شكل**2**- تشخيص دو باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز ($ATCC\ 19169_T$) (FS) و رومينوكوكوس فليوفسينز ($ATCC\ 19208_T$) (RF)

و از اين لحاظ مشكلات مربوط به روش هاي قديمي (تهيه محيط كشت هاي اختصاصي براي تك تك باكتري ها) را ندارد. پس از انجام واكنش هاي PCR بر روي رقت هاي مختلف تهيه شده از نمونه هاي DNA استخراجي از مايع شكمبه به دست آمده از گوساله ها، نتيجه محاسبات نشان داد كه سطوح مختلف مخمر تاثير معني داري بر جمعيت باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز در هر يك از دوره هاي نمونه گيري نداشته است. برخي معتقدند كه مخمر سبب تثبيت و تكثير اين باكتري در شكمبه مي گردد (چائوچيراس و فونت 2001) و برخي ديگر معتقدند كه مخمر هيچ تاثيري بر جمعيت باكتريايي شكمبه ندارد (چيكوت و بنچار 1998).

اثر دوره يا زمان نمونه گيري كاملا معني دار بود ($P< 0/0001$) و با توجه به مقادير مربوط به جمعيت اين باكتري در دوره هاي مختلف نمونه گيري (30، 60 و 90 روزگي) در هر يك از تيمارها به وضوح مي‌توان روند افزايشي جمعيت اين باكتري را در طي دوره رشد گوساله مشاهده نمود. لذا به نظر مي رسد كه با افزايش سن حيوان جمعيت اين باكتري در گوساله‌هايي كه كنسانتره شروع كننده را به همراه يونجه مرغوب استفاده مي نمايند به طور معني داري افزايش مي‌يابد (جدول 4). ديويس و دريكلي (1998) گزارش نمودند كه گوساله‌ها، ميكروارگانيسم‌هاي داراي توانايي هضم سلولز را در 3-1 هفتگي بعد از تولد بدست آوردند. باكتري هاي توليد كننده اسيد لاكتيک به تعداد زياد در سن 3-1 هفتگي يافت شدند و اين مقادير در 13-9 هفتگي به سطوح مشابه حيوان بالغ نزديک شد. باكتري هاي داراي توانايي رشد در شرايط هوازي و كلي فرم ها به تعداد زياد در 3-1 هفتگي ديده شدند اما اين گونه ها از نظر تعداد با افزايش سن حيوان كاهش مي يابند. گوساله هايي كه فقط شير مصرف كرده بودند جمعيت هاي وسيعي از باكتري هاي هوازي را در شكمبه داشتند. در شكمبه گوساله هاي در سنين 9-6 هفته، بسياري از باكتري هاي غالب شكمبه به خوبي تثبيت مي شوند. پروتوزآي مژک دار در شكمبه اين گوساله ها در طي 13 هفته اين تحقيق تثبيت نشده بود.

به طور كلي نتايج اين آزمايش نشان داد كه مي‌توان از تكنيك PCR به منظور شناسايي باكتري‌هاي رومينوكوكوس فليوفسينز و فيبروباكتر سوكسينوجنز و همچنين شمارش باكتري فيبروباكتر سوكسينوجنز با حساسيت بسيار بالا استفاده نمود. همچنين به نظر مي‌رسد كه انجام واكنش PCR و بررسي وجود يا عدم وجود باند در رقت هاي بينابيني (1 به 5 در مقابل 1 به 10) مي تواند دقت اين روش را بالا ببرد (در اين آزمايش رقت هاي دهدهي بررسي گرديد و فقط در برخي موارد از رقت يك پنجم استفاده شد).

سپاسگزاري

بدينوسيله از جناب آقاي دكتر فورانو و مركز تحقيقات كشاورزي فرانسه (INRA) به خاطر راهنمايي‌هاي علمي ايشان در طي مراحل مختلف انجام اين آزمايش و نيز در اختيار گذاشتن بخشي از مواد اوليه لازم در طي آزمايش كه به هيچ وجه امكان تهيه آنها نبود و منجر به انجام اين روش در كشور شد و همچنين از اساتيد محترم ژ. فونتي، ف. د. چاوچيراس و آر. آي. آمينوف به خاطر حمايت‌هاي علمي ايشان تشكر و سپاسگزاري مي گردد.

جدول **2** - ترکیب شیمیایي کنسانتره شروع کننده مصرفي

مواد مغذي	شاهد	**0/5** % مخمر	**1** % مخمر
ماده خشك (درصد ماده خشك)	**90/57**	**90/00**	**90/36**
انرژي خالص نگهداري[1](مگاکالري در کیلوگرم)	**1/91**	**1/91**	**1/91**
انرژي خالص رشد[1] (مگاکالري در کیلوگرم)	**1/27**	**1/27**	**1/27**
پروتئین خام (درصد ماده خشك)	**18/55**	**18/66**	**18/48**
فیبر نا محلول در شوینده اسیدي(ADF) (درصد ماده خشك)	**7/37**	**6/35**	**7/02**
فیبر نا محلول در شوینده خنثي (NDF) (درصد ماده خشك)	**20/24**	**20/85**	**20/51**
کلسیم (درصد ماده خشك)	**0/225**	**0/250**	**0/206**
فسفر (درصد ماده خشك)	**2/95**	**3/57**	**2/95**
ماده آلي (درصد ماده خشك)	**93/63**	**93/90**	**93/63**

1- اعداد گزارش شده محاسباتي مي باشند

جدول **3** - مشخصات آغازگرهاي استفاده شده براي انجام **PCR**

نوع باکتري	سویه	آغازگر		دماي اتصال	اندازه قطعه
		FORWARD	**REVERSE**	**(ºC)**	**(bp)[1]**
فیبروباکتر سوکسینوجنز	**ATCC 19169$_T$**	**5'-GGTATGGGATGAGCTTGC-3'**	**5'-GCCTGCCCCTGAACTATC-3'**	**62**	**445**
رومینوکوکوس فلیوفسینز	**ATCC 19208$_T$**	**5'-GGACGATAATGACGGTACTT-3'**	**5'GCAATCTGAACTGGGACAAT-3'**	**62**	**835**

1 : base pair

جدول **4** - مقایسه جمعیت باکتري فیبروباکتر سوکسینوجنز **ATCC 19169$_T$** در مایع شکمبه گوساله هاي تغذیه شده با سطوح مختلف مخمر (بر اساس لگاریتم در مبناي ده)

زمان نمونه گیري (روز)	تیمارها			SEM
	شاهد	**0/5**% مخمر	**1**% مخمر	
30	**10/38**[a]	**11/38**[a]	**10/88**[a]	**0/250**
60	**12/38**[b]	**11/88**[b]	**11/38**[b]	**0/250**
90	**13/38**[c]	**12/38**[c]	**12/38**[c]	**0/250**

میانگین هاي داراي حروف غیر مشترك در هر ستون تفاوت معني دار دارند

منابع مورد استفاده

Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wetheim-Van Dillen PME and Van Der Noordaa J, 1990. Rapid and simple method for purification nucleic acid. J of Clinical Microbiology 25: 495-503.

Bryant MP, 1959. Bacterial species of the rumen. Bacteriol Rev 23:125–153.

Chaucheyras F and Fonty G, 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive Saccharomyces cerevisiae CNCM I-1077. Reprod Nutr Dev 41:57–68.

Chiquette J and Benchaar C, 1998. Effect of diet and probiotic addition on chemical composition of free or particle-associated bacteria population of the rumen. Can J Anim Sci 78: 115-120.

Davis CL and Drackley JK, 1998. Development, nutrition and management of the young calf. (First ed). USA: Iowa state university Press/Ames, Iowa, USA.

Editorial. 2001. Real-Time Quatitative PCR Methods 25: 383-385.

Hungate RE, 1966. The rumen and its microbes. Academic Press, NewYork.

Naserian AA, 1996. Effect of dietary fat supplementation on food digestion and milk protein production by lactating cows and goats. Thesis (PhD), University of Queensland. AU.

Ogimoto K and Imai S, 1981. Atlas of rumen microbiology. Japan Scientific Society Press, Tokyo, Japan.

Raeymaekers L, 1993. Quantitative PCR: Theoretical considerations with practical implications. Anal Bioch 214: 582-585.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA, 1988. Primer-direct enzymatic ampilification of DNA with a termostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

SAS Institute, 2004. SAS user's guide. Statistics, Version 9.1. SAS Inst, Inc, Cary, NC.

Shaikhayev GO, Myakishev MV, Kapanadze GI, Georgirer GP and Bertashvili DR, 1995. Extraction of DNA from whole blood by silica gel. Istitute of Gene Biology, Moscow, Russia.

Shi Y, Odt CL and Weimer PJ, 1997. Competition for cellulose among three predominant ruminal cellulotic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. Appl Environ Microbiol 63:734-742.

Shi Y and Weimer PJ, 1997. Competition for cellubiose among three predominant ruminal cellulolytic bacteria under substrate-excess and substrate-limited conditions. Appl Environ Microbiol 63:743-748.

Stewart CS and Bryant MP, 1988. The rumen bacteria, Pp. 21–76. In: Hobson PN (ed), The rumen microbial ecosystem. Elsevier Applied Science London UK

Tajima K, Aminov RI, Nagamine T, Matsui H, Nakamura M and Benno Y, 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl Environ Microbiol 67:2766-2774.

Van Soest PJ, 1994. Nutritional ecology of ruminant. (2nd ed). Cornell University Press. Pp. 253-280.

Wang R, Cao W and Cerniglia CE, 1996. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl Environ Microbiol 62:1242-1247.

Weimer PJ, 1992. Cellulose degradation by ruminal microorganisms. Rev Biotechnol 12:189–223.