شمارش جمعیت کل باکتریهای شکمبه با استفاده از روش Real time-PCR

علی حسین خانی[۱]، مهدی مرادی[۲]، سید علی رضا وکیلی[۳]، حسین دقیق کیا[۱]

۱- اعضای هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه دام و طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳- عضو هیئت علمی گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد
مسئول مکاتبات مهدی مرادی (m.m.889542103@gmail.com)

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی تاثیر استفاده از سطوح مختلف دانه جو جایگزین با پسماند رستوران در جیره بره-های پرواری، بر جمعیت کل باکتریهای شکمبه بود. بدین منظور ۶ راس بره نر هیبرید (قزل× مرینوس، مرینوس× مغانی و قزل× بلوچی) انتخاب شدند. در جیره‌های پرواری مورد استفاده مقادیر صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد دانه جو با پسماند رستوران، جایگزین شد. در روز ۴۵ پرواربندی مایع شکمبه با استفاده از سوند معدی اخذ شده و پس از صاف شدن فورا به فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتیگراد انتقال یافت. DNA کل باکتریهای گرفته شده از شکمبه بکمک کیت استخراج گردیده و کمیت و کیفیت DNAها تعیین گردید. شمارش و تعیین کمی میکروارگانیسم های شکمبه بصورت مطلق با روش Real- time PCR انجام شد. نتایج تحقیق نشان داد جایگزینی پسماند رستوران با دانه جو در جیره بره های پرواری منجر به تغییر کل جمعیت باکتریایی شکمبه از ۴۳ برای گروه دریافت کننده جیره کنترل، ۷۱ برای جیره با ۵۰ درصد و ۲۴ برای جیره با ۱۰۰ درصد جایگزین شده با پسماند رستوران، گردید؛ هر چند این کاهش جمعیت باکتریایی در تیمار سوم نسبت به شاهد از نظر آماری معنی دار بود ($P<0/05$). جمعیت باکتریایی شکمبه تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب شیمیایی جیره، نرخ عبور مواد هضمی از دستگاه گوارش، سطح مصرف خوراک، سن و pH شکمبه تغییر می‌کند.

کلمات کلیدی: پسماند رستوران، دانه جو، جمعیت باکتریایی شکمبه، Real time-PCR

مقدمه

شکمبه اکوسیستم پیچیده‌ای متشکل از میکروارگانیسم‌های مختلفی از جمله باکتری، قارچ و پروتوزواها می باشد (۱). نشان داده شده است که تعداد باکتریها در شکمبه از 10^{7} تا 10^{12} در هر میلی لیتر مایع شکمبه متغیر است . همین طور بسته به نوع جیره تعداد آنها نیز تغییر می کند مثلا در مواردیکه جیره غنی از سلولز (فیبر خام (باشد باکتریهای کمتری در مقایسه با جیره غنی از نشاسته در شکمبه وجود دارد.

بیش از ۵۰ درصد میکروارگانیسم‌های شکمبه را پروتوزواها تشکیل داده و نقش مهمی در هضم، تثبیت pH، شکستن پروتئین‌های غذا و سلولهای باکتری ایفا می‌کنند (۵). این میکروارگانیسم‌ها همچنین بر بازده مصرف انرژی ناشی از تجزیه مواد در شکمبه موثر می‌باشند (۶).

وستندورف و همکاران نشان دادند که پسماند غذا دارای ارزش تغذیه‌ای بوده و می‌تواند جایگزین مناسبی برای برخی از اقلام خوراکی در جیره حیوانات اهلی باشد (۹). در بیشتر کشورها از پسماند رستوران در جیره خوک استفاده می‌شود (۸). با توجه به ماهیت پسماند رستوران و در نظر گرفتن این نکته که بخش اعظم پسماند رستوران را برنج پخته شده شامل می‌شود لذا می‌تواند الگوی تخمیر در شکمبه را به هنگام جایگزینی با غلاتی نظیر جو متاثر سازد.

بنظر می‌رسد تاکنون آزمایشی در خصوص تاثیر پسماند رستوران بر تغییرات جمعیت باکتریایی شکمبه انجام نگرفته باشد لذا هدف از انجام تحقیق حاضر ارزیابی تاثیر سطوح مختلف پسماند رستوران جایگزین با دانه جو بر جمعیت کل باکتریهای شکمبه در بره‌های پرواری با استفاده از Real-Time PCR بود.

مواد و روشها

نمونه‌های مورد آزمایش از پسماندهای غذایی سلف سرویس مرکزی دانشگاه تبریز استفاده گردید. آنالیز میکروبی پسماند رستوران مورد استفاده در جیره بره‌ها مطابق استاندارد موسسه استاندارد ملی ایران انجام گردید. پسماند رستوران بصورت روزانه و بدون دهیدراته نمودن در جیره کاملا مخلوط و در سه سطح صفر، ۵۰ و ۱۰۰ درصد جایگزین با دانه جو بصورت آزادانه در اختیار بره‌ها قرار گرفت. برای انجام آزمایش از ۳۶ راس بره نر و ماده از هیبریدهای قزل × مرینوس، مرینوس × مغانی و قزل × بلوچی استفاده شد. میانگین وزن اولیه در بره‌های نر و ماده به ترتیب ۰/۵± ۳۳/۴ و ۰/۵± ۲۹/۷ کیلوگرم و سن بره‌ها در شروع آزمایش ۸-۷ ماه بود. آزمایش از اوایل آذر ماه تا اوایل اسفند در طول۱۰۰ روز به انجام رسید که علاوه بر دوره پروار شامل دوره عادت پذیری حیوان به محیط جدید و تعیین حدود اختیاری مصرف خوراک بود. جیره‌ها بر اساس جداول استاندارد احتیاجات گوسفند NRC (۱۹۸۵) متعادل شد. در آغاز دوره عادت‌پذیری، بره‌ها توزین و طوری بین تیمارهای آزمایشی توزیع شدند که میانگین وزن بره‌ها در تیمارها دارای کمترین اختلاف بود. خوراک دهی بره‌ها در سه نوبت صبح، ظهر و عصر بصورت جیره‌های کاملا مخلوط صورت - گرفت.

جدول ۱. ترکیب جیره و آنالیز شیمیایی سطوح مختلف استفاده از پسماند رستوران درجیره بره‌های پرواری

		تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳
اقلام غذایی	علوفه	۳۰	۳۰	۳۰
	دانه جو	۳۸	۱۹	۰
	پسماند رستوران	۰	۱۹	۳۸
	سایر اقلام کنسانتره	۳۲	۳۲	۳۲
ترکیب شیمیایی	ماده خشک (٪)	۸۹/۱±۱/۸	۸۴/۱±۲/۲	۸۱/۸±۲/۶
	پروتئین خام (٪)	۱۱/۹±۲/۲	۱۲/۳±۳	۱۲/۷±۳/۲
	چربی (٪)	۲/۱±۰/۸	۴/۳۴±۲/۱	۶/۶۶±۳/۶
	NDF (%)	۳۸/۵±۲/۵	۳۷/۶±۳/۳	۳۵/۵±۴/۴
	ADF(%)	۱۹/۵±۱/۷	۱۹/۴±۲/۲	۱۹/۴±۲/۹
	انرژی قابل متابولیسم(Mcal/kg)	۲/۶±۰/۳	۲/۵۶±۰/۸	۲/۷±۱/۳

نمونه‌های مایع شکمبه (۲۵۰ میلی لیتر) در ۲ ساعت بعد از وعده خوراک‌دهی صبحگاهی با استفاده از سوند معدی بدست آمد. مایع شکمبه با استفاده از پارچه متقال ۴ لایه صاف گردید سپس برای استخراج DNA سریعا در دمای -۲۰^{oC} قرار داده شد.

ابتدا ۳۰۰ میلی لیتر نمونه جهت شکستن دیواره سلولی بخوبی ورتکس شد. سپس ۳۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده و ۳۰ میکرولیتر پروتیئاز K به مخلوط اضافه و ورتکس گردید. بعد از انکوبه کردن ۱۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانوول جهت رسوب DNA به تیوب‌ها اضافه شد. پس از سانتریفیوژ ۵۰۰ میکرولیتر بافر W1 جهت شستشو به مخلوط اضافه و سانتریفیوژ گردید. مجددا ۵۰۰ میکرولیتر بافر w۲ افزوده و سانتریفیوژ شدند. ۱۰۰ میکرولیتر بافر EL برای شستشو و سانتریفیوژ DNA جدا شد و تا اندازه‌گیری غلظت در دمای -۲۰^{oC} نگهداری شد. غلظت نمونه‌های DNA مستخرجه توسط دستگاه نانودراپ تعیین گردید.

تعیین کمی و شمارش میکروارگانیسم‌های شکمبه بصورت مطلق در Real time RT-PCR بوسیله اندازه‌گیری افزایش تشعشع فلورسنس در نتیجه اتصال رنگ SYBR Green با استفاده از دستگاه ۷۳۰۰ ABI(Applied Biosystems) انجام شد. اجزای واکنش استاندارد کیت شامل مستر میکس، سایبرگرین (۱۲/۵ میکرولیتر)، پرایمر رفت (۰/۴ میکرولیتر)، پرایمر برگشت (۰/۴ میکرولیتر)، نمونه DNA (۱/۲ ماکرولیتر) و آب دوبار تقطیر (۱۰/۵ میکرولیتر) بود. پس از تهیه مستر میکس و ورتکس کردنآن، ۲۳/۸ میکرولیتر از مستر میکس به هر استریپ تیوب افزوده گردیده و سپس نمونه‌ها به دستگاه Real-time PCR انتقال داده شدند.

تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار آماری SAS (۲۰۰۱) نسخه ۹/۱ استفاده شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون توکی در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

بر اساس نتایج بدست آمده در جدول ۲ جمعیت کل باکتریهای شکمبه بین تیمار دوم نسبت به تیمار شاهد افزایش یافته هر پند این تفاوت از نظر آماری معنی نیست. این امر نشان‌دهنده این نکته است که پسماند رستوران می‌تواند بعنوان منبع غنی نشاسته‌ای بوده و سوبسترای مناسبی باشد اما با توجه به کاهش pH شکمبه در تیمار سوم جمعیت باکتریایی کاهش معنی داری را نشان داد. که حاکی از اثر نوع جیره بر جمعیت کل باکتریهای شکمبه می باشد. بنابراین با توجه به ثابت بودن ترکیب جیره در گروههای آزمایشی، کاهش جمعیت باکتریها در این تحقیق می تواند ارتباط مستقیم با مصرف پسماند رستوران داشته باشد.

جدول ۲. جمعیت کل باکتریایی شکمبه در بره‌های تغذیه شده با مقادیر مختلف پسماند رستوران

	تیمار ۱	تیمار ۲	تیمار ۳	میانگین خطای استاندارد
باکتریایی شکمبه	$۴/۳\times۱۰^{-۹}$	$۷/۱\times۱۰^{-۹}$	$۲/۴\times۱۰^{-۹}$	۱/۱۹

تیمار ۱= تیمار فاقد پسماند رستوران (تیمار کنترل)، تیمار ۲= تیمار دانه جو جایگزین با ۵۰ درصد پسماند رستوران و تیمار ۳= تیمار دانه جو جایگزین با ۱۰۰ درصد پسماند رستوران (فاقد دانه جو).

جدول ۳. تاثیر سطوح مختلف پسماند رستوران بر فلور شکمبه‌ای

	pH شکمبه	T-VFA	NH3-N
تیمار ۱	۵/۷۴ a	۷۱/۱ b	۱۳/۶ a
تیمار ۲	۵/۷۷ a	۷۱/۴ b	۱۳/۳ b
تیمار ۳	۵/۵۹ b	۹۱/۵ a	۱۲/۷ a
MSE	۰/۰۴	۰/۴۵	۰/۷۳

T-VFA = کل اسیدهای چرب فرار شکمبه (میلی گرم در دسی لیتر) و NH3-N= نیتروژن آمونیاکی شکمبه (میلی گرم در لیتر)

مقادیر متابولیت‌های شکمبه‌ای، pH شکمبه در جدول ۳ گزارش شده است. تفاوت معنی داری در pH و غلظت کل اسیدهای چرب فرار شکمبه بین تیمارها وجود داشت (P<۰/۰۵). pH شکمبه بره‌های تیمار سوم که در آن ۱۰۰ درصد دانه جو با پسماند رستوران جایگزین گردید، بطور معنی‌داری پایینتر از تیمار کنترل و تیمار ۵۰ درصد بود (P<۰/۰۵). احتمالا کاهش pH شکمبه در این گروه ناشی از تخمیر سریعتر و بیشتر پسماند رستوران در مقایسه با دانه جو بوده است چرا که نسبت مولی اسیدهای چرب فرار در این تیمار بالاتر از تیمارهای دیگر بوده و این امر pH را کاهش داده است.

بیشتر محققان گزارش می‌کنند که pH بر جمعیت کل باکتریایی شکمبه تاثیر مستقیم دارد (۲). جمعیت کل باکتریها در شکمبه تحت تاثیر عوامل مختلفی از جمله ترکیب شیمیایی جیره، نرخ عبور مواد هضمی از دستگاه گوارش، سطح مصرف خوراک، سن و pH شکمبه تغییر می‌کند. مارتین و میکائیل دورئو (۱۱۹۵) نشان دادند که با افزایش دانه جو در جیره، جمیعت هولوتریش‌ها افزایش یافت.

منابع

1- Lee SS, Ha JK, Cheng KJ. 2000. Relative contributions of bacteria, protozoa, and fungi to in vitro degradation of orchard grass cell walls and their interactions. Appl Environ Microbiol. 66: 3807–3813.
2- Franzolin R, Dehority BA. 1996. Effect of prolonged high-concentrate feeding on ruminal protozoa concentrations. J Anim Sci. 74:2803–2809.
3- Santra A, Chaturvedi OH, Tripathi MK, Kumar R, Karim SA. 2003. Effect of dietary sodium bicarbonate supplementation on fermentation characteristics and ciliate protozoal population in rumen of lambs. Small Rumin Res. 47: 203–212.
4- Martin C, Michalet-Doreau B. 1995. Variations in mass and enzyme activity of rumen microorganisms: Effect of barley and buffer supplements. J Sci Food Agric. 67: 407–413.
5- Dehority BA. 2005. Effect of pH on viability of Entodinium caudatum, Entodinium exiguum, Epidinium caudatum, and Ophryoscolex purkynjei in vitro. J Eukaryot Microbiol. 52: 339-342.
6- Russel JB. 2002. Rumen microbiology and its role in ruminant nutrition. 1st ed. Ithaca NY.
7- Franzolin R, Dehority BA. 2010. The role of pH on the survival of rumen protozoa in steers. R Bras Zootec. 39: 2262-2267.

8- Hristov AN, Ivan M, Rode LM, McAllister TA. 2001. Fermentation characteristics and ruminal ciliate protozoal populations in cattle fed medium- or high concentrate barley-based diets. J Anim Sci. 79: 515–524.

9- Westendorf ML, Dong ZC, Schoknecht PA. 1998. Recycled cafeteria food waste as a feed for swine: nutrient content, digestibility, growth, and meat quality. J Anim Sci. 76:2976-2983.