دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
نشریه پژوهش در نشخوارکنندگان
جلد پنجم، شماره اول، ۱۳۹۶
http://ejrr.gau.ac.ir

تاثیر سطح فیبر و نشاسته جیره و نوع فرآوری جو بر تغییر جمعیت نسبی میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش اسب با استفاده از Real time PCR

***عبدالحکیم توغدری[۱]، نورمحمد تربتی نژاد[۲]، تقی قورچی[۲]، آشورمحمد قره باش[۳]**

[۱]استادیار و [۲]استاد گروه تغذیه دام و طیور، دانشکده علوم دامی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۳]استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۵؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۴

چکیده

سابقه و هدف: درک و توصیف مکانیسم تجزیه در اکوسیستم هضمی اسب به صورت کلی و به ویژه بخش خلفی دستگاه گوارش، برای تغذیه صحیح ضروری است. علیرغم اهمیت آن برای وضعیت تغذیه‌ای میزبان، اهمیت تخمیر در بخش خلفی هنوز کاملاً درک نشده است و گزارشهای محدودی در مورد سهم جمعیت میکروبی بخش خلفی در احتیاجات ازتی و انرژی وجود دارد. اطلاعات کنونی در مورد اکولوژی و تنوع میکروبی دستگاه گوارش اسب سانان منحصراً بر پایه روش‌های کشت میکروبی است که اغلب پر زحمت و زمان بر بوده و ممکن است تنها بخشی از تنوع میکروبی دستگاه گوارش را نشان دهد. به هر حال روش‌های ملکولی پیشرفته از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ابزارهای غیر وابسته به کشت میکروبی هستند که با صحت و حساسیت بالایی کمیت انواع گونه‌های اختصاصی باکتریها و بعلاوه تعداد باکتری‌های کل را مشخص می‌کنند. هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیر سطح فیبر و نشاسته جیره و نوع فرآوری جو بر تغییر جمعیت نسبی میکروارگانیسمهای دستگاه گوارش اسب با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی بود.

مواد و روشها: به منظور انجام این پژوهش از هشت راس مادیان ۶ تا ۱۲ ساله ترکمن و با وزن بدن ۲۷۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم استفاده شد. جیره‌ها در دو وعده صبح و عصر و آب بصورت آزادانه در اختیار آنها قرار داده شد. از دو جیره پایه حاوی فیبر بالا و نشاسته بالا برای اسبها استفاده گردید. تیمارهای آزمایشی شامل: ۱- جیره فیبر

*نویسنده مسئول: Toghdory@yahoo.com

بالا به همراه جو پولکی شده با بخار ((A، 2- جیره فیبر بالا به همراه جو پلت شده ((B، 3- جیره نشاسته بالا به همراه جو پولکی شده با بخار (C) و ۴- جیره نشاسته بالا به همراه جو پلت شده (D) بود. آزمایش در قالب طرح چرخشی شامل چهار تیمار و چهار دوره انجام شد و هر دوره شامل ۱۴ روز عادت پذیری به جیره جدید و ۷ روز نمونه برداری بود. نمونه گیری از مدفوع اسبها در روز آخر هر دوره انجام شد و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان تعیین جمعیت میکروبی نگهداری شدند. استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم انجام شد. به منظور همسانه سازی ژنها، بعد از استخراج توالی آنها از بانک اطلاعاتی NCBI برای هر ژن یک جفت پرایمر (پرایمرهای پیشرو و پیرو) و با استفاده از نرم‌افزار AllelID طراحی شد. در نهایت تعیین کمیت نسبی باکتریها و پروتوزوآها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی انجام گردید.

یافته‌ها: جمعیت پروتوزوآ در جیره حاوی نشاسته بالا و جو پولکی شده بیشتر از سایر جیره¬ها بود و اختلاف معنی داری داشت. جیره نشاسته بالای حاوی جو پلت شده و جیره فیبر بالا حاوی جو پولکی نیز از لحاظ جمعیت نسبی پروتوزآ به ترتیب ۵۴ و ۱۰۶ برابر بالاتر از جیره فیبر بالا و جو پلت بودند. جمعیت نسبی استرپتوکوکوس بوویس در جیره نشاسته بالا و جو پولکی شده نسبت به سایر جیره ها افزایش معنی داری نشان داد. در این آزمایش جیره فیبر بالا به همراه جو پولکی باعث افزایش ۱۴۰۰۰۰۰ برابری سطح باکتری رومینوکوکوس فلاوفاشینز نسبت به جیره نشاسته بالا و جو پولکی گردید. اختلاف بین جیره فیبر بالا و جو پلت با جیره نشاسته بالا و جو پولکی نیز معنی دار بود و غلظت رومینوکوکوس فلاوفاشینز در جیره فیبر بالا جو پلت ۶۰۰۰ برابر جیره نشاسته بالا و جو پولکی بود. بالاترین غلظت باکتری فیبروباکتر سوکسینوژن در جیره فیبر بالا و جو پولکی مشاهده شد که نسبت به جیره نشاسته بالا و جو پولکی ۳۳۸۰۰ برابر بود. در مرحله بعد جیره فیبر بالا و جو پلت و جیره نشاسته بالا و جو پلت قرار داشتند که به ترتیب ۱۶۹۰ و ۱۴۷۰ برابر جیره نشاسته بالا و جو پولکی بود، ولی این دو جیره از لحاظ غلظت باکتری فیبروباکتر سوکسینوژن باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از جیره حاوی نشاسته بالا و جو پولکی باعث افزایش جمعیت نسبی استرپتوکوکوس بوویس و جمعیت پروتوزوآ می گردد.

واژه‌های کلیدی: فرآوری جو، جمعیت نسبی میکروارگانیسم، اسب، Real time PCR

مقدمه

درک و توصیف مکانیسم تجزیه در اکوسیستم هضمی اسب به صورت کلی و به ویژه بخش خلفی دستگاه گوارش، برای تغذیه صحیح ضروری است. علیرغم اهمیت آن برای وضعیت تغذیه‌ای میزبان، اهمیت تخمیر در بخش خلفی هنوز کاملاً درک نشده است و گزارشهای محدودی در مورد سهم جمعیت میکروبی بخش خلفی در احتیاجات ازتی و انرژی وجود دارد. اسب‌ها گیاهاخواران چراکننده آزاد می‌باشند که برای مصرف مقدار بالایی فیبر در جیره سازگار شده‌اند (۱۰). امروزه بسیاری از اسب‌ها با افزایش استفاده از آنها در مسابقات ورزشی، برای دوره طولانی در اصطبل نگهداری شده و دو یا سه بار در روز با خوراک‌های علوفه‌ای بعلاوه کنسانتره‌ای تغذیه می‌شوند. بخش علوفه‌ای جیره در اکثر اوقات حاوی انرژی کم و یا متوسط و سطوح متغیری از فیبر و پروتئین می‌باشد. این روش مدیریت تغذیه اهمیت بسزایی بر استفاده مواد مغذی از علوفه و کنسانتره جیره در کل دستگاه گوارش و به ویژه در بخش خلفی دارد (۴،۱۹).

روده بزرگ (بخش خلفی) اسب از لحاظ آناتومیکی برای تطبیق دادن میکروارگانیزمهای تجزیه کننده و تخمیرکننده پلی ساکاریدهای ساختمانی دیواره سلولی گیاهان سازگار شده‌اند و در مقابل هضم پیش سکومی مقاوم هستند. تخمیر خوراک در بخش خلفی دستگاه گوارش منتج به تولید اسیدهای چرب فرار می‌شود که می‌تواند انرژی قابل هضم مصرفی حیوان را تامین نماید به ویژه در اسب‌های که جیره‌های با فیبر بالا مصرف می‌کنند. مشخص شده است که جیره‌های بر پایه فیبر شرایط تخمیر نرمالی را در روده بزرگ مهیا می‌کنند، در مقابل جیره‌های با سطوح بالای کنسانتره (نشاسته) می‌تواند برای نگه داری هموستازی بخش خلفی دستگاه گوارش مضر باشد و میتواند باعث بسیاری از اختلالات متابولیکی از قبیل اسیدوز و لنگش شود (۶).

جولیاند و همکاران (۲۰۰۱) در آزمایشی اثر سه سطح علوفه به کنسانتره (۱۰۰ درصد علوفه، ۷۰ به ۳۰ و ۵۰ به ۵۰ درصد علوفه به کنسانتره) را بر فعالیت و جمعیت میکروبی دستگاه گوارش اسب بررسی کردند. این محققین اظهار نمودند که با جیره کنسانتره‌ای نسبت به جیره علوفه‌ای غلظت کل باکتری‌ها در روده بزرگ افزایش یافت، در صورتی که جمعیت باکتریهای سلولتیک کاهش یافت. با افزایش نسبت کنسانتره در جیره تراکم باکتری‌های استفاده کننده از لاکتات، لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس در کولون افزایش یافت ولی بر جمعیت باکتریایی سکوم تاثیری نداشت. این تغییرات میکروفلورا با کاهش معنی دار pH روده‌ای و کاهش نسبت استات+بوتیرات به پروپیونات و افزایش غلظت لاکتات

همراه بود. لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس‌ها عمده باکتری‌های استفاده کننده از نشاسته هستند که تحت شرایط اسیدی رشد می‌کنند. ازدیاد این جمعیت آمیلولتیکی با تجمع لاکتات که محصول نهایی تخمیر است همراه می‌باشد. در آزمایش جولیاند و همکاران (۲۰۰۱) مشاهده شد که غلظت لاکتات در جیره ۵۰:۵۰ درصد علوفه به کنسانتره ۱۰ برابر بیشتر از جیره ۱۰۰ درصد علوفه بود. با تغذیه جیره علوفه‌ای غلظت لاکتات در سکوم و کولون مشابه بود.

اطلاعات کنونی در مورد اکولوژی و تنوع میکروبی دستگاه گوارش اسب سانان منحصراً بر پایه روش‌های کشت میکروبی است که اغلب پر زحمت و زمان بر بوده و ممکن است تنها بخشی از تنوع میکروبی دستگاه گوارش را نشان دهد. به هر حال روش‌های ملکولی پیشرفته از قبیل واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی ابزارهای غیر وابسته به کشت میکروبی هستند که با صحت و حساسیت بالایی کمیت انواع گونه‌های اختصاصی باکتریها و بعلاوه تعداد باکتری‌های کل را مشخص می‌کنند (۹). گزارشات محدودی در مورد تعیین تنوع میکروبی روده بزرگ اسب با استفاده از روش‌های ملکولی مرسوم مانند واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نقطه انتهایی[۲] یا با استفاده از الیگونوکلئوتید وجود دارد، با این مطالعات نشان داده شد باکتریهای فیبرولتیک مانند رومینوکوکوس فلاوفشنز و *فیبروباکتر سوکسینوژن* غالب هستند (۱۷). در مطالعات اولیه که بخش خلفی دستگاه گوارش را بررسی نمودند، برخی محققین به منظور محاسبه افزایش ماده خشک در طول دستگاه گوارش، ماده آزمایشی را در خلا منجمد نمودند، در حالی که دیگر محققین DNA را از ماده آزمایشی منجمد شده استخراج کردند. به هر حال این نامشخص است که اگر روش نگه داری بر نتایج حاصله از روش PCR تاثیر می‌گذارد، آیا این موضوع در تفسیر نتایج حاصله باید لحاظ شود یا نه (۲۱). بعلاوه، هیچگونه اطلاعات منتشر شده در مورد شناسایی یا تعیین باکتریهای دستگاه گوارش با استفاده از تکنولوژی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی که خیلی حساس تر و دقیق تر از روش مرسوم واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در نقطه انتهایی است وجود ندارد. روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی اخیراً برای مطالعه تغییرات جیره روی جمعیت باکتریایی شکمبه و دستگاه گوارش اطفال استفاده شده است. همچنین مطالعات گذشته که تنوع میکروبی و خصوصیات تخمیر دستگاه گوارش اسب سانان را بررسی نمودند، معمولاً حیوانات کشتار شده و یا جراحی شده را برای این

2- End-Point PCR

منظور استفاده کردند. در حالی که این روش‌ها اطلاعات خوبی از اکوسیستم میکروبی دستگاه گوارش ارائه می‌دهند، می‌تواند پر هزینه نیز باشد (۲۰). روش‌های ملکولی نوین که از لحاظ هزینه نیز بصرفه می‌باشد از نظر رفتار شناسی نیز مورد قبول محققین است. پتر و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی باکتری‌های فیبرولیتیک *رومینوکوکوس فلاوفشنز* و *فیبروباکتر سوکسینوژن* و باکتری غیر فیبرولیتیک *استرپتوکوکوس بوویس* را در محتویات سکوم، کولون شکمی و پشتی و رکتوم تعیین کردند. این محققین از نمونه‌های منجمد شده و لئوفلیزه[3] شده استفاده کردند و اظهار نمودند که در هر دو نمونه باکتری‌ها مورد نظر به طور معنی داری در سکوم نسبت به کولون پشتی و رکتوم کمتر بود. در نمونه‌های منجمد شده سطح باکتری‌های مورد نظر بین کولون شکمی و پشتی و رکتوم یکسان بود، اما در نمونه لئوفلیزه شده بطور معنی داری سطوح باکتریها در کولون پشتی و رکتوم بالا بود.نمونه‌های منجمد شده حاوی سطوح نابرابری از باکتریهای مورد نظر بود و رومینوکوکوس فلاوفشنز > *فیبروباکتر سوکسینوژن* > *استرپتوکوکوس بوویس* بود، در حالی که در نمونه‌های لئوفلیزه شده *رومینوکوکوس فلاوفشنز* دارای مقادیر بالاتری نسبت به *فیبروباکتر سوکسینوژن* و *استرپتوکوکوس بوویس* بود. رومینوکوکوس فلاوفشنز > *فیبروباکتر سوکسینوژن* در نمونه لئوفلیزه نسبت به نمونه منجمد بالاتر بود ولی *استرپتوکوکوس بوویس* تفاوت معنی داری بین دو نمونه نشان نداد. اطلاعات حاصله از این آزمایش نشان داد حداقل برای این باکتری ها، نمونه مدفوع بهترین مدل برای مطالعه اکوسیستم باکتریایی در داخل کولون است.

مواد و روشها

حیوانات مورد استفاده در آزمایش

به منظور انجام این پژوهش از هشت راس مادیان ۶ تا ۱۲ ساله ترکمن و با وزن بدن ۲۷۰ تا ۳۰۰ کیلوگرم استفاده شد. هر یک از اسبها در جایگاه انفرادی ۶×۵ متر مربع نگه داری شدند. بستر اسب‌ها از کود حیوانی خشک و تراشه چوب بود. جیره‌ها در دو وعده صبح و عصر (ساعت ۸ صبح و ۶ عصر) و آب بصورت آزادانه در اختیار آنها قرار داده شد. مقدار مورد نظر کنسانتره به صورت جداگانه در در دو وعده صبح و عصر در اختیار آنها قرار داده شد. اجزاء مواد خوراکی و مقدار آنها در جدول شماره ۱ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی به شرح زیر بود: ۱- جیره فیبر بالا به همراه جو

3- Lyophilized

پولکی شده با بخار (A)، ۲- جیره فیبر بالا به همراه جو پلت شده (B)، ۳- جیره نشاسته بالا به همراه جو پولکی شده با بخار (C) و ۴- جیره نشاسته بالا به همراه جو پلت شده (D). این آزمایش در قالب طرح چرخشی شامل چهار تیمار و چهار دوره با هشت راس اسب (۱۵) انجام شد که نحوه چرخش تیمارها در جدول ۲ آمده است. هر دوره شامل ۱۴ روز عادت پذیری به جیره جدید و ۷ روز نمونه برداری بود.

جدول ۱- جیره مورد استفاده برای اسب‌ها در طول آزمایش

Table 1.The ration used for horses during the experiment

جیره فیبر بالا High fiber ration	جیره نشاسته بالا High starch ration	مواد خوراکی Feed ingredients
5.94	20	دانه جو (Barley grain)
5	19.63	دانه ذرت (Corn grain)
3	3	کنجاله سویا (Soybean meal)
5	5	زبره گندم (Wheat middling)
2.97	5.51	تفاله چغندرقند (Sugar beet pulp)
10	15.72	سبوس گندم (Wheat bran)
2	2	مکمل مواد معدنی و ویتامینی (Vitamin and Mineral Supplement)
1.5	2	کربنات کلسیم (Calcium carbonate)
0.8	0.8	نمک (Salt)
25.2	11.7	کاه گندم (Wheat straw)
38.59	14.64	یونجه خشک (alfalfa hay)
	مواد مغذی (Nutrients)	
2.21	2.67	انرژی قابل هضم (Digestible energy) (Mcal/kg)
12	12	پروتئین خام (Crud protein) (%)
11.6	30	نشاسته (Starch) (%)
1.03	1	کلسیم (Calcium)(%)
0.42	0.55	فسفر (Phosphor)(%)
41	30.7	فیبر نامحلول در شوینده خنثی (NDF)(%)
26	16	فیبر نامحلول در شوینده اسیدی (ADF) (%)

جدول ۲- نحوه چرخش تیمارها در دوره‌های مختلف

Table 2.change of treatments in different periods

شماره اسب Horse number		۱-۲	۳-۴	۵-۶	۷-۸
دوره های آزمایشی Experimental period	دوره اول(First period)	A	B	C	D
	دوره دوم (Second period)	B	A	D	C
	دوره سوم (Third period)	C	D	A	B
	دوره چهارم (Fourth period)	D	C	B	A

تعیین جمعیت باکتری‌ها و پروتوزآها با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی[۴]

نمونه گیری از مدفوع

نمونه گیری از مدفوع اسبها در روز آخر هر دوره از نمونه‌های تازه مدفوع بعد از خوراک‌دهی صبح انجام شد. بعد از نمونه‌گیری نمونه ها در داخل پلاستیک‌های مخصوص قرار داده شد و سریعاً به آزمایشگاه منتقل شده و در داخل نیتروژن مایع (۱۹۶- درجه سانتی‌گراد) منجمد و در فریزر ۸۰- درجه سانتیگراد تا زمان تعیین جمعیت میکروبی نگهداری شدند.

استخراج DNA به روش فنل-کلروفرم

در این آزمایش از روش فنل-کلروفرم برای استخراج DNA استفاده شد. این روش یکی از روش‌های استخراج است که بیشترین کاربرد را یافته است و DNA هایی که با این روش استخراج می‌شوند از خلوص خوبی برخوردار است. پس از یخ گشایی نمونه‌ها، به ازای هر یک گرم نمونه چهار سی سی آب مقطر اضافه شد و نمونه ها به مدت ۵ دقیقه بهم زده شدند و سپس یک میلی لیتر از نمونه را داخل میکروتیوپ ریخته و با ۶۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده، رسوب حاصل را داخل مخلوط زیر حل گردید:

4- Real-Time PCR

۶۰۰ میکرولیتر تامپون لیز

۱۳ میکرولیتر SDS (۲۰ درصد)

۳ میکرولیتر پروتئیناز K (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

۵۰ میکرولیتر لیزوزیم (۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)

بعد از اینکه رسوب با استفاده از سمپلر به خوبی در محلول‌های فوق مخلوط گردید، درب میکروتیوپ را بسته و داخل یک بن ماری ۶۰ درجه سانتیگراد برای یک ساعت انکوبه شد. پس از آن میکروتیوپ را از بن ماری خارج و اجازه داده شد تا سرد شود و به دمای اتاق برسد. بر روی لیز باکتری ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل کلروفرم- ایزوآمیل الکل اضافه نموده و درب میکروتیوپ را بسته و تکان داده تا اینکه یک سوسپانسیون شیری رنگ حاصل شود، پس از آن ۱۰ دقیقه در ۹۰۰۰ دور سوسپانسیون را سانتریفیوز نمودیم. با استفاده از یک سمپلر فاز رویی را به یک میکروتیوپ دیگر انتقال داده و مجدداً ۶۲۰ میکرولیتر مخلوط فنل کلروفرم_ایزوآمیل الکل اضافه کرده و مراحل بالا بار دیگر تکرار شد. در این مرحله پس از جداسازی فاز رویی ۶۲۰ میکرولیتر کلروفرم به میکروتیوپ افزوده و با ۹۰۰۰ دور به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. این مرحله برای حذف مقادیر ناچیز فنل انجام می‌گیرد. پس از خروج میکروتیوپ از سانتریفیوژ و جداسازی فاز رویی به آن ۱-۱/۵ میلی‌لیتر اتانل سرد خالص اضافه کرده، با واژگون کردن مکرر لوله مخلوط را بهم زده تا اینکه رشته‌های DNA ظاهر گردد. DNA را به وسیله سانتریفیوژ در ۹۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه به دست آورده و مایع رویی خارج شد. پس از آن میکروتیوپ را به مدت ۳۰ دقیقه در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه و کاملاً خشک گردید. DNA در ۵۰ تا ۲۰۰ میکرولیتر بافر TE حل و در طول شب در حرارت اتاق بر روی شیکر قرار گرفت تا DNA کاملاً در بافر حل شد. سپس نمونه DNA های استخراج‌شده در فریزر ۲۰- درجه سانتیگراد تا زمان انجام آزمایشات نگهداری شد.

طراحی پرایمر برای هر یک از ژنها

به منظور همسانه سازی ژنها، بعد از استخراج توالی آنها از بانک اطلاعاتی NCBI برای هر ژن یک جفت پرایمر (پرایمرهای پیشرو و پیرو) و با استفاده از نرم‌افزار AllelID طراحی شد. پرایمرهای طراحی شده به لحاظ بررسی قرابت و اختصاصیت با نرم‌افزار BLAST مورد ارزیابی قرار گرفتند و

به منظور سنتز به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شد. این توالی‌ها در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳-توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR

Table 3. Sequence of primers used in Real-Time PCR

میکروارگانیسم	پرایمر	توالی
فیبروباکترسوکسینوژن *Fibrobacter succinogen*	پرایمر پیشرو Forward primer	5′ - GGCCCTTACATCCTGGGCTA - 3′
	پرایمر پیرو Reverse primer	5′ - CTTTAGGCGCTTGCACGACT - 3′
رومینوکوکوس فلاوفاشینز *Ruminococcus flavefaciens*	پرایمر پیشرو Forward primer	5′ -GATGGGCTCGCGTCTGATTA- 3′
	پرایمر پیرو Reverse primer	5′ -GCCGGAGCTTCCTCCTAAAG- 3′
پروتوزآها[5] Protozoa	پرایمر پیشرو Forward primer	5′ - GCTTTCGATGGTAGTGTATT - 3′
	پرایمر پیرو Reverse primer	5′ - CTTGCCCTCTAATCGTACT - 3′
استرپتوکوکوس بوایس *Streptococcus bovis*	پرایمر پیشرو Forward primer	5′ -GCGGCTCTCTGGTCTGTAAC - 3′
	پرایمر پیرو Reverse primer	5′ -TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT- 3′
کل باکتری‌ها[6] Total Bacteria (ژن خانه‌دار[7])	پرایمر پیشرو Forward primer	5′ -GCGGCTCTCTGGTCTGTAAC - 3′
	پرایمر پیرو Reverse primer	5′ -TAAGGTTCTTCGCGTTGCTT- 3′

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز استاندارد جهت تأیید پرایمرها

برای انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، مواد مورد نیاز طبق دستورالعمل زیر مخلوط گشته (در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر برای هر نمونه) و بعد از انجام واکنش زنجیره‌ای، محصول آن جهت تأیید بر ژل الکتروفورز بارگذاری گردید. دمای تنظیم‌شده دستگاه بر اساس نقطه ذوب پرایمرها بود. مواد موردی نیاز شامل یک میکرولیتر بافر(1X)، ۰/۳ میکرولیتر کلرید منیزیم، ۰/۲ میکرولیتر dNTP، نیم واحد

5- Protozoa
6- Total bacteria
7- House keeping gene

آنزیم Taq polymeras ۶میکرولیتر آب دو بار تقطیر، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیشرو، ۰/۵ میکرولیتر پرایمر پیرو، ۱ میکرولیتر نمونه DNA. بود و پس از تهیه مخلوط واکنش تیوب‌ها در دستگاه واکنش زنجیره‌ای پلیمراز قرار داده شدند.

تعیین کمیت نسبی برخی از باکتری‌ها و پروتوزوآها بـا اسـتفاده از روش واکـنش زنجیـره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی

ابتدا تیوپ‌های مخصوص RT-PCR یا QPCR، در پوش‌های مربوطه و تیوپ‌های لازم برای تهیه مخلوط PCR مدت ۲۰ دقیقه اتوکلاو شدند. سپس سایبرگرین، پرایمرها و دیگر مواد مورد نیاز از فریزر خارج شد تا یخ‌گشایی شوند. پس از یخ‌گشایی، مخلوط واکنش برای هر نمونه (1x) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و شامل،۱۰ میکرولیتر مخلوط سایبر فرمتاز، نیم میکرولیتر پرایمر پیشرو، نیم میکرولیتر پرایمر پیرو، هشت میکرولیتر آب دوبار تقطیر و یک میکرولیتر نمونه DNA تهیه شد. برای هر نمونه سه تکرار تکنیکی برای ژن اختصاصی و سه تکرار برای ژن خانه‌دار در نظر گرفته شد. سپس درپوش تیوپ‌ها بسته شد و تیوپ‌ها در داخل دستگاه قرار داده شدند. آنگاه پس از وارد نمودن برنامه مورد نظر، دستگاه شروع به کار کرد. به این ترتیب واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی جهت ارزیابی الگوی تظاهر ژن‌های مورد نظر با استفاده از تکنولوژی رنگ سایبرگرین (که به مولکول‌های DNA دو رشته‌ای متصل می‌شود و در محل اتصال، سیگنال فلورسنت منتشر می‌نماید) در دستگاه iQ5 که قادر است ارزیابی را در زمان واقعی انجام دهد انجام گردید. این دستگاه در هر چرخه از فعالیت قادر است که مقدار محصول واکنش پلیمراز را نشان دهد. داده‌های به دست آمده نسبت به کمیت کل باکتری‌های موجود در نمونه تجزیه و تحلیل شدند.

تجزیه داده‌های مولکولی

داده‌ها به صورت پلات‌های تکثیر هلالی می‌باشد که در آن میزان فلورسنت در مقابل تعداد سیکل پلات می‌شود. از چرخه‌ی آستانه[8] جهت برآورد مقدار اولیه‌ی مولکول هدف در هر نمونه استفاده می‌شود. چرخه‌ی آستانه سیکلی است که در آن اولین افزایش قابل تشخیص در فلورسنت اتفاق می‌افتد.

[8]- Threshold cycle

خط پایه[9]: این خط معمولاً در فاصله‌ی چرخه‌های سه تا ۱۵ دیده می‌شود، جایی است که افزایش قابل تشخیصی در مقدار فلورسنت مربوط به محصولات واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز دیده نمی‌شود. تعداد چرخه‌های مورد استفاده برای محاسبه خط پایه قابل تغییر است و در مواردی که مقدار زیادی مولکول هدف استفاده می‌شود بایستی کاهش یابد. این خط، از فلورسنت حاصل از محصولات واکنش زنجیره-ای پلی‌مراز کسر می‌شود.

محاسبه‌ی تغییرات بیان ژن‌ها

اندازه‌گیری مقادیر افزایش یا کاهش میزان بیان ژن‌های مورد بررسی در تیمارهای مختلف، در نرم‌افزار REST با استفاده از داده‌های خروجی از نرم‌افزار iQ5 انجام گرفت. روش مقایسه نسبی و ΔΔCT مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر به دست آمده نمایانگر نسبت کاهش و.یا افزایش تعداد رونوشت‌ها در هر نمونه در مقایسه با نمونه‌ی کنترل بود.

آنالیزها و مدل آماری آزمایش:

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از واکنش کمی زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی با استفاده از نرم‌افزار REST انجام گرفت. آنالیز آماری با استفاده از رویه Mixed در نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ (۲۰۰۲) انجام گرفت. مدل آماری و فرضیات آزمایش بصورت زیر بوده و مقایسات میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری پنج درصد انجام شد.

$$Y_i = \mu + T_i + e_i$$

در این مدل:

Y_i= متغیر وابسته

μ= میانگین کل

T_i= اثر تیمار

e_i= اثرات باقی مانده (خطای آزمایشی)

[9]- Baseline

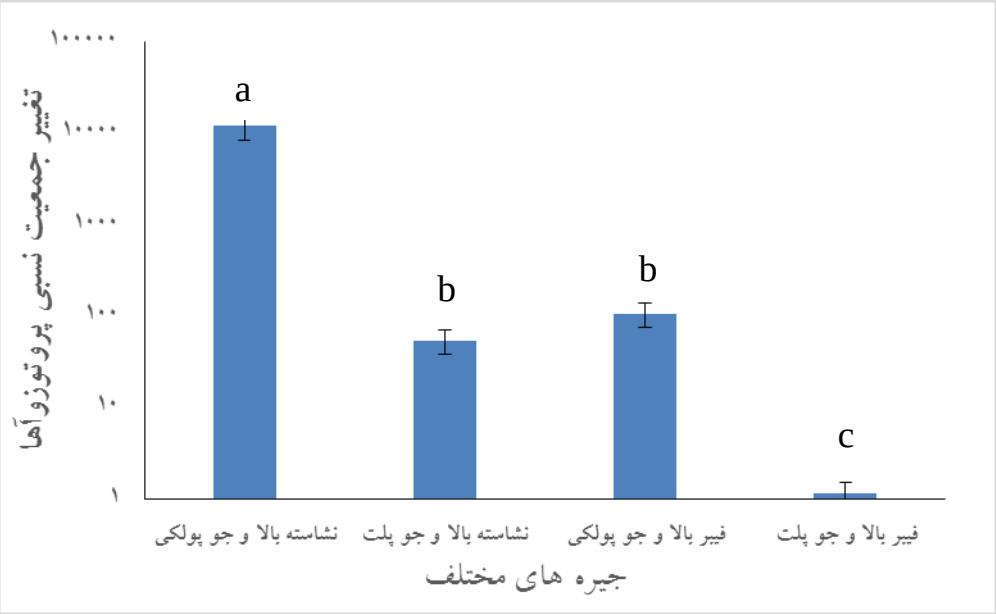
نتایج و بحث:

تغییر جمعیت نسبی پروتوزوآها دستگاه گوارش اسب در جیره‌های مختلف در شکل ۱ نشان داده شده است. جمعیت پروتوزوآ در جیره حاوی نشاسته بالا و جو پولکی شده بیشتر از سایر جیره‌ها بود و اختلاف معنی داری داشت (P<۰/۰۵)، و نسبت به جیره فیبر بالا و جو پلت ۱۲۱۴۱ برابر بود. جیره نشاسته بالای حاوی جو پلت شده و جیره فیبر بالا حاوی جو پولکی نیز از لحاظ جمعیت نسبی پروتوزآ به ترتیب ۵۴ و ۱۰۶ برابر بالاتر از جیره فیبر بالا و جو پلت بودند (P<۰/۰۵). نتایج این آزمایش نشان داد که در جیره نشاسته بالا جمعیت پروتوزوآ نسبت به جیره فیبر بالا افزایش می‌یابد و همچنین پولکی کردن جو نیز باعث افزایش جمعیت نسبی پروتوزوآ می‌شود. جمعیت پروتوزوا در روده کوچک اسب سانان حدود یک ده هزارم جمعیت باکتریایی است و در هر میلی لیتر محتویات روده بزرگ ۱۰۵×۰/۵ تا ۱۰۵×۱/۵ پروتوزوا وجود دارد. اگرچه پروتوزوا به تنهایی خیلی بزرگتر از باکتری‌ها هستند ولی بخش کوچکتری از توده میکروبی در روده بزرگ را تشکیل می‌دهند و مشارکت آنها در متابولیسم کم است (۴). جمعیت پروتوزوآ اسب تا حدی متفاوت‌تر از پروتوزوآ شکمبه هستند. برخی از ۷۲ گونه پروتوزوآ که از ابتدا مژه دار هستند بعنوان سکنه نرمال روده بزرگ اسب طبقه بندی می‌شوند، ولی برخی گونه ها در بین بخشهای مختلف دستگاه گوارش متفاوت هستند (۴). مور و دهوریتی (۱۹۹۳) در آزمایشی با پونی جنس پروتوزوآ موجود را بوتسچلیا[۱۰]، سیکلوپوستیوم[۱۱]، پاراسوتریچا[۱۲] و بلفاروکوریس[۱۳] گزارش نمودند. مور و دهوریتی (۱۹۹۳) در آزمایش خود اثر جیره و حذف پروتوزوآ را بر قابلیت هضم جیره و غلظت میکروبی در سکوم و کولون اسبها را بررسی نمودند. حذف پروتوزوآ باعث کاهش کمی در مقدار قابلیت هضم ماده خشک شد ولی بر تعداد باکتری‌ها و هضم سلولز تاثیری نداشت. بنابراین به نظر می‌رسد پروتوزآ برای تخمیر خوراک در سکوم و کولون اسبها ضروری نباشد و نشان می‌دهد که پروتوزوآ آنزیم هضمی خاصی ندارند. در آزمایش مور و دهوریتی (۱۹۹۳) حذف پروتوزوآ هیچگونه تاثیری بر هضم سلولز نداشت که این ممکن است نشان دهنده عدم تاثیر مهم پروتوزوآ بر هضم سلولز و یا اینکه با حذف پروتوزوآ، باکتری‌ها و قارچها

---

10 - *Buetschlia*
11 - *Cycloposthium*
12 - *Paraisotricha*
13 - *Blepharocorys*

این نقش را بر عهده می‌گیرند. در برخی از آزمایشات گذشته با افزودن کنسانتره به جیره هیچگونه تغییری در غلظت پروتوزوآ در سکوم مشاهده نشد (۱۳،۷) که این نتایج به اطلاعات به دست آمده از آزمایش جاری همخوانی ندارد و در آزمایش حاضر با افزودن کنسانتره به جیره یعنی جیره نشاسته بالا مقدار نسبی پروتوزوآ افزایش یافت. اما نتایج حاضر با آزمایش مور و دهوریتی (۱۹۹۳) همخوانی دارد و این محققین گزارش کردند که با افزودن کنسانتره به جیره غلظت پروتوزوآ در کولون افزایش یافت. اما در نشخوارکنندگان فرانزولین و دهوریتی (۱۹۹۶) در آزمایشی گوساله‌های گوشتی را با جیره‌های حاوی نسبت‌های ۰، ۵۰ و ۷۵ درصد کنسانتره بر پایه ذرت کامل به مدت ۱۴ روز تغذیه کردند. جمعیت کل پروتوزوآها در جیره‌های حاوی ۷۵ درصد، ۵۰ درصد و ۰ درصد کنسانتره به ترتیب بیشترین، میانه و کمترین تعداد بودند. با توجه به اطلاعات بدست آمده از این آزمایش و آزمایشات مربوط به نشخوارکنندگان می‌توان اینگونه اظهار نمود که در اسب هم افزایش غلظت نشاسته جیره موجب افزایش غلظت پروتوزوآ می‌شود و پولکی کردن جو نسبت به پلت کردن آن تاثیر بیشتری روی جمعیت پروتوزوآ دارد (۳).

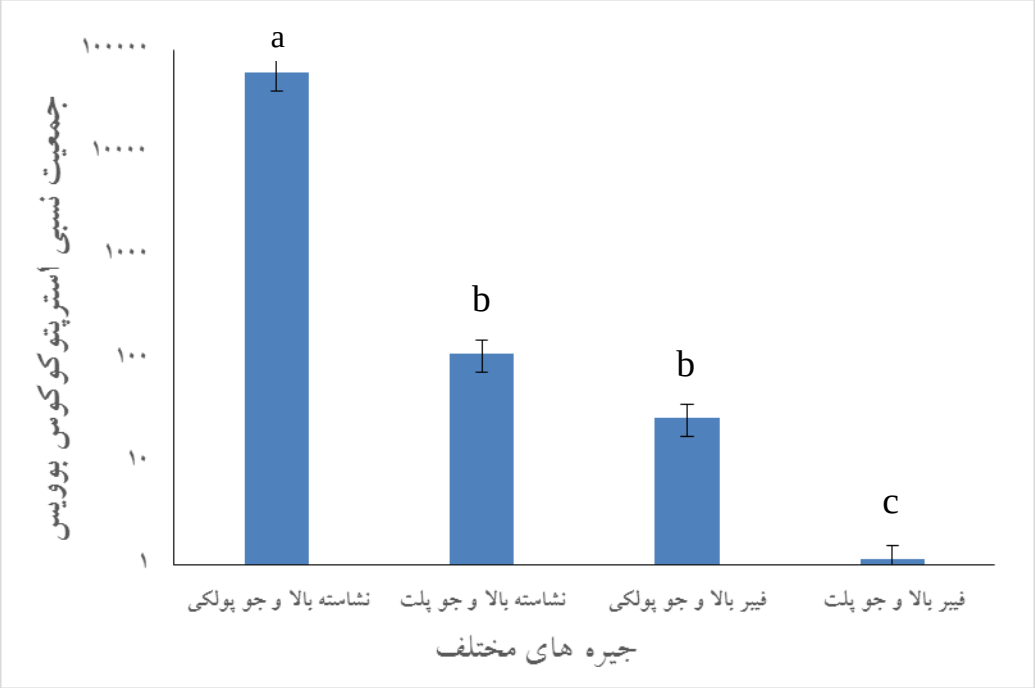


شکل۱- جمعیت نسبی پروتوزوآها در جیره‌های مختلف

تغییر جمعیت نسبی *استرپتوکوکوس بوویس* تحت تأثیر جیره‌های مختلف

تغییر جمعیت نسبی *استرپتوکوکوس بوویس* دستگاه گوارش اسب در جیره‌های مختلف در شکل ۲ نشان داده شده است. جمعیت نسبی این باکتری در جیره نشاسته بالا و جو پولکی شده نسبت به سایر جیره ها افزایش معنی داری نشان داد (P<۰/۰۵). غلظت *استرپتوکوکوس بوویس* در جیره نشاسته بالا و جو پولکی شده ۶۱۰۰۰ برابر جیره فیبر بالا و جو پلت بود. غلظت *استرپتوکوکوس بوویس* در جیره-های نشاسته بالا و جو پلت شده و جیره فیبر بالا و جو پولکی شده تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند (P>۰/۰۵)، ولی هر دوی آنها با جیره فیبر بالا و جو پلت تفاوت معنی داری داشتند (P<۰/۰۵) و به ترتیب ۱۱۳ و ۲۷ برابر بودند. این باکتری‌ها، بی‌هوازی انتخابی، کوکسی شکل و بی‌حرکت می‌باشند و تشکیل زنجیره‌های کوتاهی داده و رنگ‌آمیزی گرم مثبت را نشان می‌دهند. *استرپتوکوکوس بوویس* مقدار زیادی از گلوسیدها را تخمیر می‌کند که مهمترین آنها گلوکز و نشاسته است. برای رشدشان، اسیدهای آمینه‌ای مثل آرژنین ضروری است. این باکتری به میزان زیادی اسیدلاکتیک و به مقدار کمتری اسید فرمیک و استیک، اتانول و CO_2 تولید می‌نماید. این باکتری مسئول اسیدوز لاکتیکی است، زیرا نرخ رشد زیادی دارد. تکثیرشان در شرایط نرمال شکمبه بطئی و کند است. ولی در زمان حضور نشاسته و هنگامی که شرایط محیط شکمبه اسیدی می‌گردد برتری می‌یابد چنانچه شرایط برای رشد *استرپتوکوکوس بوویس* مناسب گردد، زمان تولید نسل جدید حدود دوازده دقیقه است (۲).

مدینا و همکاران (۲۰۰۲) در آزمایشی اثر استفاده از *ساکرومیسس سرویسیه* را بر پروفیل میکروبی و الگوی تخمیر در روده بزرگ اسبهای که جیره نشاسته بالا یا فیبر بالا مصرف می‌کردند، بررسی نمودند. این محققین بیان داشتند که اطلاعات ما نشان می‌دهد که پروفیل و فعالیت میکروفلورای روده‌ای در اسبها با تغییر نسبت فیبر به نشاسته، تغییر می‌کند. اینگونه تغییر در اکوسیستم بخش خلفی به ویژه در سکوم (۲۳،۵) و کولون (۱۱) اسبها با تغییر در منبع کربوهیدرات جیره قبلا نیز گزارش شده بود. مدینا و همکاران (۲۰۰۲) افزایش ۳۳۴ درصدی استرپتوکوکوس نسبت به کل باکتری بی‌هوازی را در کولون اسبهای دریافت کننده جیره نشاسته بالا گزارش نمودند که با آزمایش ما همخوانی دارد.



شکل ۲- جمعیت نسبی *استرپتوکوکوس بوویس* در جیره‌های مختلف

در آزمایش مدینا و همکاران (۲۰۰۲) تعداد باکتری‌های سلولتیک به نفع لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس‌ها کاهش یافت، بنابراین غلظت اسیدلاکتیک افزایش و pH محتوای بخش خلفی کاهش یافت که باعث صدمه به فعالیت باکتری‌های فیبرولیتیک گردید. این نتایج موافق است با کاهش قابلیت هضم ظاهری فیبر نامحلول در شوینده اسیدی و فیبر نامحلول در شوینده خنثی که در آزمایش ما در جیره نشاسته بالا مشاهده شد. همانند نشخوارکنندگان (۸)، محتمل است که اثر متقابل منفی روی هضم میکروبی فیبر به دلیل تخمیر نشاسته در بخش خلفی دستگاه گوارش اسبهای مصرف کننده جیره نشاسته بالا باشد. بعلاوه کاهش در قابلیت هضم ظاهری فیبر نامحلول در شوینده اسیدی و فیبر نامحلول در شوینده خنثی احتمالا به دلیل کاهش مقدار دیواره سلولی فراهم شده در بخش خلفی دستگاه گوارش بعنوان سوبسترا برای باکتری‌های سلولتیک در زمان تغذیه اسبها با جیره نشاسته بالا

نسبت به جیره فیبر بالاست. پیتر و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایشی برخی باکتری‌های کاندید سلولتیک و آمیلولتیک را با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در زمان واقعی را در روده بزرگ اسب مورد ارزیابی قرار دادند. این محققین نمونه ها را به دو روش ارزیابی نمودند، در روش اول نمونه های هضمی گرفته شده از دستگاه گوارش را مستقیما در ۸۰- فریز نمودند و در روش دوم نمونه های هضمی دستگاه گوارش را به صورت هوا خشک[۱۴] نگه داری نمودند. اطلاعات حاصله از آزمایش آنها نشان داد که در نمونه‌های فریز شده و هوا خشک شده غلظت باکتری‌های کاندید مورد نظر که *استرپتوکوکوس بوویس* هم جزو آنها بود، بصورت معنی داری در سکوم نسبت به کولون پشتی و رکتوم کمتر بود. در نمونه فریز شده، سطح باکتری‌های مورد نظر بین کولون شکمی و پشتی و رکتوم یکسان بود، اما در نمونه‌های هوا خشک شده در کولون پشتی و رکتوم غلظت بالاتری از باکتری‌های مورد نظر وجود داشت. با توجه به اطلاعات بدست آمده از این آزمایش و گزارش‌های سایر محققین در این زمینه جیره نشاسته بالا باعث افزایش جمعیت *استرپتوکوکوس بوویس* نسبت به جیره فیبر بالا گردید و نوع فرآوری غله نیز بر غلظت این باکتری تاثیر گذار بود و پولکی کردن جو نسبت به پلت کردن آن باعث افزایش نسبی جمعیت *استرپتوکوکوس بوویس* شد (۲۰).

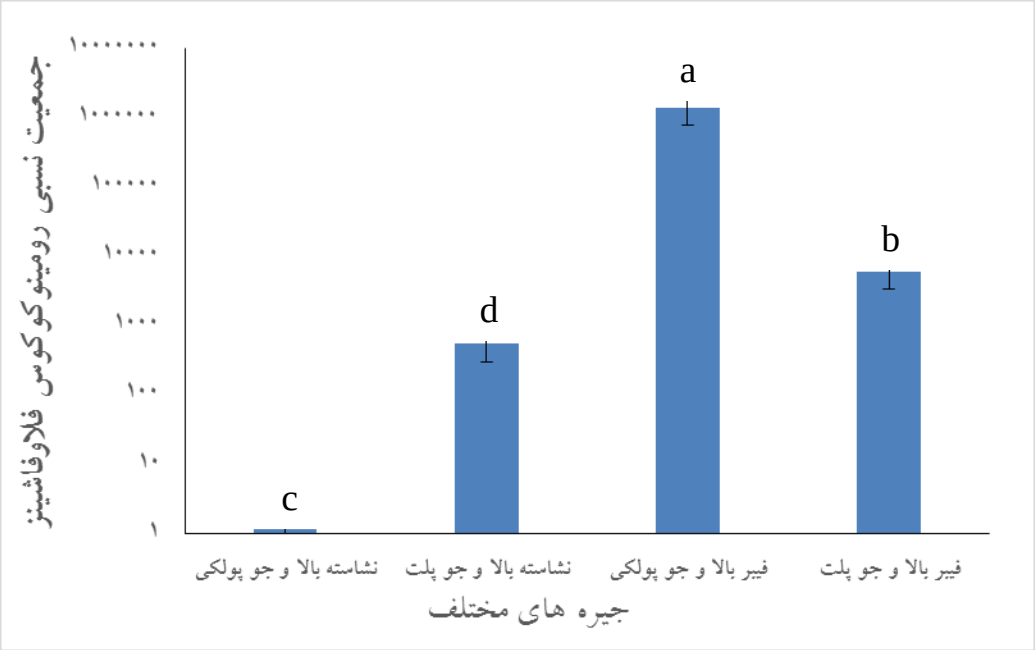
تغییر جمعیت نسبی *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* تحت تأثیر جیره‌های مختلف

تغییر جمعیت نسبی باکتری *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* در دستگاه گوارش اسبهای مصرف کننده جیره نشاسته بالا و فیبر بالا به همراه جو پولکی شده و پلت شده در شکل ۳ نشان داده شده است. در این آزمایش جیره فیبر بالا به همراه جو پولکی باعث افزایش ۱۴۰۰۰۰۰ برابری سطح باکتری *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* نسبت به جیره نشاسته بالا و جو پولکی گردید (P<۰/۰۵). مقایسه بین دو جیره نشاسته بالا که یکی به همراه جو پولکی و دیگری با جو پلت بود نیز اختلاف معنی داری نشان داد بطوریکه غلظت *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* در جیره نشاسته بالا به همراه جو پلت ۵۵۰ برابر جیره نشاسته بالا و جو پولکی بود. اختلاف بین جیره فیبر بالا و جو پلت با جیره نشاسته بالا و جو پولکی نیز معنی دار بود و غلظت *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* در جیره فیبر بالا جو پلت ۶۰۰۰ برابر جیره نشاسته بالا و جو پولکی بود (P<۰/۰۵). در بین دو جیره فیبر بالا نیز از لحاظ غلظت باکتری

[14] - Lyophilised

رومینوکوکوس فلاوفاشینز اختلاف معنی داری وجود داشت و در جیره فیبر بالا و جو پولکی ۲۳۳ برابر جیره فیبر بالا جو پلت بود (P<۰/۰۵). نقش *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* در شکستن دیواره سلول‌های گیاهی در طی یکسری مطالعات که روی رومینوکوکوس‌ها و دیگر باکتری‌های شکمبه انجام‌شده شناسایی و پس از آن با اسکن توسط میکروسکوپ الکترونی به روشنی مشخص گردیده است. *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* مهمترین باکتری است که سلولز را تجزیه می‌کند. این باکتری اسیدهای استیک، فرمیک و سوکسینیک تولید می‌کند.

جولیاند و همکاران (۱۹۹۹) آزمایشی را با استفاده از اسب سانان جهت تشخیص باکتری‌های غالب تجزیه کننده فیبر در در سکوم انجام دادند و گزارش نمودند که باکتری‌های غالب سکوم به ترتیب رومینوکوکوس فلاوفاشنز، *فیبروباکتر سوکسینوژن* و *رومینوکوکوس آلبوس* بود. دی فامبل و همکاران (۲۰۰۱) در آزمایشی اثر تغییر ناگهانی جیره و استفاده از دو سطح دانه جو در جیره بر پایه علوفه بر فعالیت و پروفیل میکروبی دستگاه گوارش اسب را بررسی نمودند. این محققین نتیجه گیری نمودند که جمعیت کل باکترهای غیرهوازی سکوم و کولون در زمان مصرف علوفه مقداری پایین‌تر از آزمایشات گذشته بود. استفاده ناگهانی دانه جو در جیره باعث تغییر غلظت و فعالیت جمعیت میکروبی بخش خلفی داستگاه گوارش شد. جمعیت باکتری‌های سلولتیک که ۲۹ ساعت پس از مصرف جیره جدید اندازه‌گیری شده از لحاظ عددی کاهش یافت و فعالیت فیبرولیتیکی نیز کاهش یافت که نتیجه آن در پروفیل اسیدهای چرب فرار منعکس شد (۱). نتایج آزمایش دی فامبل و همکاران (۲۰۰۱) با نتایج آزمایش ما همخوانی دارد، اگر چه دی فامبل و همکاران در آزمایش خود از تکنیک کشت باکتریایی و شمارش باکتری‌های هوازی، غیر هوازی و سلولتیک استفاده کردند (۱). بهرحال با توجه به نتایج آزمایش جولیاند و همکاران (۱۹۹۹) عمده ترین باکتری سلولتیک دستگاه گوارش اسب سانان *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* است که این باکتری در آزمایش ما نیز با جیره فیبر بالا افزایش یافت (۱۲).



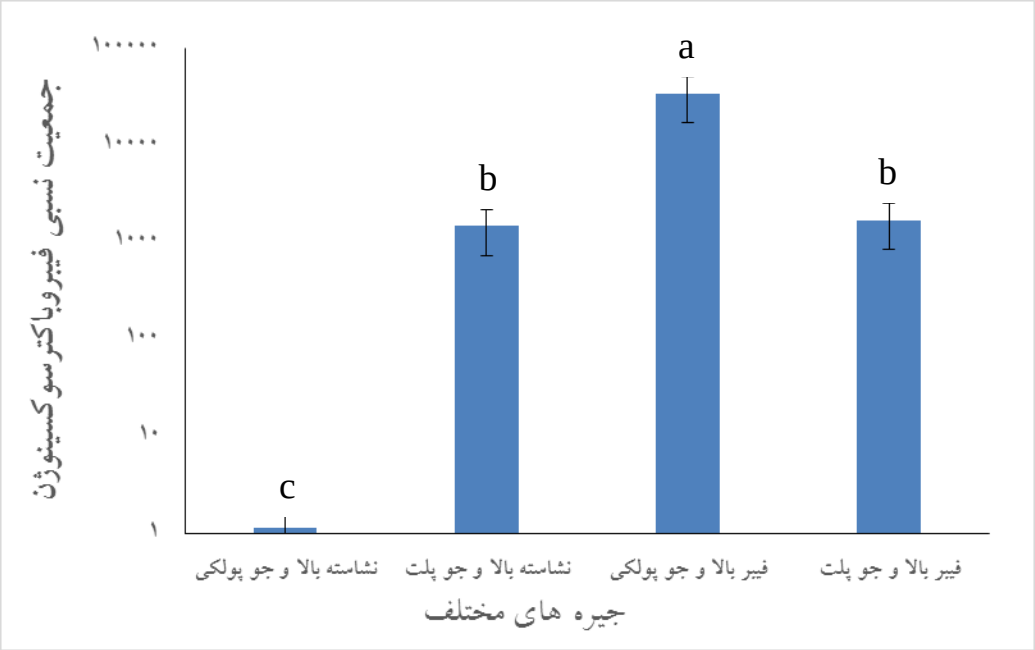
شکل ۳- جمعیت نسبی *رومینوکوکوس فلاوفاشینز* در جیره‌های مختلف

تغییر جمعیت نسبی *فیبروباکتر سوکسینوژن* تحت تأثیر جیره‌های مختلف

در شکل ۴ تغییر جمعیت نسبی باکتری *فیبروباکتر سوکسینوژن* با جیره‌های مختلف نشان داده شده است. همانند باکتری *رومینوکوکوس فلاوفاشینز*، این باکتری نیز در جیره‌های فیبر بالا غلظت بالای نشان داد (P<۰/۰۵). بالاترین غلظت باکتری *فیبروباکتر سوکسینوژن* در جیره فیبر بالا و جو پولکی مشاهده شد که نسبت به جیره نشاسته بالا و جو پولکی ۳۳۸۰۰ برابر بود. در مرحله بعد جیره فیبر بالا و جو پلت و جیره نشاسته بالا و جو پلت قرار داشتند که به ترتیب ۱۶۹۰ و ۱۴۷۰ برابر جیره نشاسته بالا و جو پولکی بود (P<۰/۰۵)، ولی این دو جیره از لحاظ غلظت باکتری *فیبروباکتر سوکسینوژن* باهم اختلاف معنی‌داری نداشتند.

نکته‌ای که در اینجا دیده می‌شود افزایش غلظت *فیبروباکتر سوکسینوژن* در جیره‌های حاوی جو پلت شده می‌باشد زیرا در هر دو جیره نشاسته بالا و فیبر بالا که به همراه جو پلت شده بود غلظت این باکتری نسبت به جیره حاوی نشاسته بالا و جو پلت شده افزایش یافت. با وجود اهمیت جمعیت

میکروبی در دستگاه گوارش اسب، کار تحقیقاتی نسبتاً اندکی در این زمینه انجام شده است. جولیاند و همکاران (۱۹۹۹) در یک آزمایش ملکولی رومینوکوکوس فلاوفشینز و *فیبروباکتر سوکسینوژن* را عمده‌ترین باکتری‌های حاضر در دستگاه گوارش اسب بیان نمودند. لین و استاهل (۱۹۹۵) نیز در آزمایشی که با استخراج rRNA باکتری های دستگاه گوارش اسب انجام دادند اظهار نمودند که بیش از ۱۲ درصد rRNA استخراج شده از سکوم و بیش از ۴ درصد rRNA استخراج شده از کولون مربوط به *فیبروباکتر سوکسینوژن* بوده است. در مورد بررسی جمعیت *فیبروباکتر سوکسینوژن* در جیره‌های مختلف با روش ملکولی کار تحقیقی چندانی صورت نگرفته است و بیشتر تحقیقات انجام شده در این زمینه در حد شناسایی این باکتری با روشهای ملکولی در بخش‌های مختلف دستگاه گوارش اسب بوده است و یا برآورد جمعیت کل باکتری‌های سلولتیک با روش کشت میکروبی است. مدینا و همکاران (۲۰۰۲) در آزمایشی اثر استفاده از *ساکرومیسس سرویسیه* را بر پروفیل میکروبی و الگوی تخمیر در روده بزرگ اسبهای که جیره نشاسته بالا یا فیبر بالا مصرف می‌کردند، بررسی نمودند. این محققین گزارش نمودند که جیره نشاسته بالا باعث افزایش غلظت کل باکتری‌های بی‌هوازی، باکتری های استفاده کننده لاکتیک اسید، لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوکوس در سکوم شد، در مقابل تعداد باکتری‌های سلولتیک سکوم با جیره نشاسته بالا کاهش یافت. کاهش در جمعیت *فیبروباکتر سوکسینوژن* در جیره نشاسته بالا در این آزمایش موافق با نتایج قبلی گزارش شده توسط گارنر و همکاران (۱۹۹۸) و جولیاند و همکاران (۲۰۰۱) می‌باشد. بطور کلی نتیجه آزمایش روش ملکولی که در این آزمایش انجام شده تایید کننده نتایج آزمایشات کشت میکروبی بوده است و مزیت این روش شناسایی تک تک باکتری‌های سلولتیک و آمیلولتیک است.



شکل ۴- جمعیت نسبی *فیبروباکتر سوکسینوژن* در جیره‌های مختلف

منابع

1. De Fombelle, A., V. Julliand, C. Drogoul, and E. Jacotot. 2001. Feeding and microbial disorders in horses: 1-Effects of an abrupt incorporation of two levels of barley in a hay diet on microbial profile and activities. J. Equine Vet. Sci. 21:439–444.
2. Dehority, B. A., H. W. Scott. 1967. Extent of cellulose and hemicellulose digestion in various forages by pure cultures of rumen bacteria. J. Dairy Sci. 50:1136.
3. Franzolin, R., B. A. Dehority. 1996. Effect of prolonged high concentrate feeding on ruminal protozoal concentrations. J. Anim. Sci. 74:2803–2809.
4. Frape, D., 2004. EQUINE NUTRITION AND FEEDING. 3rd edn. Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. PP 650.
5. Garner, H. E., J. N. Moore, J. H. Johnson, L. Clark, J. F. Amend, L. G. Tritschler, and J. R. Coffman. 1998. Changes in the cecal flora associated with the onset of laminitis. Equine Vet. J. 10:249–252.
6. Goodson, J. 1981. Effects of an abrupt change in ration, from all forage to concentrate, on the microbial populations and ecology of the pony cecum. Ph.D. Dissertation. The Ohio State Univ., Columbus.
7. Goodson, J., W. Tyznik., J. Cline., and B. Dehority. 1988. Effects of an abrupt change of diet from hay to concentrate on microbial numbers and physical environment in the caecum of the pony. Appl. Environ. Microbiol.54: 1946-1950.
8. Hoover, W. H., C. Tucker, J. Harris, C. J. Sniffen, and M. B. de Ondarza. 2006. Effects of non-structural carbohydrate level and starch:sugar ratio onmicrobialmetabolismin continuous culture of rumen contents. Anim. Feed Sci. Technol. 128:307–319.
9. Hoover, W. H., C. Tucker, J. Harris, C. J. Sniffen, and M. B. de Ondarza. 2006. Effects of non-structural carbohydrate level and starch: sugar ratio on microbial metabolism in continuous culture of rumen contents. Anim. Feed Sci. Technol. 128:307–319.
10. Janis, C., 1976. The evolutionary strategy of the equidae and the origins of rumen and cecal digestion. Evolution. 30: 757–774.
11. Julliand, V., A. de Fombelle, C. Drogoul, and E. Jacotot. 2001. Feeding and microbial disorders in horses. 3. Effects of three hay:grain ratios on microbial profile and activities. J. Equine Vet. Sci. 21:543–546.
12. Julliand, V., de Vaux, A., Millet, L. and Fonty, G. 1999. Identiccation of Ruminococcus favefaciens as the predominant cellulolytic bacterial species of the equine cecum. Appl. Environ. Microbiol. 65, 3738^3741.
13. Kern, D. L., L. L. Slyter, J. M. Weaver, E. C. Leffel, and G. Samuelson. 1973. Pony cecum vs steer rumen: the effect of oats and hay on the microbial ecosystem. J. Anim. Sci. 37:463-469.

14. Lin, C. and Stahl, D.A. 1995. Taxon-speci¢c probes for the cellulolytic genus Fibrobacter reveal abundant and novel equine-associated populations. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1348-1351.
15. McLean, B.M.L., Hyslop, J.J., Longland, A.C., Cuddeford, D., Hollands, T., 2000. Physical processing of barley and its effects on intra-caecal fermentation parameters in ponies. Anim. Feed Sci. Technol. 85, 79–87.
16. Medina, M., I. D. Girard, E. Jacotot, and V. Julliand. 2002. Effect of a preparation of *Saccharomyces cerevisiae* on microbial profiles and fermentation patterns in the large intestine of horses fed a high fiber or a high starch diet. J. Anim. Sci. 80:2600–2609.
17. Milinovich, G. Burrell, P. Pollitt, P. Klieve, A. Blackall, L. Ouwerkerk, D. Woodland, E. Trott, D. 2008. Microbial ecology of the equine hindgut during oligofructose-induced laminitis. The ISME Journal. 2: 1089–1100.
18. Moore, B.E. & Dehority, B.A. 1993. Effects of diet and hindgut defaunation on diet digestibility and microbial concentrations in the cecum and colon of the horse. Journal of Animal Science, 71, 3350–58.
19. Moore-Colyer, M.J.S., J. Hyslop., A. Longland., and D. Cuddeford. 2000. Intra-caecal fermentation parameters and in vivo apparent digestibility in ponies fed botanically diverse fibre-based diets. Anim. Feed. Sci. Technol. 84: 183-197.
20. Peter, M., M. Katherine., and M. Jo-Anne. 2008. Semi-quantitative analysis of Ruminococcus flavefaciens, Fibrobacter succinogenes and Streptococcus bovis in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. Brit. J. Nutr. 100: 561–568.
21. Santos, A., M. Rodrigues., R. Bessa., L. Ferreira1., and W. Martin-Rosset. 2011. Understanding the equine cecum-colon ecosystem: current knowledge and future perspectives. Animal. 5: 48–56.
22. SAS Institute Inc. 2002. Statistical Analysis System (SAS) User’s Guide (Version 9.1), SAS Institute, Cary, NC, US.
23. Willard, J. G., J. C. Willard, S. A. Wolfram, and J. P. Baker. 1977. Effect of diet on cecal pH and feeding behavior of horses. J. Anim. Sci. 45:87–93.

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
J. of Ruminant Research, Vol. 5(1), 2017
http://ejrr.gau.ac.ir

Effect of dietary fiber and starch level and barley processing on relative variation of microbial population in gastrointestinal tract of Horse by using Real-time PCR

***A. Toghdory[1], N. Torbatinejad[2], T. Ghoorchi[2], A. Gharehbash[3]**
[1]Assistant Prof., and [2]Professor, Dept. of Animal and Poultry Nutrition, Animal Sciences Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Assistant Prof., Dept. of Animal Sciences, Agriculture and Natural Resources Faculty, Gonbad Kavous University

Received: 09/26/2016; Accepted: 03/04/2017

Abstract

Background and objectives: Understanding and description of degradation mechanism in digestive ecosystem of horse especially posterior part of gastrointestinal tract (GIT) is of great importance in proper nourishment. Despite its importance in host nutritional status, fermentation in posterior part of GIT is not completely understood and studies on contribution of posterior microbial population in nitrogen and energy requirements were rarely investigated. The literature is rather unanimous on ecology and microbial diversity in GIT of horses that based on microbial culture. Most of the time, the microbial culture is time-consuming and difficult to implement and may include some part of microbial diversity. However, modern molecular methods like real-time PCR are independent tool of microbial culture which specifies varieties of bacterial species and total bacterial count with high accuracy and sensitivity. The aim of current study was to investigate the effect of dietary fiber and starch level and processing type on relative changes of microbial population in GIT.

Materials and Methods: In order to do this experiment, eight 6-12 years old Turkmen male horse with body weight of 270-300 kg were used. The rations were placed in two meals in the morning and evening and water was freely available to them. Two base rations containing high fiber and high starch were used for horses. Treatments included: 1) high fiber diet with steam flake barley (A), 2) high fiber diet with pelleted barley (B), 3) high starch diet with steam flake barley (C) and 4) high starch diet with pelleted barley (D). The experiment was conducted in a

*Corresponding author; Toghdory@yahoo.com

changeover design with four treatments and four periods, each period including 14 days of adaptation to the new diet and 7 days of sampling. Samples from feces of horses were collected on the last day of each period and stored in a freezer at -80 °C until the microbial population was determined. DNA extraction was done by phenol-chloroform method. In order to clone the genes, after extraction of their sequence from the NCBI database for each gene, a pair of primers (lead and follower primers) was designed using the AllelID software. Finally, the relative quantity of bacteria and protozoa was determined using a polymerase chain reaction method in real time.

Results: Protozoa population in the diet containing high starch and flaked barley was higher than other diets and had a significant difference. The high starch diet containing pelleted barley and the high fiber diet containing flaked barley were 54 and 106 times higher than the high fiber diet and pelleted barley, respectively. The relative populations of *Streptococcus bovis* showed a significant increase in the high starch diets and flaked barley compared to other diets. In this experiment, the high fiber diet, with flaked barley increased the *Ruminococcus flavefaciens* 1400000 times relative to the high starch and flaked barley diet. The difference between high-fiber diet with pelleted barley and high-starch diet with flaked barley was also significant, and the concentration of *Ruminococcus flavefaciens* in a high-fiber diet with pelleted barley was 6000 times of high starch diet and flaked barley. The highest concentrations of *Fibrobacter succinogen* observed in the high fiber with pelleted barley diet, that were 33800 times compared to high starch diets and flaked barley. In the next stage, there were high dietary fiber and pelleted barley, high-starch diet and flaked barley that were 1690 and 1470 times higher than high starch diet and flaked barley, but these two diets did not differ significantly in terms of concentration of *Fibrobacter succinogen*.

Conclusion: The results of this study showed that the use of diet high in starch and flaked barley increases the relative population of *Streptococcus bovis* and protozoan populations.

Key words: Barley processing, relative population of microorganisms, horse, Real time PCR