Sari Agriculture Sciences and Natural Resources University

Research on Animal Production, Vol. 15, Issue 2, 2024 p: 69-79

OPEN ACCESS

Research Paper

The Difference of the Rumen Microbial Population in Cyclic and Acyclic Grey Shirazi Ewes

Zahra Bolooki[1], Mohammad Reza Jafarzadeh Shirazi[2], Mojtaba Kafi[3], Shahryar Kargar[4] and Alidad Boostani[5]

1- Ph.D. student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
2 Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran, (Corresponding author: jafarzd@shirazu.ac.ir)
3- Department of Animal Reproduction, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
4- Associate Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran
5- Animal Science Research Department, Fars Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Shiraz, Iran

Received: 11 July, 2023 Accepted: 13 October, 2023

Extended Abstract

Background: So far, changes in the vaginal microbial population during the estrous cycle have been evaluated in several livestock species such as sheep. However, changes in the rumen microbial population have not been investigated during the estrous period in sheep. In a study, the results showed that the differences in the rumen microbial population in two reproductive seasons were due to the differences caused by the reaction to day length, and nutrition did not have much effect on it. It is possible that during the reproductive and non-reproductive seasons, the animal has a different microbial population in the digestive tract. The available evidence from clinical research in animals shows that microbes in the digestive system can alter brain activity and behavior through hormonal and neural pathways. Therefore, this study mainly aims to investigate changes in the rumen microbial population during the reproductive season in the estrous period in ewes with estrus and those without estrus for any reason or are so-called anestrus. The changes in the rumen microbial population during the breeding season in the estrous period were measured for the animals showing the occurrence of estrus and those not showing this trait or were anestrous.

Methods: This research was done at the same time as the non-breeding season (late spring-beginning of July). The ewes were of Grey Shirazi breed (2-3 years old). To investigate changes in the rumen fluid microbial population in the estrus cycle in estrus and non-estrus animals, two groups of 10 animals were formed from estrus and anestrus animals with the use of teaser rams, and rumen fluid samples were collected for microbial culture and other investigations in both groups once per four days (5 times) during 17 days (like estrus cycle days). The colonies were cultured and separated using general culture media with different growth factors for anaerobic bacteria colonies, such as plate count agar, MRS agar (de Man-Rogosa - Sharpe), and starch agar. The colonies were subtracted by subtractive cultures or different diagnostic tests to identify colonies. Data were analyzed using SAS software version 1/9. Means were compared with the least square procedure and adjusted for Tukey's test.

Results: The population difference between the two groups at 5 different times showed that the population of lactic acid bacteria (LAB) on the day of estrus showed a higher value and a significant difference with other times than the anestrus group. Lipolytic bacteria were higher on the day of estrus than on all days in both groups, with a significant difference. The comparison of different groups showed that the estrous group from times 1 to 5 in the breeding season had the highest number compared to the other groups at different times of the study ($p < 0.05$). Anestrous groups also had the lowest number at all times ($p < 0.05$). The comparison of the two estrus and anestrus groups showed that heat and ninth days had higher values than the other times. In comparing the average number of lipolytic colonies in the estrus group, the highest and the lowest numbers belonged to the 1st and the 4th times, respectively, which were significantly different from the other times ($p < 0.05$). The population of proteolytic bacteria had the highest number of bacteria at time 1 and showed the next values at times 2, 5, 3, and 4, respectively, compared to the estrus group at time 5 ($p < 0.05$). Time 5 was not significantly different from times 2 and 3 ($p < 0.05$). In this season, the estrus group was the highest and the lowest at times

Copyright ©2024 Bolooki et al. Published by Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University.
This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 Unported License which allows users to read, copy, distribute and make derivative works for non-commercial purposes from the material, as long as the author of the original work is cited

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

1 and 4, respectively ($p < 0.05$). Times 3-5 were no different significantly ($p < 0.05$). In the anestrus group, times 3 and 1 had the highest number vs. the lowest numbers in times 2 and 5 ($p < 0.05$). Based on the comparison of the average population resulting from the counting of total bacterial colonies in the examination of different groups, the estrous group had the highest number of the average microbial population in all 5 times ($p < 0.05$). The lowest number belonged to two anestrus groups ($p < 0.05$). The population difference between the two groups at 5 different times showed that the population of LAB had a higher value only on the day of estrus, with a significant difference compared to the anestrous group. The population of lipolytic bacteria in two groups of estrus and anestrus in the 5 studied times showed that the estrus group had a higher and significant value than the anestrus group in the 4th time, i.e. the day of estrus and days 5, 6, and 17. The results showed that the total bacterial population was higher in the estrus group at all times, with a significant difference. Furthermore, anaerobic bacteria increased significantly in certain days of estrus (days 1-9) compared to the anestrous group. The population difference between the two groups at 5 different times indicated that the population of LAB had a higher value only on the day of estrus, with a significant difference compared to the anestrous group. The population of lipolytic bacteria in the two estrus and anestrus groups in the 5 studied times revealed that the estrus group had a higher and significant value than the anestrus group in 4 times, i.e. days of estrus, 5, 6, and 17. The total bacterial population in the estrous group was higher and significant at all times.

Conclusion: In general, the colony population of amylolytic and lipolytic bacteria and the total colonies of anaerobic bacteria are significantly different on days of the estrus cycle, which may affect reproduction. Accordingly, it is better to provide more understandable results of rumen microbial effects on estrus in ewes by increasing analyses such as hormonal changes and molecular investigations, along with microbial culture in estrus crops.

Keywords: Grey Shirazi, Microbe, Reproduction, Rumen

How to Cite This Article: Bolooki, Z., Jafarzadeh Shirazi, M. R., Kafi, M., Kargar, K., & Boostani, A. (2024). The Difference of the Rumen Microbial Population in Cyclic and Acyclic Grey Shirazi Ewes. *Res Anim Prod*, 15(2), 69-79. DOI: 10.61186/rap.15.2.69

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

OPEN ACCESS

مقاله پژوهشی

بررسی تفاوت جمعیت میکروبی شکمبه در میش‌های سیکلیک و آسیکلیک کبوده شیرازی

زهرا بلوکی[۱] و محمدرضا جعفرزاده شیرازی[۲]، مجتبی کافی[۳]، شهریار کارگر[۴] و علی‌داد بوستانی[۵]

۱- دانشجو دکتری بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲- دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران، (نویسنده مسوول: jafarzd@shirazu.ac.ir)
۳- استاد تمام بخش تولیدمثل و مامایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۴- دانشیار بخش علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۵- استادیار مرکز تحقیقات و منابع طبیعی استان فارس، شیراز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۲۱
صفحه: ۶۹ تا ۷۹

چکیده مبسوط

مقدمه و هدف: تا به‌حال تغییرات جمعیت میکروبی واژن در چرخه فحلی در چندین گونه از گونه‌های دامی مانند گوسفند ارزیابی شده است. اما تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه در طی دوره‌ی فحلی در گوسفندان مورد بررسی قرار نگرفته است. در مطالعه‌ای نتایج نشان داد اختلاف‌های جمعیت میکروبی شکمبه در دو فصل تولیدمثلی، به‌دلیل تفاوت‌های ناشی از واکنش به طول روز بوده و تغذیه اثر چندانی بر آن نداشته است. این احتمال وجود دارد که در فصول تولیدمثلی و خارج تولیدمثلی حیوان دارای جمعیت میکروبی متفاوتی در دستگاه گوارش باشد و از آن جا که شواهد موجود از پژوهش‌ها بالینی در جانداران نشان می‌دهد، میکروب‌های سیستم گوارشی می‌توانند فعالیت مغز و رفتار را از طریق مسیرهای هورمونی و عصبی تغییر دهند. بنابراین، در این مطالعه هدف اصلی بررسی تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه در فصل تولیدمثلی در دوره‌ی فحلی در میش‌هایی که بروز فحلی دارند و میش‌هایی که به هر علتی آن را نشان نمی‌دهند یا به اصطلاح انستروس هستند. تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه فصل تولیدمثلی در دوره‌ی فحلی برای دام‌هایی که بروز فحلی داشتند و دام‌هایی که این صفت را نشان نمی‌دهند یا انستروس بودند سنجش شد.

مواد و روش‌ها: این پژوهش هم زمان با شروع فصل غیرتولیدمثلی (اواخر بهار- آغاز تیر ماه) انجام شد؛ میش‌ها نژاد کبوده شیراز (۲-۳ ساله) بود. جهت بررسی تغییرات جمعیت میکروبی مایع شکمبه دو گروه ۱۰ راسی از دام‌های استروس و انستروس با کمک دام نر فحل یاب تشکیل شد و هر چهار روز یک بار (۵ زمان) نمونه مایع شکمبه جهت کشت میکروبی و سایر بررسی‌ها در هر دو گروه جمع‌آوری شد. برای کشت و تفریق کلنی‌ها، ابتدا از محیط‌کشت عمومی و دارای رشد متفاوت برای کلنی باکتریوم‌های بی‌هوازی مانند پلیت کانت آگار (Plate count agar)، MRS آگار (de Man-Rogosa - Sharpe) و نشاسته آگار (Starch agar) استفاده شد و برای تفریق کلنی‌ها نیز محیط‌کشت‌های تفریقی یا واکاوی‌های تشخیصی مختلف جهت شناسایی کلنی‌ها انجام گرفت. به کمک نرم افزار SAS نسخه ۹/۱، واکاوی داده‌ها انجام شد. میانگین‌ها با رویه کمینه مربعات و تصحیح برای آزمون توکی مقایسه شدند.

یافته‌ها: با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، تفاوت جمعیت بررسی شده در بین دو گروه در ۵ زمان مختلف نشان داد که جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در روز فحلی مقدار بالاتر و تفاوت معنی‌داری را با سایر زمان‌ها در مقایسه با گروه انستروس نشان دادند. باکتری‌ها لیپولاتیک در روز فحلی نسبت به تمامی روزها در هر دو گروه بالاتر بوده و دارای تفاوت معنی‌دار نیز هست. مقایسه گروه‌های‌های مختلف نشان داد که زمان‌های ۱ تا ۵ گروه استروس در فصل تولیدمثلی بیش‌ترین تعداد را نسبت به سایر گروه‌ها در زمان‌ها مختلف مطالعه دارد ($p<۰/۰۵$). گروه‌های انستروس نیز در تمامی زمان‌ها کم‌ترین تعداد را داشتند ($p<۰/۰۵$). مقایسه دو گروه استروس و انستروس در دو گروه نشان داد که روزهای فحلی و نهم دارای مقادیر بالاتری نسبت به سایر زمان‌ها هستند. در مقایسه میانگین تعداد جمعیت کلنی‌های لیپولایتیک در گروه استروس، بیش‌ترین تعداد مربوط به زمان اول و کم‌ترین آن مربوط به زمان ۴ بود که تفاوت معنی‌دار با سایر زمان‌ها داشتند ($p<۰/۰۵$). جمعیت باکتری‌های پروتئولایتیک، در زمان ۱ بیش‌ترین تعداد باکتری‌های را داشت و به‌ترتیب زمان‌های ۲، ۵، ۳ و ۴ مقادیر بعدی را در مقایسه گروه استروس در ۵ زمان نشان داد ($p<۰/۰۵$)؛ زمان ۵ با زمان‌های ۲ و ۳ تفاوت معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$). گروه استروس در این فصل در زمان ۱، بیش‌ترین و کم‌ترین در زمان ۴ بود ($p<۰/۰۵$). زمان‌های ۳ تا ۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p>۰/۰۵$) در گروه انستروس زمان ۳ و ۱ بیش‌ترین تعداد و زمان ۲ و ۵ کم‌ترین تعداد را داشتند ($p<۰/۰۵$). مقایسه میانگین جمعیت حاصل از شمارش کلنی‌های کل باکتری‌ها نشان داد، در بررسی گروه‌های مختلف، گروه استروس در هر ۵ زمان بیش‌ترین تعداد از میانگین جمعیت میکروبی را داشت ($p<۰/۰۵$). کم‌ترین تعداد مربوط به دو گروه انستروس بود ($p<۰/۰۵$). تفاوت جمعیت بررسی شده در بین دو گروه در ۵ زمان مختلف نشان داد که تنها در روز فحلی جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک مقدار بالاتر و تفاوت معنی‌داری را در مقایسه با گروه انستروس دارند. جمعیت باکتری‌های لیپولایتیک در دو گروه استروس و انستروس در ۵ زمان مورد مطالعه نشان داد، گروه استروس در ۴ زمان یعنی روز فحلی و زمان‌های ۵، ۶ و ۱۷ مقدار بالاتر و معنی‌داری نسبت به گروه انستروس دارد. نتایج نشان داد در تمامی زمان‌ها مقدار جمعیت باکتری کل در گروه استروس شمار بیشتری داشت و این تفاوت معنادار بود. همچنین نتایج نشان داد، باکتری‌های بی‌هوازی در روزهای خاصی از فحلی (روز اول تا نهم) دارای افزایش شایان توجهی نسبت به گروه انستروس داشتند.

نتیجه‌گیری: به‌طور کلی نتیجه این پژوهش نشان داد، جمعیت کلنی باکتری‌های آمیلولیتیکی، لیپولیتیکی و کل کلنی‌های حاصل از باکتری‌های بی‌هوازی دارای تفاوت معنی‌داری در روزهای چرخه استروس هستند که ممکن است می‌توانند بر تولیدمثل اثرگذار باشند. بر این اساس، بهتر است در مطالعات پیش‌رو با افزایش آنالیزها مانند تغییرات هورمونی و بررسی‌های ملکولی همراه با کشت میکروبی در دروه فحلی نتایج قابل درک‌تری از اثر میکروبی شکمبه بر فحلی در میش ارائه داد.

واژه‌های کلیدی: تولیدمثل، شکمبه، کبوده شیرازی، میکروب

مقدمه

در گونه‌های دامی مورد پرورش ایران، گوسفندان در بین نشخوارکنندگان سطح پرورشی بالایی به خود اختصاص می‌دهند و محصولات متنوعی تولید می‌کنند. قابل توجه است که بررسی روند تغییر جمعیت دامی طی سال‌های اخیر نشان‌دهنده کاهش ضریب رشد جمعیت گوسفندان است (Mousavi & Sokhtezari, 2011). با این وجود، یکی از موارد حساس و قابل توجه در رشد جمعیت گوسفندان بروز

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

ضعیف فحلی است که کارآیی تولیدمثلی را در این گونه‌ی حیوانی کاهش داده است (Allden, 1968, 1970). فحلی به‌عنوان شاخصی برای تخمک‌ریزی و زمان مناسب جفت‌اندازی یا تلقیح مصنوعی شناخته می‌شود. در این صورت، روش‌های مدیریتی مختلفی وجود دارد که در آن با استفاده از رژیم‌های متفاوت خوراک، برنامه‌های قطع شیر، زمان معرفی قوچ، استفاده از قطعات حاوی پروژسترون (سیدر[1] و اسفنج)، هورمون‌های گنادوتروپین و کاشت‌های ملاتونین[2] می‌توان چرخه تولیدمثلی میش را کنترل نمود. در طی سالیان اخیر، چندین راهکار بلندمدت و کوتاه‌مدت در غالب روش‌های اصلاحی، هورمون درمانی و تغذیه‌ای برای بهبود عملکرد تولیدمثلی گوسفند در ایران به شکل‌های مختلف آغاز شده است (Mousavi & Sokhtezari, 2011). تشخیص دقیق زمان فحلی در میش‌ها روش مناسبی در راستای اجرای زمان مناسب‌تر و کم خطاتر تلقیح و در نتیجه افزایش بازده تولیدمثلی است، زیرا پژوهش‌ها قبلی در مورد رفتارهای جنسی گوسفند نشان داده است که میش‌ها نقش اصلی را در ایجاد رفتارهای جنسی در قوچ‌ها بر عهده دارند (Rekwot *et al.*, 2001).

با بررسی شرایط حاکم بر بازار ایران در مصرف گوشت دامی مشاهده می‌شود، علاقه به مصرف گوشت گوسفندی بیش‌تر است. ضعف مدیریت، عدم وجود سیستم‌های پرورشی مناسب یا راهبردهای کم هزینه و بالقوه، عامل محدودسازی کمیت صفات تولیدی و تولیدمثل گله‌های ایرانی و عدم صرفه اقتصادی پرورش گوسفند شده است (Mousavi & Sokhtezari, 2011). از این‌رو، سال‌ها است که پژوهش‌گران علاقه‌مند به استفاده از منابع جمعیت میکروبی شکمبه در جهت کاهش هزینه‌های مصرفی برای بهبود استفاده از تمامی انژری خوراک هستند. بنابراین، در کنار تولید حیوانات، سلامت حیوانات و هم‌چنین در سال‌های اخیر ایمنی و کیفیت محصولات خوراکی حاصل از نشخوارکنندگان نیز مورد اهمیت واقع شده است. این اهداف با تسهیل تخمیر مطلوب، کمینه کردن اختلالات گوارشی شکمبه و محرومیت از عوامل بیماری‌زا حاصل می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها[3] و پری‌بیوتیک‌ها[4] با هدف دست‌کاری جمعیت میکروبی و ویژگی‌های تخمیر در شکمبه و روده دام مورد پژوهش قرارگرفته‌اند (Seo *et al.*, 2010). از طرفی، پژوهش‌گران با استفاده از انواع پروبیوتیک‌ها سبب افزایش بهره‌وری شکمبه در راستای بهبود صفات تولیدمثلی و یا سلامت شکمبه و دام می‌شوند (Wanapat *et al.*, 2003) . تا به حال تغییرات جمعیت میکروبی واژن در چرخه فحلی در چندین گونه از جمله پستانداران و بعضی از گونه‌های دامی مانند گوسفند ارزیابی شده است (Deng *et al.*, 2019). اما تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه در طی دوره‌ی فحلی در گوسفندان مورد بررسی قرار نگرفته است.

پژوهشی برای اولین بار با حذف اثر تغذیه، تأثیر واکنش به طول روز[1] را بر ترکیب جمعیت میکروبی شکمبه گوسفندان ارزیابی کرده است. نتایج این پژوهش نشان داد به احتمال زیادی اختلاف‌های جمعیت میکروبی در دو فصل تولیدمثلی، به دلیل تفاوت‌های ناشی از واکنش به طول روز بوده و تغذیه اثر چندانی بر آن نداشته است (McEwan *et al.*, 2005).

این احتمال وجود دارد که در فصول تولیدمثلی و خارج تولیدمثلی حیوان دارای جمعیت میکروبی متفاوتی در دستگاه گوارش باشد و از آن جا که شواهد موجود از پژوهش‌ها بالینی در جانداران نشان می‌دهد، میکروب‌های سیستم گوارشی می‌توانند فعالیت مغز و رفتار را از طریق مسیرهای هورمونی و عصبی تغییر دهند (Cryan & Dinan, 2012; Dinan & Cryan, 2013).

بنابراین، در این مطالعه هدف اصلی بررسی تغییرات جمعیت میکروبی شکمبه در فصل تولیدمثلی در دوره‌ی فحلی در میش‌هایی که بروز فحلی دارند و میش‌هایی که به هر علتی آن را نشان نمی‌دهند یا به اصطلاح انستروس هستند.

مواد و روش‌ها

حیوانات و بررسی فحلی

این پژوهش هم زمان با شروع فصل غیرتولیدمثلی (اواخر بهار– آغاز تیر ماه) انجام شد؛ میش‌ها نژاد کبوده شیراز (۲–۳ ساله) بود. قبل از شروع آزمایش شرایط سلامت دام ابتدا با بررسی شجره و پرسش از گله‌دار بررسی شد؛ سپس دام‌ها توسط دامپزشک نیز مورد معاینه قرار گرفتند. شرایط نگهداری گوسفندان در سیستم نیمه باز در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس بود و خوراک و آب به صورت مرتب در اختیار آن‌ها قرار گرفت. جیره دوره آزمایش به دام‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱– ترکیبات جیره* مصرفی در طی انجام آزمایش میش‌های کبوده شیرازی استروس و انستروس

Table 1. Compositions of diet* consumed during the experiment of Gray Shirazi ewes in estrus and anestrus

	اقلام جیره(Diet)	گرم/راس/ روز(gr/head/day)
1	یونجه خشک(dry hay)	200-250
2	سیلو ذرت(corn silage)	300-500
3	کنسانتره(concentrate)	50-70
4	کاه(straw)	250-300

* بر اساس NRC سال ۲۰۰۷ و برای هر راس دام در وزن ۵۰ کیلوگرم

*Based on NRC of 2007 and for each head of livestock weighing 50 kg

هدف از اجرای این آزمایش بررسی تغییرات جمعیت میکروبی مایع شکمبه در چرخه فحلی دو گروه ۱۰ راسی از دام‌های سیکلیک و غیرسیکلیک تشکیل شد و هر چهار روز یک بار به مدت حدود ۱۷ روز برابر با یک دوره فحلی نمونه مایع شکمبه جهت کشت میکروبی و سایر بررسی‌ها در هر دو گروه جمع‌آوری شد.

1- Controlled internal drug release (CIDR) 2- Melatonin implant 3- Probiotic 4- Prebiotic

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

شرایط محیطی

در طی این آزمایش، دمای محیط و رطوبت نسبی ثبت شد. تمام حیوانات با طلوع آفتاب در ساعت ۰۶:۳۰ و غروب آفتاب در ساعت ۱۹:۰۰ در زیر نور طبیعی نگهداری شدند. جهت حذف اثر حیوان نر بر بروز فحلی، دام‌ها نر در نزدیکی دام‌های ماده نگهداری شدند؛ به شیوه‌ای که محرک‌های دیداری (Visual) و فرومونی برهم کنش داشته باشند.

تشخیص فحلی

با توجه به میانگین کمینه نشان دادن فحلی حدودا ۱۸ ساعت و بیشنیه ۱۹ روز برای چرخه فحلی (Senger & TO, 2012) از زمان شروع کار در مزرعه برای تعیین دام‌های استروس و انستروس برای هر راس نهایت نوزده روز پیگیری انجام شد. بر اساس ۱۸ ساعت، دام‌ها روزی سه نوبت هر شش ساعت از منظر نشانه‌های بروز فحلی توسط دام فحل یاب تحت نظر قرار گرفتند. این کار تا زمانی ادامه پیدا کرد که در هر گروه ۱۰ راس دام قرار گیرد. هر ۴ روز یک بار از هر دام که بروز فحلی داشتند تا پایان چرخه بعدی نمونه شکمبه جهت کشت و بررسی جمعیت میکروبی (شمارش تعداد کل میکروارگانیسم‌ها، چهار کلاس از باکتریوم‌های موجود در شکمبه) گرفته شد.

جمع‌آوری نمونه شکمبه

هر ۴ روز یک بار مایع شکمبه از دام‌های فحل جهت کشت میکروبی گرفته شد. بلافاصله پس از جمع‌آوری، نمونه هضمی شکمبه کاملا مخلوط و از ۴ لایه پارچه توری نازک عبور داده شدند (Seo et al., 2010) . نمونه‌ها در ۵ نوبت (روز ۱، ۵، ۹، ۱۳ و ۱۷) از دام‌های استروس و انستروس گرفته شد. این مقدار در هر نوبت برابر ۱۰۰ میلی‌لیتر بود. تمامی نمونه‌ها بعد از بررسی pH برای سنجش‌های بعدی به‌صورت ذیل آماده شدند.

کشت میکروبی

ابتدا بررسی کلی باکتریوم‌ها، انجام شد؛ سپس کلاس‌بندی مختلف باکتریوم‌ها (تولیدکننده اسیدلاکتیک، پروتئولایتیک، آمیلولایتیک، لیپولایتیک) که فراوان‌ترین هستند شمارش شد. در این پژوهش میکروب‌های بی‌هوازی ارزیابی شدند.

از مایع شکمبه گوسفند، به میزان ۱۰ میلی‌لیتر نمونه برداشته شد و در شرایط سترون به همراه ۹۰ میلی‌لیتر محلول سترون محیط‌کشت پپتون واتر (Peptone water) با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد مخلوط شد. سپس محلول رویی به‌عنوان رقت 10^{-1} برای تهیه رقت‌های بعدی به‌طریق رقیق‌سازی سریالی با کمک محیط پپتون واتر تهیه شد. به‌منظور شمارش مجموع ریزجانداران (Microorganisms) بی‌هوازی موجود در مایع شکمبه، یک میلی‌لیتر از رقت‌های مختلف تهیه شد و به‌وسیله پیپت در داخل ظروف کشت میکروب سترون ریخته شد. بعد از اضافه کردن محیط‌ها ظروف کشت میکروب به‌صورت 8 (۸ انگلیسی) حرکت داده شد تا نمونه و محیط‌کشت کاملاً مخلوط شود. سپس ظروف کشت میکروب‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در پایان ۴۸ ساعت، تمامی کلنی‌های رشد کرده در سطح ظروف کشت میکروب شمارش شد.

جهت کشت و تفریق کلنی‌ها، ابتدا از محیط‌کشت عمومی و دارای رشد متفاوت برای کلنی باکتریوم‌های بی‌هوازی مانند: پلیت کانت آگار (Plate count agar)، MRS آگار (de Man-Rogosa - Sharpe) و نشاسته آگار (Starch agar) استفاده شد و برای تفریق کلنی‌ها نیز محیط‌کشت‌های تفریقی یا واکاوی‌های تشخیصی مختلف جهت شناسایی کلنی‌ها انجام گرفت (Ghorbani *et al.*, 2002).

برای محاسبه جمعیت ریزجانداران بی‌هوازی، یا کلنی‌های باکتریومی سنجش شده و هر میکروب موجود در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه از فرمول زیر استفاده شد.

$N = (Log_{10} CFU)$

N = جمعیت ریزجانداران بی‌هوازی و هر میکروب موجود در هر میلی‌لیتر مایع شکمبه

CFU = شمار کلنی‌های تشکیل شده در ظرف کشت

به‌کمک نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱، واکاوی داده انجام شد. میانگین‌ها با رویه کمینه مربعات و تصحیح برای آزمون توکی مقایسه شد.

نتایج و بحث

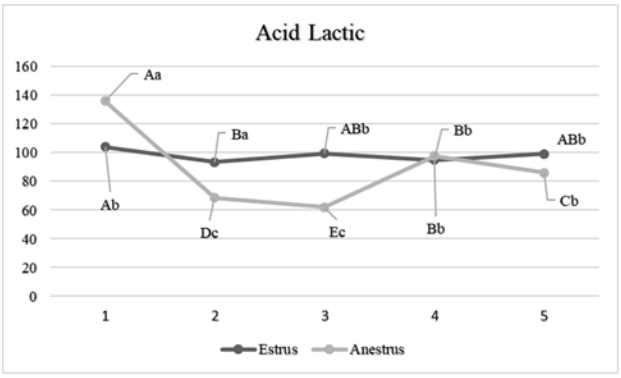
مقایسه میانگین کشت میکروبی

بر اساس جدول شماره ۱، نتایج مربوط به کشت میکروبی با اثر سه گانه فصل، گروه و زمان آورده شده است. تحلیل آماری نشان داد که در فصل تولیدمثلی در گروه استروس بیش‌ترین تعداد جمعیت کلنی‌های باکتریومی تولیدکننده اسیدلاکتیک در زمان اول بود و تفاوت معنی‌دار نسبت به سایر زمان‌های این گروه دارد ($p<۰/۰۵$). کم‌ترین تعداد این جمعیت مربوط به زمان سوم بود و تفاوت معنی‌دار با سایر زمان‌ها داشت ($p<۰/۰۵$). در رابطه با گروه انستروس در فصل تولیدمثلی می‌توان مشاهده کرد، بیش‌ترین تعداد در زمان‌های ۱، ۳ و ۵ است و زمان ۱ با سایر زمان‌ها تفاوت معنی‌دار داشت ($p<۰/۰۵$)، این در حالی است که کم‌ترین تعداد در زمان‌های ۲ و ۴ مشاهده شد ($p>۰/۰۵$).

تفاوت جمعیت بررسی شده در بین دو گروه در ۵ زمان مختلف نشان داد که جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در روز فحلی مقدار بالاتر و تفاوت معنی‌داری را با سایر زمان‌ها در مقایسه با گروه انستروس نشان دادند (شکل ۱).

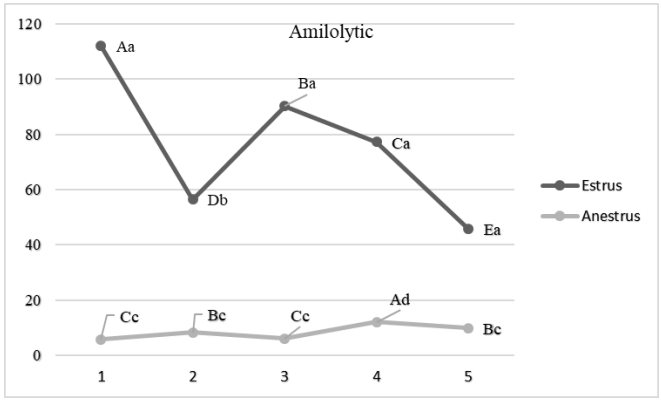
[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]



شکل ۱- تفاوت جمعیت باکتری‌های تولیدکننده اسیدلاکتیک در بین دو گروه در ۵ زمان
* A-C: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در پنج زمان است.
a-c: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در فصل تولیدمثلی است.
Figure 1. The difference in the population of lactic acid producing bacteria between the two groups at 5 times
* A-C: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the five times.
a-c: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the breeding seasons.

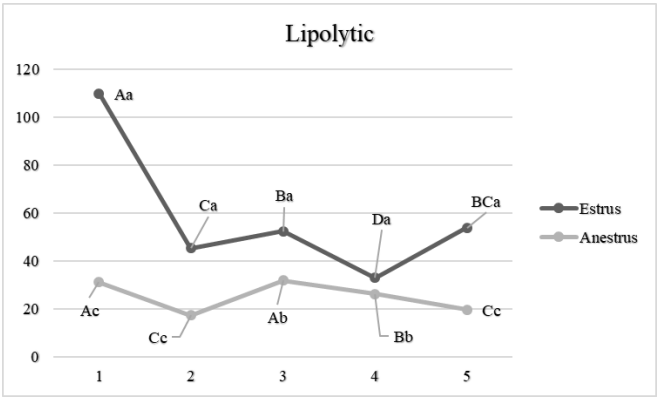
مقایسه گروه‌های‌های مختلف نشان داد که زمان‌های ۱ تا ۵ گروه استروس در فصل تولیدمثلی بیش‌ترین تعداد را نسبت به سایر گروه‌ها در زمان‌ها مختلف مطالعه دارد (p<۰/۰۵). گروه‌های انستروس نیز در تمامی زمان‌ها کم‌ترین تعداد را داشتند (p<۰/۰۵). مقایسه دو گروه استروس و انستروس در دو گروه نشان داد که روزهای فحلی و نهم دارای مقادیر بالاتری نسبت به سایر زمان‌ها هستند (شکل ۲).



شکل ۲- تفاوت جمعیت باکتری‌های آمیلولایتیک در بین دو گروه در ۵ زمان
* A-C: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در پنج زمان است.
a-c: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در فصل تولیدمثلی است.
Figure 2. The difference in the amylolytic bacteria between the two groups at 5 time
* A-C: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the five times.
a-c: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the breeding season.

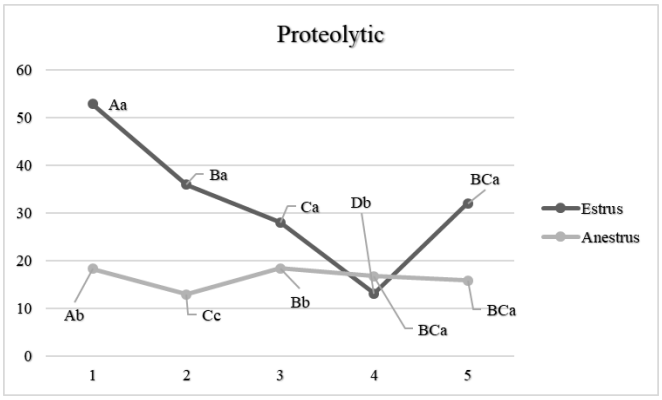
در مقایسه میانگین تعداد جمعیت کلنی‌های لیپولایتیک در گروه استروس (جدول ۴-۳)، بیش‌ترین تعداد مربوط به زمان اول و کم‌ترین آن مربوط به زمان ۴ بود که تفاوت معنی‌دار با سایر زمان‌ها داشتند (p<۰/۰۵). در گروه انستروس زمان ۳ و ۱ بیش‌ترین تعداد و زمان ۲ و ۵ کم‌ترین تعداد را داشتند (p<۰/۰۵) (شکل ۳).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]



شکل ۳- تفاوت جمعیت باکتری‌های لیپولایتیک در بین دو گروه در ۵ زمان
* A-C: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در پنج زمان است.
a-c: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در فصل تولیدمثلی است.
Figure 3. The difference in the lipolytic bacteria between the two groups at 5 time
* A-C: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the five times.
a-c: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the breeding season.

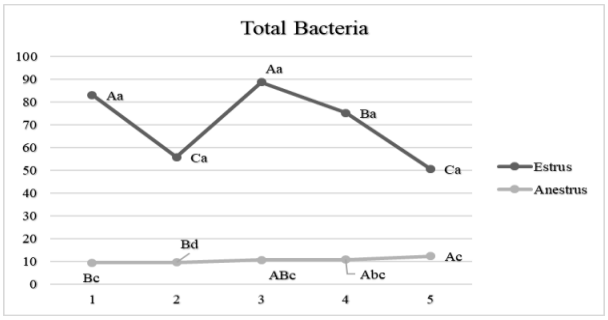
جمعیت باکتری‌های پروتئولایتیک (۱)، در زمان ۱ بیش‌ترین تعداد باکتری‌های را داشت و به‌ترتیب زمان‌های ۲، ۵، ۳ و ۴ مقادیر بعدی را در مقایسه گروه استروس در ۵ زمان نشان داد ($p<۰/۰۵$)؛ زمان ۵ با زمان‌های ۲ و ۳ تفاوت معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$). گروه استروس در این فصل در زمان ۱، بیش‌ترین و کم‌ترین در زمان ۴ بود ($p<۰/۰۵$). زمان‌های ۳ تا ۵ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند ($p>۰/۰۵$) (شکل ۴).



شکل ۴- تفاوت جمعیت باکتری‌های پروتئولایتیک در بین دو گروه در ۵ زمان
* A-C: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در پنج زمان است.
a-c: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در فصل تولیدمثلی است.
Figure 4. The difference in the Proteolytic bacteria between the two groups at 5 time
* A-C: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the five times.
a-c: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the breeding season.

مقایسه میانگین جمعیت حاصل از شمارش کلنی‌های کل باکتری‌ها نشان داد (جدول ۱)، در بررسی گروه‌های مختلف، گروه استروس در هر ۵ زمان بیش‌ترین تعداد از میانگین جمعیت میکروبی را داشت ($p<۰/۰۵$). کم‌ترین تعداد مربوط به دو گروه انستروس بود ($p<۰/۰۵$) (شکل ۵).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]



شکل ۵- تفاوت جمعیت باکتری کل در بین دو گروه در ۵ زمان

* A-C: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در پنج زمان است.

a-c: مقادیر با حروف مشترک در هر نقطه نشان دهنده عدم تفاوت معنی داری در ۰/۰۵ در فصل تولیدمثلی است.

Figure 5. The difference in the total bacteria between the two groups at 5 time

* A-C: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the five times.

a-c: Values with common letters in each point indicate no significant difference at 0.05 in the breeding season.

جدول ۲- مقایسه تفاوت جمعیت کلنی‌های مورد مطالعه در فصل خارج تولیدمثلی در دو گروه استروس و انستروس در ۵ زمان مختلف چرخه فحلی میش‌های کبوده شیرازی

Table 2. Comparison of the population differences of the studied colonies in the non-breeding season in two groups of estrus and anestrus in 5 different times of the estrous cycle in Grey Shirazi Ewes

انستروس(Anestrus)	استروس(Estrus)		
136.00	104.00	1	تولیدکننده اسیدلاکتیک
68.65	93.45	2	Lactic acid producer
62.15	99.40	3	
97.83	94.95	4	
86.15	99.20	5	
5.25	8.44		SEM
0.00	0.00		p-value
			آمیلولایتیک
			Amylolytic
5.80 ^{Cc}	112.06 ^{Aa}	1	
8.20 ^{Bc}	56.45 ^{Da}	2	
6.10 ^{CC}	90.25 ^{Ba}	3	
12.10 ^{Ad}	77.20 ^{Ca}	4	
9.90 ^{Bc}	45.90 ^{Ea}	5	
1.81	4.96		SEM
0.00	0.00		p-value
			لیپولایتیک
			Lipolytic
31.04 ^{Ac}	110.01 ^{Aa}	1	
17.30 ^{Cc}	45.30 ^{Ca}	2	
31.75 ^{Ab}	52.35 ^{Ba}	3	
26.10 ^{Bb}	32.90 ^{Da}	4	
19.65 ^{Cc}	53.85 ^{BCa}	5	
4.10	5.22		SEM
0.00	0.00		p-value
			پروتیولایتیک
			Proteolytic
18.25 ^{Ab}	52.91 ^{Aa}	1	
12.91 ^{CC}	35.95 ^{Ba}	2	
18.35 ^{Bb}	28.00 ^{Ca}	3	
16.70 ^{BCa}	13.10 ^{Db}	4	
15.85 ^{BCb}	32.05 ^{BCa}	5	
3.87	5.22		SEM
0.00	0.00		p-value
			باکتری کل
			Total bacteria
9.30 ^{Bc}	83.10 ^{Aa}	1	
9.50 ^{BD}	55.80 ^{Ca}	2	
10.55 ^{ABc}	88.75 ^{Aa}	3	
10.75 ^{Abc}	75.21 ^{Ba}	4	
12.30 ^{Ac}	50.60 ^{Ca}	5	
2.62	5.70		SEM
0.00	0.00		p-value

* Common letters in each column indicate no significant difference.

*حروف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم تفاوت معنی‌داری است.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

در سال‌های اخیر، توصیف تغییرات میکروبیوتای سیستم تولیدمثلی مانند واژن و رحم برای بهبود عملکرد تولیدمثلی مورد توجه قرار گرفته است (Swartz *et al.*, 2014; Laguardia-Nascimento *et al.*, 2015)، بررسی مطالعات مختلف موجود نشان داد تغییرات میکروبیوتای شکمبه در دوره فحلی در دام‌ها سنجیده نشده است و در حالی‌که تغییرات میکروبیوتای سیستم گوارش به‌خصوص شکمبه در میزبان‌هایی که در دوره استروس قرار دارند تا حد زیادی ناشناخته است؛ به‌طوری که در این مطالعه بر اساس دانش ما این اولین بار است که تغییرات میکروبی شکمبه در این دوره در میش‌ها سنجش شده است. در مطالعه‌ای در این راستا، برای درک بهتر پروتکل همگام‌سازی فحلی در گاو، میکروبیوتای روده نشخوارکنندگان با استفاده از مدل گاو سیمنتال در حال چرا بررسی شده است (Wu *et al.*, 2022). فرضیه مطالعه انجام شده این بود که تغییرات میکروبیوتای روده مرتبط با پروتکل همگام‌سازی ناشی از تغییرات در هورمون‌های تولیدمثلی است. مشخص شده است که تنوع و توالی میکروب‌ها با وضعیت سلامت دستگاه تولیدمثل میزبان و وضعیت تولیدمثل در گاو تغییر می‌کند (Yildirim *et al.*, 2014; Santos & Bicalho, 2012; Ault *et al.*, 2019). نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر مقایسه جمعیت میکروبی گروه استروس و انستروس در زمان‌های مختلف بر اساس هدف مطالعه نشان داد که تغییرات میکروبی در بین گروه استروس و انستروس وجود دارد و همچنین در فصول مختلف مورد مطالعه این تفاوت‌ها مشاهده شد که اغلب معنی‌دار نیز بود که هم‌راستا با مطالعات انجام شده بود؛ بر اساس مطالعه‌ای که روی سگ‌های وحشی آسیایی ماده (Dholes) انجام شده است تفاوت در جمعیت میکروبی روده آن‌ها در فصول مختلف مشاهده شد؛ به‌طوری‌که تفاوت‌های قابل‌توجهی در ساختار میکروبی و متاژنومیک در گروه‌های انستروس و استروس مشخص شد. با توجه به ساختارهای جامعه باکتریومی، باکتریوئیدها (Bacteroidetes) به‌طور قابل‌توجهی در گروه انستروس فراوان‌تر بود. در واقع، فراوانی باکتریوئیدها در دوره فحلی کمتر از گروه استروس بود. همچنین، در این مطالعه آن‌ها به این نتیجه رسیدند که برخی از باکتری‌ها تأثیر مثبتی بر تولید هورمون‌های جنسی دارند به‌طوری‌که *Coprobacillus* و *Holdemania* می‌توانند کلسترول تولید کنند (Mishra *et al.*, 2019) و در گروه سگ‌های ماده داری چرخه استروس نرمال فراوان‌تر بودند (Wells *et al.*, 1969). در مطالعه‌ای با هدف تعیین تغییرات در میکروبیوتای روده در حین همگام‌سازی فحلی در گاوهای سیمنتال و روشن کردن نقش هورمون‌های تولیدمثلی در میانجی‌گری این تغییرات در میکروبیوتای روده انجام شده است، مشاهده شد که در نتیجه، ساختار، ترکیب و عملکرد میکروبیوتای روده در طول همگام‌سازی فحلی در مدل گاو سیمنتال در حال چرا متغیر است و این تغییرات توسط هورمون‌های تولیدمثلی واسطه می‌شوند (Yildirim *et al.*, 2014). در خوک‌های جوان شناسایی بیومارکرهای میکروبیوتای روده مرتبط با چرخه استروس و عدم ورود به فحلی شناسایی شده است (*Gu et al., 2021; Wang et al.*, 2021). در انسان نیز مطالعات متعددی سال‌هاست در ارتباط سلامت زنان و میکروبیوم دستگاه گوارش انجام شده است و نشان داده شده که حضور یا نسبت گونه‌های میکروبی در سندرم تخمدان پلی‌کیستیک، سرطان، بارداری و یائسگی تغییر می‌کند (Huang *et al.*, 2022; Mohajeri *et al.*, 2018). تمامی این موارد هم‌راستا با نتایج مطالعه حاضر در وجود تفاوت در میانگین جمعیت میکروبی شکمبه در میش‌هاست؛ البته این سنجش نیاز به بررسی‌های آتی و استفاده از تکنیک‌هایی ملکولی برای تأیید بیشتر دارد. با این‌حال، در گونه‌های دیگر این تفاوت مشاهده نشد، در مطالعه‌ای که میکروبیوتای روده ماده موش در طول چرخه فحلی مورد بررسی قرار گرفته است تغییری در طول چرخه استروس مشاهده نشد (Wallace *et al.*, 2018)، که احتمالاً نشان دهنده اهمیت بررسی هر گونه نسبت به تغییرات میکروبی دستگاه گوارش را نشان می‌دهد.

با توجه به نتایج حاصل از مطالعه حاضر، نشان داده شد در روز فحلی فعالیت باکتری‌های آمیلولایتیک افزایش معنی‌دار دارد. این افزایش مطابق با افزایش فعالیت آنزیم آمیلاز در این روز در سایر بافت‌ها است. در مطالعه‌ای مشخص شد غلظت سرمی و بافتی آنزیم آمیلاز در ارتباط با چرخه جنسی در رت انجام شده است، محققین مطالعه این گونه می‌پندارند که مقدار این آنزیم در بافت‌ها وابسته به دوره جنسی است (Skude *et al.*, 1976) .

باکتری‌ها لیپولاتیک در روز فحلی نسبت به تمامی روزها در هر دو گروه بالاتر بوده و دارای تفاوت معنی‌دار نیز هست. جمعیت این نوع باکتری در راستای هر چه بیشتر آزاد کردن ذخایر چربی در این روز رو به افزایش است. در روز فحلی نیاز به انرژی رو افزایش است؛ همچنین نیاز به تمامی منابع خوراکی مهم در این دوره بالا است (Wells *et al.*, 1969). نشان داده شده است که مقدار آنزیم لیپاز در شیر و خون گاوهای شیری در دوره استروس تنها در روز فحلی بالا بوده و در سایر روزها مقدار بالایی به نسبت روز فحلی نداشته است (Mousavi & Sokhtezari, 2011) که نشان از نقش و اهمیت سوخت و ساز چربی‌ها در این دوره دارد. جمعیت میکروبی شکمبه از اهمیت زیادی برای تخمیر شکمبه و تولید انرژی در راستای تحریک و القای تخمک‌ریزی برخوردار است (Sun *et al.*, 2013). افزایش تعداد گروه‌های خاصی از باکتری‌ها، مانند تعداد باکتری‌های آمیلولیتیک و پروتیولیتیک ممکن است سبب تسریع در بازیافت نیتروژن باکتریومی شکمبه شود (Omar *et al.*, 2019) و در نتیجه منجر به افزایش غلظت NH3 شکمبه‌ای شود. بنابراین، تخریب پروتیین و کربوهیدرات‌های غذایی تسهیل می‌شود و در نتیجه غلظت‌های بالاتر آمونیاک و زنجیره کربن افزایش یافته و سنتز پروتیین میکروبی، که مسئول تکثیر باکتری‌های آمیلولیتیکی، پروتیولیتیکی و در نهایت کل باکتری‌های در شکمبه است را تسریع می‌کند (Hess *et al.*, 2005).

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]
[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

به‌طور کلی باکتری‌های بی‌هوازی در روزهای خاصی از فحلی (روز اول تا نهم) دارای افزایش شایان توجهی نسبت به گروه انستروس داشتند. ثابت شده است افزایش کارآرایی میکروبی سیستم گوراش توان اثرگذاری بر سیستم تولیدمثلی با افزایش انرژی در دسترس و حتی افزایش در میزان تخمک‌گذاری را مخصوصاً در نشخوارکنندگان کوچک (گوسفندان) دارد (Stewart, 1986).

نتیجه‌گیری کلی

این پژوهش نشان داد کلنی باکتری‌های آمیلولیتیکی، لیپولیتیکی و کل کلنی‌های حاصل از باکتری‌های بی‌هوازی درگروه استروس تفاوت معنی‌داری نسبت گروه انستروس داشتند. بهتر است در مطالعات پیش‌رو با افزایش آنالیزها مانند تغییرات هورمونی و بررسی‌های ملکولی همراه با کشت میکروبی در دروه فحلی نتایج قابل درک‌تری از اثر میکروبی شکمبه بر فحلی در میش ارائه داد.

References

Allden, W. (1968). Undernutrition of the Merino sheep and its sequelae. III. The effect on lifetime productivity of growth restrictions imposed at two stages of early post-natal life in a Mediterranean environment. *Australian Journal of Agricultural Research*, *19*(6), 981-996.

Allden, W. (1970). The effects of nutritional deprivation on the subsequent productivity of sheep and cattle. Nutrition Abstracts and Reviews,

Ault, T. B., Clemmons, B. A., Reese, S. T., Dantas, F. G., Franco, G. A., Smith, T. P., Edwards, J. L., Myer, P. R., & Pohler, K. G. (2019). Uterine and vaginal bacterial community diversity prior to artificial insemination between pregnant and nonpregnant postpartum cows. *Journal of Animal Science*, *97*(10), 4298-4304.

Cryan, J. F., & Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews neuroscience*, *13*(10), 701-712.

Deng, F., McClure, M., Rorie, R., Wang, X., Chai, J., Wei, X., Lai, S., & Zhao, J. (2019). The vaginal and fecal microbiomes are related to pregnancy status in beef heifers. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *10*(1), 1-13.

Dinan, T. G., & Cryan, J. F. (2013). Melancholic microbes: a link between gut microbiota and depression? *Neurogastroenterology & Motility*, *25*(9), 713-719.

Ghorbani, G. R., Morgavi, D. P., Beauchemin K. A., & Leedle, J. A. Z. (2002). Effects of bacterial direct-fed microbials on ruminal fermentation, blood variables, and the microbial populations of feedlot cattle. Journal of Animal Science, 80, 1977–1985 (In Persian).

Gu, X., Chen, J., Li, H., Song, Z., Chang, L., He, X., & Fan, Z. (2021). Isomaltooligosaccharide and Bacillus regulate the duration of farrowing and weaning-estrous interval in sows during the perinatal period by changing the gut microbiota of sows. *Animal Nutrition*, *7*(1), 72-83.

Hess, B., Lake, S., Scholljegerdes, E., Weston, T., Nayigihugu, V., Molle, J., & Moss, G. (2005). Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*, *83*(suppl_13), E90-E106.

Huang, J., Chen, P., Xiang, Y., Liang, Q., Wu, T., Liu, J., Zeng, Y., Zeng, H., Liang, X., & Zhou, C. (2022). Gut microbiota dysbiosis-derived macrophage pyroptosis causes polycystic ovary syndrome via steroidogenesis disturbance and apoptosis of granulosa cells. *International Immunopharmacology*, *107*, 108717.

Laguardia-Nascimento, M., Branco, K. M. G. R., Gasparini, M. R., Giannattasio-Ferraz, S., Leite, L. R., Araujo, F. M. G., Salim, A. C. d. M., Nicoli, J. R., De Oliveira, G. C., & Barbosa-Stancioli, E. F. (2015). Vaginal microbiome characterization of Nellore cattle using metagenomic analysis. *PLoS One*, *10*(11), e0143294.

McEwan, N. R., Abecia, L., Regensbogenova, M., Adam, C. L., Findlay, P., & Newbold, C. J. (2005). Rumen microbial population dynamics in response to photoperiod. *Letters in Applied Microbiology*, *41*(1), 97-101.

Mishra, A. K., Kumar, S. S., & Ghosh, A. R. (2019). Probiotic Enterococcus faecalis AG5 effectively assimilates cholesterol and produces fatty acids including propionate. *FEMS microbiology letters*, *366*(4), fnz039.

Mohajeri, M. H., La Fata, G., Steinert, R. E., & Weber, P. (2018). Relationship between the gut microbiome and brain function. *Nutrition reviews*, *76*(7), 481-496.

Mousavi, M. A. S. (2011). The effect of using melatonin along with progestogens on the fertility indices of ewe in the non-breeding season. *Iran Animal Science Research*, *3*(1), 88-94 (In Persian).

Omar, A. E., Gharib, H. S., & Said, E. N. (2019). Effect of feeding different concentrate roughage ratio on growth, reproductive performance and behavior of sheep. *Slovenian Veterinary Research*, *56*(Suppl 22), 433-443.

Rekwot, P., Ogwu, D., Oyedipe, E., & Sekoni, V. (2001). The role of pheromones and biostimulation in animal reproduction. *Animal reproduction science*, *65*(3-4), 157-170.

Santos, T. M., & Bicalho, R. C. (2012). Diversity and succession of bacterial communities in the uterine fluid of postpartum metritic, endometritic and healthy dairy cows. *PLoS One*, *7*(12), e53048.

Senger, P., & TO, P. (2012). Pathways to pregnancy and parturition 3rd edition. *Redmond OR: Current Conceptions*.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]

Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K., & Ha, J. K. (2010). Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *23*(12), 1657-1667.

Skude, G., Mårdh, P., & Weström, L. (1976). Amylases of the genital tract: I. Isoamylases of genital tract tissue homogenates and peritoneal fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *126*(6), 652-656.

Stewart, R. (1986). Feeding lupins to ewes for four days during the luteal phase can increase ovulation rate. *Anim Prod Aust*, *16*, 367-369.

Sun, P., Wang, J., & Deng, L. (2013). Effects of Bacillus subtilis natto on milk production, rumen fermentation and ruminal microbiome of dairy cows. *animal*, *7*(2), 216-222.

Swartz, J. D., Lachman, M., Westveer, K., O'Neill, T., Geary, T., Kott, R. W., Berardinelli, J. G., Hatfield, P. G., Thomson, J. M., & Roberts, A. (2014). Characterization of the vaginal microbiota of ewes and cows reveals a unique microbiota with low levels of lactobacilli and near-neutral pH. *Frontiers in veterinary science*, *1*, 19.

Wallace, J. G., Potts, R. H., Szamosi, J. C., Surette, M. G., & Sloboda, D. M. (2018). The murine female intestinal microbiota does not shift throughout the estrous cycle. *PLoS One*, *13*(7), e0200729.

Wanapat, M., Nontaso, N., Yuangklang, C., Wora-Anu, S., Ngarmsang, A., Wachirapakorn, C., & Rowlinson, P. (2003). Comparative study between swamp buffalo and native cattle in feed digestibility and potential transfer of buffalo rumen digesta into cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, *16*(4), 504-510.

Wang, Z., Fu, H., Zhou, Y., Yan, M., Chen, D., Yang, M., Xiao, S., Chen, C., & Huang, L. (2021). Identification of the gut microbiota biomarkers associated with heat cycle and failure to enter oestrus in gilts. *Microbial Biotechnology*, *14*(4), 1316-1330.

Wells, M., Pryor, O., Haggerty, D., Pickett, H., & Mickle, J. (1969). Effect of estrous cycle and lactation on lipase activity in bovine milk and blood. *Journal of dairy science*, *52*(7), 1110-1113.

Wu, D., Wang, C., Simujide, H., Liu, B., Chen, Z., Zhao, P., Huangfu, M., Liu, J., Gao, X., & Wu, Y. (2022). Reproductive Hormones Mediate Intestinal Microbiota Shifts during Estrus Synchronization in Grazing Simmental Cows. *Animals*, *12*(14), 1751.

Yildirim, S., Yeoman, C. J., Janga, S. C., Thomas, S. M., Ho, M., Leigh, S. R., Consortium, P. M., White, B. A., Wilson, B. A., & Stumpf, R. M. (2014). Primate vaginal microbiomes exhibit species specificity without universal Lactobacillus dominance. *The ISME journal*, *8*(12), 2431-2444.

[Downloaded from rap.sanru.ac.ir on 2024-09-15]

[DOI: 10.61186/rap.15.2.69]