The University of Tehran Press

Iranian Journal of Animal Science

Online ISNN: 2008-4773

Homepage: http:// ijas.ut.ac.ir/

Effect of different levels of oak acorn on biodiversity bacterial epimural populations using molecular techniques of PCR-SSCP in Markhoz goats

Badri Amiri [1], Osman Azizi [2]✉

1. Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran. E-mail: badriamiri1394@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Animal Science, Faculty of Agricultural Sciences, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran. E-mail: o.azizi@uok.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 28 February 2023

Received in revised form: 22 June 2023

Accepted: 25 June 2023

Published online: 21 June 2024

Keywords:

Bacterial population,

Biodiversity,

Markhoz goats,

Oak Acorn,

Rumen epimural,

PCR-SSCP.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of different levels of oak Acorn on the biodiversity of rumen epimural bacterial population using PCR-SSCP molecular technique in Merkhoz goats. A total of 24 Markhoz goats with a mean BW of 16.93±1.25 kg and an average age of 4–5 months were tested in a completely randomized design with 4 treatments and 6 replications for 105 days. 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. The results showed that the effect of diet on biodiversity of rumen bacterial epimural community was significant (P <0.001). There was no significant difference between other experimental treatments (P> 0.05), although treatments containing 8% and 17% oak had more variety than treatments containing 25% oak. Sampling site had no effect on biodiversity of rumen bacterial epimural community (P> 0.05). The highest value of Shannon index was related to ventral ruminal site and the lowest was related to reticulum. The interaction effect of diet and sampling position on biodiversity of rumen bacterial epimural community was significant (P> 0.05). The results showed that the use of oak acorn up to 17% in the diet increased the biodiversity of the of rumen bacterial epimural community, while the use of 25% oak in the diet decreased the biodiversity of the rumen bacterial epimural community.

Cite this article: Amiri, B. & Azizi, O. (2024). Effect of different levels of oak acorn on biodiversity bacterial epimural populations using molecular techniques of PCR-SSCP in Markhoz goats. *Iranian Journal of Animal Science*, 55 **(2),** 245-257. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.356066.653936

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.356066.653936

Extended Abstract

Introduction

Oak acorn contains significant amounts of biologically active compounds including tannins. Tannins are plant polyphenolic compounds that affect the rumen microorganism. 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 tannin on the ruminal bacterial population, the impact of dietary oak on the rumen bacterial population needs to be investigated. Evaluation of the effects of different levels of dietary oak acorn on the biodiversity of rumen epimural bacterial population was investigated using PCR-SSCP molecular technique in Markhoz goats.

Materials and Methods

Twenty-four Markhoz goats (mean weight 16.93±1.25, mean age 4 to 5 months) were allocated to four diets in a completely randomized design. The experimental diets were fed for 105 days. 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. Immediately after slaughtering, rumen- Reticulum was divided into six parts, dorsal, ventral, lateral, Caudal, and pillar, and their tissues were sampled, the samples were washed with saline and collected in sterile containers and kept at -50 degrees centigrade until DNA extraction. To extract DNA from the samples, the phenol-chloroform protocol provided by Tajima et al. (1999) was used.

Results and discution

The results of this experiment show that the use of different levels of oak acorn in the diet of livestock significantly affects the population diversity of rumen microorganisms. The use of oak acorn in comparison with the control diet increased the diversity of rumen bacterial epimural community, but with increasing the level of oak acorn in the diet, the diversity of bacterial population epimural rumen was significantly reduced. The results showed that the effect of diet on biodiversity of rumen bacterial epimural community was significant ($P < 0.001$). There was no significant difference between other experimental treatments ($P > 0.05$), although treatments containing 8% and 17% oak acorn had more variety than treatments containing 25% oak acorn. The sampling location had no effect on biodiversity of rumen bacterial epimural community ($P > 0.05$). The highest value of the Shannon index was related to the ventral ruminal site and the lowest was related to the reticulum site. The interaction effect of diet and sampling position on biodiversity of rumen bacterial epimural community was significant ($P > 0.05$).

Conclusion

The results showed that the use of oak acorns up to 17% in the diet increased the biodiversity of rumen bacterial epimural community, while the use of 25% oak acorns in the diet decreased the biodiversity of rumen bacterial epimural community. The sampling location had no effect on biodiversity of rumen bacterial epimural community. The highest value of the Shannon index was related to the ventral ruminal site, and the lowest value of the Shannon index was related to the reticulum ruminal site.

نشریه علوم دامی ایران، دوره ۵۵، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۹۴۹-۲۴۲۳

Homepage: http://ijas.ut.ac.ir//

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

بدری امیری[۱] و عثمان عزیزی[۲]✉

۱. گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران. رایانامه: badriamiri1394@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه علوم دامی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران. رایانامه: o.azizi@uok.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۹

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۴/۰۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۳/۰۴/۰۱

کلیدواژه‌ها:

بزغاله‌های مرخز، تنوع زیستی جمعیت باکتریایی، اپیمورال شکمبه، میوهٔ بلوط، PCR-SSCP

چکیده

هدف از پژوهش حاضر، بررسی اثرات سطوح مختلف میوهٔ بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های نژاد مرخز بود. برای این منظور تعداد ۲۴ رأس بزغالهٔ مرخز با میانگین وزنی ۱/۲۵ ± ۱۶/۹۳ کیلوگرم و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماهه در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار آزمایشی و ۶ تکرار به مدت ۱۰۵ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) جیرهٔ شاهد، ۲) جیرهٔ حاوی ۸ درصد میوهٔ بلوط، ۳) جیرهٔ حاوی ۱۷ درصد میوهٔ بلوط و ۴) جیرهٔ حاوی ۲۵ درصد میوهٔ بلوط بودند. نتایج نشان داد که تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار بود (P<۰/۰۰۱). بیشترین مقدرا شاخص شانون مربوط به تیمار ۸ درصد میوهٔ بلوط و کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان داد. جایگاه نمونه‌برداری تأثیری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه نداشت (P>۰/۰۵). بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه ونترال شکمبه و کمترین آن مربوط به رتیکولوم بود. اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار بود (P>۰/۰۵). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از میوهٔ بلوط تا سطح ۱۷ درصد مادهٔ خشک در جیرهٔ غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه شد، در حالیکه استفاده از سطح ۲۵ درصد آن در جیرهٔ غذایی کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه را به دنبال داشت.

استناد: امیری، بدری و عزیزی، عثمان (۱۴۰۳). بررسی اثر سطوح مختلف میوهٔ بلوط بر ساختار جمعیت و تنوع ژنتیک باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از تکنیک PCR-SSCP در بز مرخز. *نشریه علوم دامی ایران*، ۵۵ (۲)، ۲۵۷-۲۴۵. DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.356066.653936

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijas.2023.356066.653936

مقدمه

عملکرد نشخوارکنندگان وابسته به فعالیت میکروارگانیسم‌ها در استفاده از خوراک‌های جیره است (Jenkins et al., 2007). تنوع بسیار اکوسیستم میکروبی شکمبه متشکل از باکتری ($۱۰^{۱۰}$–$۱۰^{۱۱}$ سلول در میلی‌لیتر با حضور بیش از ۵۰ جنس)، پروتوزوآی مژکدار ($۱۰^{۴}$–$۱۰^{۶}$ میلی‌لیتر از ۲۵ جنس)، قارچ‌های بی‌هوازی ($۱۰^{۳}$–$۱۰^{۵}$ هاگ در میلی‌لیتر با حضور ۵ جنس) و باکتریوفاژها ($۱۰^{۸}$–$۱۰^{۹}$ میلی لیتر) است (Mccowan et al., 1980; Jany et al., 2008) که شمار زیادی و حتی ممکن است عمدهٔ آنها غیرقابل کشت باشند (Jany et al., 2008). میان گروه‌های مختلف میکروب‌های ساکن پیش‌معده نشخوارکنندگان، باکتری‌ها بیشترین تنوع و نقش ضروری را در سلامت و تغذیه ایفا می‌کنند (Lawrence et al., 2001). جمعیت باکتری‌های متصل به دیوارهٔ شکمبه که به‌عنوان جمعیت باکتریایی اپیمورال[1] شناخته می‌شوند مجزا از باکتری‌های فاز مایع یا جامد شکمبه هستند (Ranilla et al., 2009). اپیتلیال (دیوارهٔ شکمبه) که در تماس با انواع سوبستراها و شرایط میکروسکال[2] (مقیاس میکرو) است در حد فاصل بین بافت‌های میزبان و محتویات شکمبه قرار گرفته است (Russell et al., 2008). جمعیت باکتریایی اپیمورال حدود ۱ درصد از کل جمعیت باکتریایی شکمبه را تشکیل می‌دهند و نقش آنها در تجزیهٔ خوراک کمتر است، با این حال نقش مهمی در هیدرولیز سیستمیک اوره که از خون به سراسر دیوارهٔ شکمبه منتشر می‌شود، ایفا نموده و در نتیجه، متابولیسم نیتروژن و نیز بازیافت بافت و مهار اکسیژن از دیگر عملکردهای جمعیت باکتریایی اپیمورال است (Lawrence et al., 2001). تعداد زیادی باکتری‌های یورولایتیک و ارگانیسم‌های بی‌هوازی اختیاری وابسته به دیوارهٔ شکمبه وجود دارند (Mcallister et al., 1994; Lorna et al., 1981). توزیع ارگانیسم‌های یورولایتیک بر اپیتلیوم به‌طور قابل ملاحضه‌ایی متفاوت از توزیع کل باکتری‌ها است. این باکتری‌ها اغلب جایگاه‌های ترجیحی را نشان میدهند که آنها را متصل می‌کند، به‌طوریکه تنها یک گونه جمعیت یا نوع مورفولوژیکی را در یک جایگاه خاص در دستگاه گوارش می‌توان یافت (Mcallister et al., 1994). عوامل تغییردهندهٔ جمعیت میکروبی شامل سن حیوان، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، سلامت حیوان میزبان، تفاوت موقعیت جغرافیایی، فصل سال و مهمتر از همه از دیدگاه کشاورزی جیرهٔ غذایی حیوان میزبان است (Patra & Pitta et al., 2010; Saxena., 2010) جیره یک فاکتور مؤثر بر ساختار و عملکرد جمعیت باکتریایی شکمبه است. طبیعت خوراک‌ها و نیز تغییرات فیزیکوشیمیایی القاءشده با تخمیر آنها در توسعه برخی از اعمال اکوسیستم میکروبی در فاز جامد و مایع شکمبه سودمند شناخته شده است (Ranilla et al., 2009).

بلوط ایرانی با نام علمی *کوئرکوس پرسیکا*[3] درختانی بزرگ به ارتفاع ۲۰ متر با تاج کروی بزرگ از خانواده *فاباسه*[4] (Ebrahimi et al., 2009) و جنس *کوئرکوس*[5] می‌باشند (Ghaderi et al., 2011). حدود سه میلیون هکتار از جنگل‌های غرب ایران پوشیده از گونه‌های مختلف بلوط، بطور عمده *کوئرکوس پرسیکا*[6]، *کوئرکوس لیبانی*[7] و *کوئرکوس اینفکتوریا*[8] است (Ebrahimi et al., 2009). میوهٔ بلوط حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزاهیدروکسی‌دی‌فنوئیل می‌باشد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند (Firkins et al., 2010). تانن‌ها گروه پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی (Rosales et al., 1999) و پلی‌فنولیک حاضر در

---

1 Bacterial Epimural Community (BEC)
2 Microscale
3 . *Quequs persica*
4 . *Fagaceae*
5 . *Querqus*
6 . *Quequs persica*
7 . *Querqus libani*
8 . *Querqus infectoria*

جیرهٔ غذایی حیوانات و انسان هستند (Russell et al., 2008) که قابل حل در آب (Camper & Nocker., 2007) و دیگر حلال‌های قطبی بوده (Rosales et al., 1999) و قادر به رسوب با پروتئین‌ها، آلکالوئیدها و ژلاتین می‌باشند (Camper & Nocker., 2007).

برای اولین بار لیی و همکاران (۱۹۸۵) از ژن 16SrRNA[1] در تعیین و طبقه‌بندی میکروب‌های غیرقابل کشت در محیط استفاده کردند (Kamra., 2005). آنالیز پروفایل توالی 16SrRNA در حال حاضر از تکنیک‌های بسیار سازگار با مطالعات جوامع میکروبی است. علاوه بر سهولت اجرا و توانایی مقایسهٔ چندین نمونه، این تکنیک به‌عنوان بهترین تخمین‌زنندهٔ تنوع زیستی شناسایی شده است (Russell et al., 2008). گسترش PCR و آنالیز الگوی SSCP از ژن 16SrRNA، یک ابزار مفید در جهت مطالعهٔ ساختار جمعیت باکتریایی در اکوسیستم‌های مختلف است. با توجه به موارد ذکر شده هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سطوح مختلف تانن میوهٔ بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های مرخز بود.

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 ۲۴ رأس بزغالهٔ مرخز (میانگین وزنی ۱/۲۵ ± ۱۶/۹۳ کیلوگرم و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماهه) در قالب طرح کاملاً تصادفی به چهار جیرهٔ غذایی اختصاص داده‌شدند که در هر تیمار ۶ رأس بزغالهٔ مرخز مورد آزمایش قرار گرفت. جیره‌های غذایی شامل ۱) جیرهٔ شاهد، ۲) جیرهٔ حاوی ۸ درصد میوهٔ بلوط، ۳) جیرهٔ حاوی ۱۷ درصد میوهٔ بلوط و ۴) جیرهٔ حاوی ۲۵ درصد میوهٔ بلوط بود. دلیل انتخاب درصدهای متفاوت میوه بلوط در جیره‌های آزمایشی بر اساس دیگر مطالعات صورت گرفته و تعیین ارزش غذایی میوهٔ بلوط بود. قبل از شروع آزمایش یک دورهٔ عادت‌پذیری ۱۵ روزه اجرا شد. طول دورهٔ انجام آزمایش دامی ۱۰۵ روز بود و مدت زمان انجام تحقیقات آزمایشگاهی حدود ۱۸۰ روز بود. بخش علوفه جیره شامل علوفه یونجه و کاه گندم و بخش کنسانتره جیره شامل سبوس گندم، کنجاله سویا، دانه جو، میوهٔ بلوط و کربنات کلسیم بود. اقلام خوراکی و ترکیب شیمیایی جیره‌های آزمایشی در جدول ۱، ارائه شده‌است. جیره‌های آزمایشی به‌طور کامل مخلوط و تا حد اشتها در اختیار دام‌ها قرار گرفت. خوراک‌دهی روزانه و در دو نوبت صبح (ساعت ۷) و عصر (ساعت ۱۹) انجام شد. ترکیبات شیمیایی شامل مادهٔ خشک (دمای ۱۰۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت)، پروتئین خام (روش کجلدال)، چربی خام (دستگاه سوکسله) و خاکستر خام (۵۵۰ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۶ ساعت) با استفاده از روش انجمن رسمی شیمی‌دانان کشاورزی[2] آنالیز شد (جدول ۱).

میوهٔ بلوط مورد استفاده در این آزمایش از گونه *کوئرکوس پرسیکا* تهیه شده از جنگل‌های بلوط استان کردستان بود. آنالیز شیمیایی میوهٔ بلوط در جدول ۲، ارائه شده‌است. میزان تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز موجود در میوهٔ بلوط اندازه‌گیری شد (جدول ۳) و میزان تانن موجود در سطوح متفاوت از جیرهٔ غذایی نیز تعیین گردید (جدول ۴).

بعد از ۱۰۵ روز تغذیه دام‌ها با جیره‌های آزمایشی، بصورت تصادفی از هر تیمار ۳ رأس کشتار شدند. بلافاصله بعد از کشتار شکمبه- نگاری دام جهت نمونه‌برداری آماده شد. شکمبه- نگاری ابتدا به شش قسمت تقسیم شد و نمونه‌برداری از این شش

1 . 16S ribosomal RNA

2 Association of Official Agricalture (AOAC)

جایگاه مختلف که عبارت بودند از: نگاری ، قسمت‌های پشتی ، شکمی ،[1]جانبی ، خلفی و پیلار[6] شکمبّه انجام[4] شد. از[5]هر جایگاه انتخاب شد، یک نمونه از بافت آن جایگاه گرفته شد و با سرم نمکی شستشو داده شد. نمونه‌ها در ظرف‌های استریل جمع‌آوری شدند و تا زمان استخراج DNA در منفی ۵۰ درجهٔ سانتیگراد نگهداری شدند. در زمان استخراج DNA ابتدا نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه یخ‌گشایی شدند. جهت استخراج DNA از نمونه‌ها از پروتکل فنل‌کلروفرم ارائه شده توسط تاجیما و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد (Tajima., 1999). جهت انجام روش PCR-SSCP در این تحقیق دو آغازگر رفت و برگشت با طول ۱۷ باز مربوط به قطعه V3 از ژن 16SrRNA بز به کار برده شدند. توالی آغازگرها در جدول ۵، نشان داده شده‌است (Pitta et al., 2010).

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهندهٔ جیره‌های آزمایشی (بر اساس درصد مادهٔ خشک)

Ingredients	Experimental diets (100%)			
	Non Oak acorn	8% Oak acorn	17% Oak acorn	25% Oak acorn
Alfalfa hay	18.23	17.80	16.50	16.50
Wheat Straw	21.74	18.65	18.47	16.67
Wheat bran	1	4.0	3.80	4.70
Soyben meal	3.06	3.60	5.30	6.24
Barley	55.50	47.50	38.50	30.50
Oak acorn	0	8.0	17.0	25.0
Calcium carbonate	0.47	0.45	0.43	0.39
Chemical analysis				
Dry matter (%)	92.76	92.74	92.77	92.75
Crude protein (%)	11.09	11.09	11.09	11.09
ADF (%)	21.68	21.92	23.12	23.80
(%) NDF	37.46	38	38	38.67
Calcium (%)	0.52	0.52	0.52	0.52
Phosphorus (%)	0.30	0.32	0.31	0.31

جدول ۲. آنالیز شیمیایی میوهٔ بلوط (بر اساس درصد مادهٔ خشک)

Dry matter (%)	Gross energy (%)	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Ash (%)	Calcium (%)	Phosphorus (%)
88.0 + 19.51	4356 + 78	5.33 + 0.11	19.20 + 1.6	13.14 + 2.0	0.28 + 0.04	0.15 + 0.01

جدول ۳. میزان تانن موجود در میوهٔ بلوط

Amount	Total tannins	Condensed tannins	Hydrolyzable tannins
(g/kg DM)	4.34	0.15	4.19
(%)	100	3.5	96.5

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

جدول ۴. غلظت تانن موجود در جیره‌های آزمایشی حاوی سطوح مختلف میوهٔ بلوط

Experimental diets	Amount of Oak acron (g/kg DM)	Total tannin (g/kg DM)	Condensed tannin (g/kg DM)	Table 3. The concentration of tannins found on different levels of oak acron used in the dietHydrolyzable tannin (g/kg DM)
8% Oak acorn	80	3.5	0.1	3.4
17% Oak acorn	170	7.5	0.3	7.2
25% Oak acorn	250	11	0.4	10.6

جدول ۵. آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر ژن 16SrRNA

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

برای انجام واکنش‌های PCR از میکروتیوب‌های ۲۰۰ میکرولیتری استفاده شد. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۰ میکرولیتر بود. Master Mix مورد استفاده به صورت کیت‌های آماده از شرکت فرمنتاز خریداری شد. برای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۱۰ میکرولیتر) روغن معدنی به هر لوله افزوده شد. غلظت هر پرایمر ۰/۲ میکرومولار بود و از کیت شرکت سیناژن برای PCRاستفاده شد. جهت جلوگیری از بروز خطاهای احتمالی در هنگام برداشتن مقادیر کم مواد و نیز افزایش سرعت عمل، محلول پایه‌ای شامل تمامی مواد مورد نیاز برای انجام PCR به جز DNA الگو، باهم مخلوط و بین میکروتیوب‌ها تقسیم شدند. چرخه‌های حرارتی PCR به روش Touchdown انجام گرفت که شامل ۴ مرحله بود. مرحله ۱ یا واسرشت اولیه، شامل ۱ چرخه با ۹۵ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله ۲ یا Touchdown، شامل ۱۰ چرخه که هر چرخه بصورت ۹۴ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجهٔ سانتیگراد (به ازای هر سیکل ۰/۵ درجهٔ سانتیگراد دما کاهش می‌یابد) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله ۳ یا اتصال، شامل ۲۵ چرخه هر چرخه بصورت ۹۴ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله ۴ یا تکثیر نهایی، شامل ۱ چرخه به‌صورت ۷۲ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۴ درجهٔ سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه بود. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNAهای استخراج شده از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل‌آکریل‌آمید ۸ درصد و رنگ‌آمیزی با نیترات نقره استفاده شد. در این پژوهش برای تهیه ژل‌آکریل‌آمید ۸ درصد از استوک ۲۹:۱ آکریل‌آمید به بیس‌آکریل‌آمید استفاده شد. برای تهیه ۲۵ میلی‌لیتر محلول ژل ۸ درصد ۶,۷ میلی‌لیتر از استوک ۲۹:۱، ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE 10X و ۱۷/۰۵ میلی‌لیتر آب مقطر با هم مخلوط شدند سپس به آنها ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۳۰ میکرولیتر تترامتیل‌تیلندیامین[1] اضافه شد.

جهت انجام روش SSCP از ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد استفاده شد. از استوک‌های ۴۹:۱ و ۳۷/۵:۱ برای تهیه ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد استفاده شد. برای تهیه ۲۵ میلی‌لیتر محلول ژل، ۱۰ میلی‌لیتر از استوک ۴۹:۱، ۱/۲۵ میلی‌لیتر بافر TBE 10X، ۵ میلی‌لیتر گلیسرول ۵۰ درصد و ۸/۷۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با هم مخلوط شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۲۵ میکرولیتر تترامتیل‌تیلندیامین اضافه شد. پس از بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل‌آمید ۱۲ درصد، تانک الکتروفورز به درون یخچال (دمای ۴ درجهٔ سانتیگراد) منتقل گردید. دستگاه الکتروفورز به منبع برق متصل و ولتاژ ثابت ۱۷۰ ولت برقرار گردید. پس 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

1. Tetramethylenediamine (TEMED)

در ژل SSCP از نرم افزار OneDscan V.1.3 استفاده شد. پس از تعیین تعداد و نوع باندهای موجود در هر نمونه با استفاده از نرم افزار واندی اسکن، ماتریکس مشخص‌کننده تعداد و نوع باند بصورت اعداد ۰ و ۱ که به ترتیب نشان دهندهٔ عدم حضور و حضور باند بود تهیه گردید. در این بررسی هر باند نشان دهندهٔ یک واحد تاکسونومی است. ماتریکس ۰ و ۱ به دست آمده با استفاده از نرم افزار 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 نرم افزاری SAS استفاده شد (SAS, 2002). این مدل آماری شامل جیره، جایگاه نمونه‌گیری و فاز نمونه‌گیری بود.

1. Operational Taxonomy Unit (OTU)

نتایج و بحث

تحقیقات زیادی در ارتباط با اثر تغذیه میوهٔ بلوط بر مصرف خوراک و بررسی عملکرد دام انجام گرفته است. بررسی تأثیر خوراک بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه به‌عنوان یک جزء ضروری در هضم خوراک و در نهایت متابولیسم حیوان میزبان بسیار کم بوده‌است. بررسی تأثیر خوراک بر تنوع جمعیت باکتریایی نقش بسیار مهمی در بررسی تأثیر جیره بر عملکرد دام دارد. این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر گونهٔ بلوط ایرانی به‌عنوان یک منبع خوراکی حاوی تانن بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه در نژاد بز مرخز انجام گرفته‌است. نتایج به دست آمده از این آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت بلوط در جیرهٔ غذایی دام به‌طور معنی‌داری بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم شکمبه تأثیرگذار است. استفاده از میوهٔ بلوط در مقایسه با جیرهٔ شاهد موجب افزایش تنوع جمعیت باکتریایی اپیتلیال شکمبه- نگاری شد، اما با افزایش سطح میوهٔ بلوط در جیرهٔ غذایی تنوع جمعیت باکتریایی اپیتلیال شکمبه- نگاری به‌طور غیر معنی‌داری کاهش پیدا کرد (جدول ۶).

جدول ۶. تأثیر سطوح مختلف میوهٔ بلوط و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه

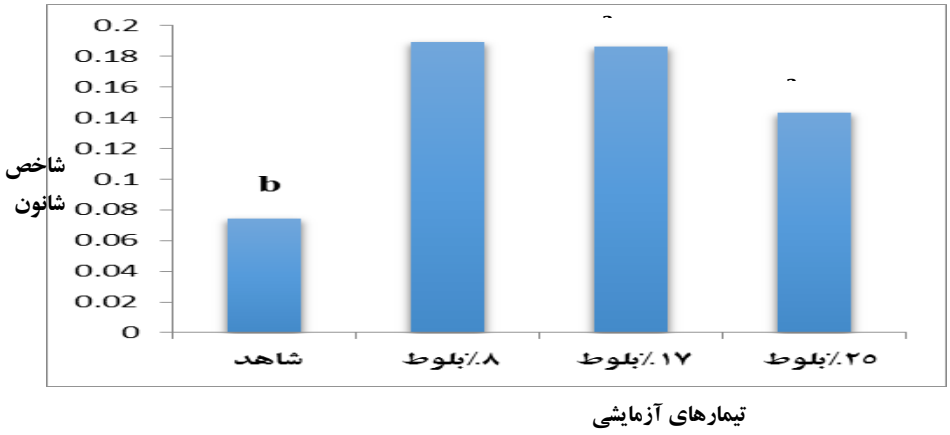
Sample	Oak content of ration (%)	Shannon indicator
Rumen epithelial tissue	0	0.07455^{b}
Rumen epithelial tissue	8	0.18923^{a}
Rumen epithelial tissue	17	0.18636^{a}
Rumen epithelial tissue	25	0.14333^{a}
P Value		P Value < 0.0001
Sample	Sampling position	Shannon indicator
Rumen epithelial tissue	Dorsal rumen	0.16343^{ab}
Rumen epithelial tissue	Ventral rumen	0.15052^{ab}
Rumen epithelial tissue	Caudal rumen	0.14622^{ab}
Rumen epithelial tissue	Lateral rumen	0.12902^{b}
Rumen epithelial tissue	Pilar rumen	0.10322^{b}
Rumen epithelial tissue	Reticulum	0.19783^{a}
P Value		P Value < 0.01
Significant		
Effect of ration	-	***
Position effect of sampling	-	ns
Ration at the sampling position	-	**

تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه: تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۶، ارائه شده‌است. نتایج نشان داد که تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار است (P<۰/۰۰۱). کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (P<۰/۰۵). در بین سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اگرچه تیمارهای حاوی ۸ درصد و ۱۷ درصد بلوط تنوع بیشتری را نسبت به تیمار حاوی ۲۵ درصد بلوط داشتند.

باتوجه به تحقیق حاضر اختلاف معنی‌داری در جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه در نتیجهٔ استفاده از جیرهٔ غذایی حاوی سطوح ۸۰، ۱۷۰ و ۲۵۰ گرم بلوط در کیلوگرم جیرهٔ غذایی با میزان ۳/۵، ۷/۵ و ۱۱ گرم تانن در کیلوگرم جیرهٔ غذایی (به‌ترتیب) نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد که این نتایج می‌تواند در نتیجه حضور تانن موجود در بلوط باشد. تیمارهای حاوی سطوح ۳/۵ و ۷/۵ گرم تانن در کیلوگرم جیره بیشترین شاخص تنوع را نسبت به تیمار حاوی سطوح ۱۱ گرم تانن در کیلوگرم جیره

داشتند. اگرچه شاخص تنوع اختلاف معنی‌داری را میان تیمارهای حاوی بلوط نشان نداد اما با افزایش در سطوح مقدار تانن جیره شاخص تنوع در بین تیمارهای آزمایشی کاهش پیدا کرد (شکل ۱).

شکل ۱. تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون



کاهش فعالیت اوره‌آز و پروتئاز در رابطه با تانن بلوط در شرایط دورن‌تنی[1] گزارش شده‌است. بنابراین، انتظار می‌رود هنگامی که بلوط به تغذیه حیوان می‌رسد فعالیت آنزیمی شکمبه به سطح پایینی کاهش یابد (Lee et al., 1996). در بررسی اثر تانن اسپرس بر رشد و تجزیهٔ پروتئین توسط چهار سویه باکتریایی گزارش شده که رشد باکتری‌های پروتئولایتیک از جمله رومینوباکترآمیلوفیلیس[2]، بوتیریوویبریوفیبریسولونس[3] و استرپتوکوکوس‌بویس[4] کاهش یافت اما تأثیر کمی بر رشد سویه پروتلا-رومینی‌کولا[5] نشان داد. در باکتری‌هایی که توسط تانن مهار شده‌اند تغییرات مورفولوژیکی رخ داده‌است در حالیکه پروتلارومینی-کولا مواد خارج سلولی تولید کرده‌است که این باکتری را از تأثیرات مستقیم تانن محافظت می‌کند. تانن متراکم از فعالیت آنزیم‌های آندوژنوسی ممانعت می‌کند در نتیجه با تشکیل کمپلکس تانن– پروتئین در شکمبه، تجزیهٔ پروتئین در شکمبه ممکن است کاهش یابد که این ممکن است موجب ممانعت از رشد و فعالیت باکتری‌های تجزیهٔ کننده پروتئین شود (Nishitani & Osawa, 2005). 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, 2004). در تحقیقات McAllister و همکاران (1994) و نیز Patra و Saxena (2009a) تغذیه تانن موجب کاهش کل جمعیت باکتریایی شکمبه شد. مشخص شد که 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 مورد نیاز برای مهار رشد وجود دارد (Muetzel & Becker, 2006). تأثیر تانن بر باکتری‌های شکمبه وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن موجود در خوراک است (Patra & Saxena, 2009a). کاهش فعالیت باکتری‌های پروتئولتیک شکمبه در اثر غلظت تانن متراکم به میزان ۴۰۰ میکروگرم و بیشتر از آن در هر لیتر مایع شکمبه در تحقیقات Molanو همکاران (2000) گزارش شد. در مطالعهٔ McSweeney و همکاران (2000) استفاده از عصارهٔ تانن متراکم و قابل هیدرولیز در مایع شکمبه گوسفند موجب کاهش جمعیت باکتریایی شد. شرایط محیطی مانند pH، درجهٔ بی‌هوازی بودن و نیز

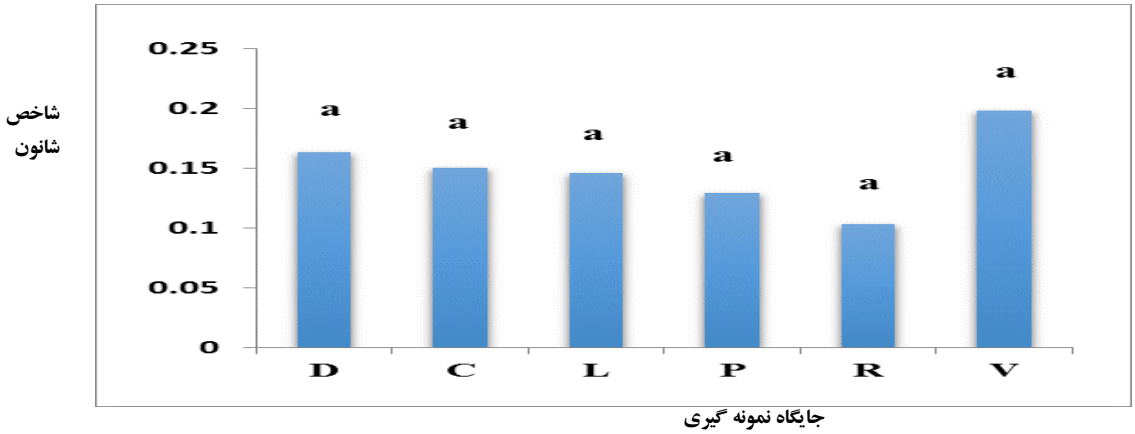
1 in vivo
2. *Ruminobacter amylophilus*
3 *Butyrivibrio fibrisolvens*
4. *Streptococcus Bovis*
5. *Prevotella ruminicola*

منابع و مقدار سوبسترا بر جمعیت باکتریایی شکمبه بسیار تأثیرگذار است (Mehansho et al., 1992). در زمانیکه بلوط به همراه جو به جیره افزوده شده است دو منبع کنسانتره‌ایی دانه جو و میوهٔ بلوط تامین‌کنندهٔ میزان کنسانتره مورد نیاز دام می‌باشند که این خود موجب افزایش تنوع در منابع خوراکی جیره می‌گردد و این می‌تواند بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم‌ها تأثیرگذار باشد.

در تحقیقات Sadet و همکاران (2007) مشخص شد که جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه در بره‌های پنج ماهه تغذیه شده با دو جیرهٔ غذایی حاوی علوفه با سطح بالا و کنسانتره با سطح بالا به مدت ۴ هفته تحت تأثیر جیره قرار نگرفت. با توجه به مطالعات مشابه انجام گرفته توسط Sadet و همکاران (2010)، با افزودن طول دورهٔ آزمایش این محققین نتایج متفاوتی را به دست آوردند و جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه تحت تأثیر جیره‌های آزمایشی قرار گرفت. احتمالاً به دلیل کوتاه بودن دورهٔ آزمایش تأثیر جیرهٔ غذایی بر جمعیت باکتریایی اپیمورال در آزمایش Sadet و همکاران (2007) معنی‌دار نبوده‌است. این مطلب بیان می‌کند که توجه به طول دورهٔ آزمایش در معنی‌دار بودن تأثیر جیره بر جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه مؤثر است.

تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه: تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۶، ارائه شده‌است. نتایج نشان داد که تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار نیست (P>۰/۰۵) بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه ونترال شکمبه و کمترین مقدار مربوط به جایگاه رتیکولوم شکمبه بود (شکل ۲).

شکل ۲. تأثیر جایگاه نمونه گیری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون



نتایج آزمایش حاضر با یافته‌های Sadet و همکاران (2007) مطابقت دارد. این محققین با استفاده از تکنیک PCR-DGGE گزارش کردند که تفاوتی در جمعیت باکتریایی میان نمونه‌های گرفته شده از پنج جایگاه اپیتلیوم شکمبه در هر حیوان وجود ندارد. همچنین این نتایج مشابه با نتایج Lukas و همکاران (2010) بود که با بررسی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه گاو با استفاده از تکنیک PCR-DGGE بیان کردند که اختلافی در ساختار جمعیت باکتریایی متصل به اپیتلیوم شکمبه میان پنج جایگاه نمونه‌گیری از اپیتلیوم در هر حیوان وجود ندارد (Lukas et al., 2010). باکتری‌ها ممکن است ویژگی‌های چسبندگی متفاوتی را برای سلول‌های اپیتلیال گرفته شده از یک مکان از خود نشان دهند. سطوحی از اپیتلیوم که میزان پاپیلا در آن کمتر است و یا هیچ پاپیلایی آن را نمی‌پوشاند جمعیت باکتریایی کمتری دارد. بیشترین میزان جمعیت باکتریایی در بررسی Mccowan و همکاران (1980) مربوط به ناحیه شکمی و پشتی بود. این مکان‌ها کمتر در معرض سایدگی ناشی از فیبر موجود در خوراک قرار می‌گیرند. ویژگی‌های خوراک بر توزیع باکتری‌ها مؤثر است. در حیواناتی که جیرهٔ غذایی با علوفه بالا را دریافت می‌کنند و نیز قوام هضم در سراسر مایع شکمبه آنها یکسان است، الگوهای توزیع کمتر تحت تأثیر قرار می‌گیرد. در این تحقیق در ناحیه کیسه پشتی شکمبه جایی که کیسه‌های هوا قرار دارد بیشترین تعداد باکتری‌های چسپنده مشاهده شد و نیز در مناطق محافظت شده از سایدگی بیشترین تعداد باکتری‌ها مشاهده شد. در واقع اثرات مکانیکی هضم از دو طریق می‌تواند بر تعداد

باکتری‌ها اپیتلیال تأثیر بگذارد، در واقع خوراک یا به‌طور فیزیکی باکتری‌ها را از سطوح اپیتلیال حذف می‌کند یا می‌تواند سرعت لایه‌برداری سلول‌های اپیتلیال را افزایش دهد و بنابراین به‌طور غیرمستقیم سرعت حذف باکتری‌های چسبنده را افزایش دهد (Mccowan et al., 1980). به دلیل تماس نزدیک بین بافت حیوانی و جمعیت باکتریایی اپیمورال، تأثیر میزبان بر این جمعیت بسیار زیاد است (Sadet et al., 2007). الگوهای توزیع جمعیت‌های باکتریایی چسبنده در گاو و گوسفند یکسان نیست و این تفاوت‌ها ممکن است به دلیل تفاوت گونه‌ها یا جیرهٔ غذایی باشد (Mccowan et al., 1980).

اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه: اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول ۶ ارائه شده‌است. نتایج نشان داد که اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار می‌باشد (P>۰/۰۵).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از میوهٔ بلوط تا سطح ۱۷ درصد در جیرهٔ غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیتلیوم شکمبه شد درحالیکه استفاده از سطوح ۲۵ درصد میوهٔ بلوط در جیرهٔ غذایی موجب کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی شکمبه شد. نتایج نشان داد که تأثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار نبود و بیشترین مقدار تنوع زیستی مربوط به جایگاه ونترال شکمبه و کمترین مربوط به رتیکولوم بود. اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار شد.

سپاسگزاری

مطالعهٔ حاضر در دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان انجام گرفته است که بدین وسیله از تمامی کسانیکه در این مجموعه فعالیت دارند تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Cheng, K. J., Fay, J. P., Coleman, R. N., Milligan, L. P., & 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., & 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.

Ebrahimi, A., Khayami, M., & 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. (In Persian).

Ephraim, E., Odenyo, A., & 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., & 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. (In Persian).

Jany, J. L., & 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., & Mosley, E. E. (2007). Board-Invited review: recent

advances in biohydrogenation of unsaturated fatty acids within the rumen microbial ecosystem. *Journal of Animal Scienc*, 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., & 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.

Lee, D. H., Gunzo. Y., & Kim, S. J. (1996). Nonradioactive Method to Study Genetic Profiles of Natural Bacterial Communities by PCR–Single-Strand-Conformation Polymorphism. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*, 62, 3112-3120.

Lorna, J. M., & 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.

Lukas, F., Simunek, J., Mrazek, J,. & Kopecny, J. (2010). PCR-DGGE analysis of bacterial population attached to the bovin rumen wall. *Journal of Folia Microbiol*, 55, 345-348.

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

Mccowan, R. P., Cheng, K. J., & 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, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M. & Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: nutritional consequences for ruminants. *Journal of Animal Feed Science and Technoogy*, 91: 83-93.

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

Muetzel, S., & 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.

Molan, A.L., Hoskin, S.O., Barry, T.N., & McNabb, W.C. 2000. Effect of condensed tannins extracted from four forages on the viability of the larvae of deer lungworms and gastrointestinal nematodes. *Journal of The Veterinary Record*, l47: 44-48.

Nishitani, Y., & Osawa, R. (2005). Deceptive Halo Formation by Tannas- Defective Bacteria on Tannin-Treated Plate Media. *Journal of Microbes Environment, 20*(2), 117-119.

Nocker, A, Burr, M., & Camper, A, K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Journal of Microbial Ecology*, 54, 276-289.

Patra, A. K., & 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., & 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., & 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., & 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., & 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., & Weimer, P. J. (2008). Quntitative analysis of cellulose degradation and growth of celluloly tic bacteria in the rumen. *Journal of FEMS Microbiology Ecology*, 67, 183-197.

Sadet, S., Martin, C., Meunier, B., & 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.

Sadet, S., Martin, C., & Morgavi, D. P. (2010). Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. *Journal of Veterinary Microbiology*, 146, 98–104.

SAS. (2002). User's guide: Statistics, Version 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 210–217.

Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H., & Benno, Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. *Journal of FEMS Microbiology Ecology*, 29: 159-169.