การประยุกต์ใช้เทคนิค PCR-DGGE ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

Application of PCR-DGGE technique to study rumen microbial diversity

พิชาด เขจรศาสตร์[1], และ เมธา วรรณพัฒน์[1]

Pichad Khejornsart[1], and Metha Wanapat[1]

บทนำ

การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสัตว์เคี้ยวเอื้องนับว่ามีความสำคัญ เนื่องจากอาหารที่กินเข้าไปจะถูกเปลี่ยนเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acid, VFA) และจุลินทรีย์มวลรวม (microbial biomass) ซึ่งเป็นแหล่งของพลังงานและโปรตีนที่มีคุณภาพแก่ตัวสัตว์ แต่ที่ผ่านมาเราทราบเพียงว่า จุลินทรีย์กระจายตัวในกระเพาะรูเมนโดยยึดเกาะตามอนุภาคอาหาร หรือสามารถจัดแบ่งกลุ่มได้เพียงชนิดที่ยึดเกาะอาหารและกลุ่มที่อิสระหากศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจะนำไปสู่การอธิบายการอยู่ร่วมกันระหว่างจุลินทรีย์กับสัตว์และจุลินทรีย์ด้วยกันเอง การเพิ่มผลผลิตสัตว์ให้สูงนั้นจำเป็นต้องให้เกิดความสมดุลของกระบวนการย่อยอาหารและกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ที่เหมาะสม (Krause et al., 2003; Koike et al. 2003; Weimer et al., 1999) ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมาบ้างแล้วก็ตาม มีเพียง 10-20 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่รู้บทบาทหน้าที่ (McSweeney et al., 2007) สำหรับวิธีการศึกษาเดิมใช้วิธีเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Viable counts) หรือใช้กล้องจุลทรรศน์ (direct counts) และการวิเคราะห์ทางชีวเคมี (biochemical methods) ซึ่งเป็นวิธีที่สิ้นเปลืองเวลา ค่าใช้จ่าย และแรงงานมาก อีกทั้งยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถแยกจุลินทรีย์ที่ไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้น เพื่อความเข้าใจถึงบทบาทหน้าที่กลุ่มประชากรและความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนจึงต้องใช้เทคนิควิธีการทางชีวโมเลกุล (molecular biotecnology) ที่มีความรวดเร็วและแม่นยำมาศึกษาและเทคนิค PCR-DGGE ซึ่งเป็นอีกหนึ่งเทคนิคที่ได้รับการพัฒนาเพื่อศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนที่มีการยอมรับในประสิทธิภาพ

การพัฒนาเทคนิควิธีการในการศึกษาชนิดจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

ในการศึกษาเริ่มต้นของ Hungate (1969) นั้นทำให้ทราบถึงนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนเป็นสภาพไร้อากาศ (anaerobic condition) และมีประชากรอยู่หลายกลุ่ม ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา และมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องตามความแตกต่างของอาหารที่ได้รับ เช่น การศึกษาแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งของ Minato et al. (1989) ที่ได้ทำการทดสอบให้อาหารฟางหมักแอมโมเนียในโคพบว่า เพิ่มจำนวนประชากรของ *Eubacterium*

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, 40002

ruminantium มากขึ้น และนอกจากนั้น Orpin et al. (1985) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรจุลินทรีย์ในกวางด้วยเทคนิคการเลี้ยงเชื้อพบว่าจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยเยื่อใย (cellulolytic bacteria) Butyrivibrio fibrisolvens มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลโดยในช่วงหน้าหนาวจะเพิ่มมากขึ้น การศึกษาจุลินทรีย์ได้เริ่มใช้ 16S rDNA โดยเริ่มต้นด้วย Whitford et al. (1998) และในปีต่อมา Tamiga et al. (2001) ได้ใช้ศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ของโคที่อดอาหาร 16 ชั่วโมงสามารถจำแนกกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์กับ *B. flibrisolvens* และกลุ่มที่สัมพันธ์กับ *Treponema bryantii* หรือมีเพียง 38% ที่มีความใกล้เคียงกับฐานข้อมูลยีน นับจากนั้นมามีการศึกษากันอย่างแพร่หลายอย่างต่อเนื่องตามชนิดสัตว์ พันธุ์ ชนิดอาหารที่ให้ หรือส่วนทางเดินอาหาร แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาที่ผ่านมาด้วยวิธีเดิมทำให้สามารถแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนที่เป็นกลุ่มแบคทีเรียได้มากกว่า 200 ชนิด หรือโปรโตซัวและเชื้อราเกือบ 100 ชนิด (Orpin and Joblin, 1997; and Stewart et al., 1998; cited by McSweeney et al., 2007) และสามารถจัดกลุ่มของจุลินทรีย์ในกระเพาะ รูเมนได้ 11 กลุ่มตามแหล่งของสารอาหารและผลผลิตที่ได้ (Yokoyama and Johnson, 1988)

เทคนิคทางชีวโมเลกุลจึงถูกนำมาใช้พัฒนามาอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 10 -20 ปีเท่านั้นโดยพื้นฐานแล้วจะใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้จากตัวอย่างโดยอาศัยความจำเพาะต่อไพร์เมอร์ (primer) และดีเอ็นเอที่แยกได้จะประกอบด้วย 16S rRNA ซึ่งเป็นยีน (gene) บนโมเลกุลของไรโบโซมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและมีความเฉพาะในชนิดนั้นๆ จึงถูกนำมาใช้ร่วมกับเทคนิค DGGE เนื่องจากมีลำดับเบสที่แตกต่างกันในจุลินทรีย์แต่ละชนิด และมีบางส่วนที่มีเหมือนกันในทุกชนิดทำให้เป็นประโยชน์ในการออกแบบไพร์เมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR amplication) และไพร์เมอร์ที่สามารถใช้กับจุลินทรีย์ทุกชนิดถือได้ว่า เป็นสากล (universal primer) ข้อมูลยีนที่ค้นพบจะถูกเก็บไว้ในฐานข้อมูลเพื่อประโยชน์ต่อการศึกษาจุลินทรีย์ชนิดใหม่และข้อมูลเหล่านี้มีอยู่ทั่วไป เช่น ข้อมูลลำดับเบสที่ใช้ในการออกแบบไพรเมอร์ที่เฉพาะของจุลินทรีย์ เทคนิคทางชีวโมเลกุลได้พัฒนาและประยุกต์ใช้ศึกษาการแสดงออกของยีน เช่น ในการศึกษาเบื้องต้นนั้นได้ใช้การย้อมดีเอ็นเอด้วยสารกัมมันตรังสีหรือลายพิมพ์ดีเอ็นเอในจุลินทรีย์กลุ่ม *Fibrobacter* และประยุกต์ใช้กับจุลินทรีย์ที่ย่อยเยื่อใยกลุ่มอื่น (Weimer et al., 1999) แต่ปัจจุบันจะใช้ real time-PCR เป็นหลักในการบอกปริมาณของจุลินทรีย์ได้รวดเร็วใช้เวลาน้อย แต่อย่างไรก็ตามแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันดังแสดงใน **Table 1.**

เทคนิค PCR-DGGE

DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) เป็นเทคนิคที่นำมาใช้ในการจำแนกลายพิมพ์ทางพันธุกรรม (fingerprinting)โดยใช้ในการแยกสายเกลียวคู่ดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาวคู่เบสต่ำกว่า 500bp บนแผ่นเจลที่มีความเข้มข้นต่างกัน การแยกดีเอ็นเอเหมือนพีซีอาร์ที่อาศัยอุณหภูมิสูงทำให้พันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่เบสเกิดการแยกสายกันเป็นสายเดี่ยว (Muyzer et al., 1999) โดย PCR-DGGE ให้ผลแยกแถบดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ศึกษา เพราะถึงแม้สายดีเอ็นเอ(16S rDNA fragments) ของแบคทีเรียโดยรวมที่นำมาแยกจะมีลำดับเบสที่มีขนาดความยาวเท่ากัน แต่ลำดับเบสไม่เหมือนกันจะส่งผลให้มีอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (melting temperature) ที่ไม่เท่ากัน ทำให้ดีเอ็นเอสองสายที่มีความยาวเท่ากันแต่มีเบสต่างกันถึงแม้จะมีเพียงแค่ตำแหน่งเดียวสายดีเอ็นเอทั้งสองสายจะถูกแยกไปอยู่ที่ตำแหน่งต่างกันบนเจล ทำให้เราจึงสามารถเห็นสาย ดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันได้บน DGGE gel สำหรับขั้นตอนอธิบายโดย Kocheringskala et al. (2005) โดยเริ่มจากการสกัดดีเอ็นเอทั้งหมดจากตัวอย่าง และการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยเน้นเจาะจงไปที่สายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene โดยใช้ universal primer ของ 16S rRNA gene แล้วทำการแยกสายของดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้ DGGE โดยอาศัยหลักการแยก

Table 1. Commonly used DNA-based technique that can be used to describe change in the rumen microbial ecosystem

Method	Application	Advantages	Disadvantages
1. PCR-RFLP	Fingerprinting of isolates and microbial communities	Rapid screen for identifying and grouping similar organisms	Broad based screen which does not provide specific identity
2. Oligonucleotide probe hybridization	Enumeration of microbial population at varying levels including domain, phylum, species	Quantitative and specific Probes based on phylogenetic sequence database	Laborious Quantitation expressed as % of total population and not absolute numbers
3. Fluorescence *in situ* hybridization	Enumeration of microorganisms *In situ* within their environment	Visualize culturable and uncultureable microorganisms spatially in relation to substrate and other community members	Laborious and quantitation is difficult
4. 16S/18S rDNA clone libraries	Identify the predominant microorganisms in a microbial community	Uncultureable and cultureable organisms can be identified from sequence analysis of cloned small sub unit ribosomal gene	Laborious and not quantitative. Sometime, only predominant organisms are identified
5. DGGE	Fingerprinting pattern analysis of changes mixed microbial community composition	Culturable and unculturable organisms identified Microbial community composition can be determined by pattern analysis at domain, phylum and specific level	Laborious Sometime, only predominant organisms are identified
6. Real-time PCR, (qPCR)	Quantitative estimation of microbial population at the domain, phylum, species and sub-species level	Rapid quantitative method for estimating discrete population in a mixed environmental sample	Technique base on small sub unit ribosomal sequence identity of previously sequenced cultured organisms and cloned libraries
7. reverse transcription RT-PCR, (qRT-PCR)	Quantitative estimation of microbial gene expression in complex microbial population	Rapid quantitative method for estimating expression level of single or select number of important in a mixed environmental sample	Global analysis of gene expression in complex ecosystem not possible
8. DNA phylogenetic microarray	Semi- quantitative estimates of microbial population at the domain, phylum, Species and sub-species level	Rapid method for monitoring gross changes in major population in a complex ecosystem	Not quantitative Lower sensitivity and specificity than qPCR
9. DNA expression array	Semi- quantitative estimates of microbial gene expression in complex microbial population	Rapid method for monitoring gross changes in gene expression in major population in a complex ecosystem	Not quantitative Lower sensitivity and specificity than qPCR
10. Stable isotope probing	Identification of a metabolically active microbial group	Culturable and unculturable organisms that are involved in a particular metabolic process can be distinguished from the general microbial community	Not quantitative. Culture conditions may bias growth of organisms that are not the main group for metabolism under normal conditions in the ecosystem

Source: McSweeney et al. (2007)

โครงสร้างโมเลกุลที่มีขนาดต่างกันออกจากกันในแผ่นเจลที่ประกอบด้วย denature agent (urea, formamide) ที่มีความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก นำสายดีเอ็นเอที่แยกได้มาจากด้วยเครื่อง DGGE จะถูกแยกออกมาเพื่อนำไปหาลำดับเบส (sequencing) จึงหาความสัมพันธ์ของลำดับเบสของ 16S rRNA gene ที่ได้จากการลำดับเบสและการแจกแจงชนิดของจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ (phylogenetic relationship) สรุปขั้นตอนดังแสดงใน **Figure 1**

การวิเคราะห์ผล PCR-DGGE

การวิเคราะห์รูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอควรเป็นอย่างเข้มงวดและมีการใช้สถิติมาช่วยในการอธิบายผล (Formin et al., 2002) สำหรับการวิเคราะห์ทาง DGGE เป็นการวิเคราะห์ทางดีเอ็นเออย่างหนึ่ง ซึ่งความเข้มข้นของ denaturant โดยความเข้มข้นน้อยจากข้างบนไปสู่ความเข้มข้นมากที่อยู่ส่วนล่างของเจล ถึงแม้สายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียโดยรวมที่นำมาแยกจะมีลำดับเบสที่มีขนาดความยาวเท่ากัน แต่ลำดับเบสในส่วนที่ไม่เหมือนกันจะมีอุณหภูมิการหลอมหรือการแยก (melting temperature) ที่ไม่เท่ากัน สายดีเอ็นเอของ 16S rRNA gene ของแบคทีเรียทุกชนิดที่เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยรวมในขั้นตอนแรกๆ จะวิ่งไปบน DGGE gel ได้ไม่เท่ากัน แม้ว่าสายดีเอ็นเอสองสายที่มีความยาวเท่ากันแต่มีเบสต่างกัน ถึงแม้จะมีเพียงแค่ตัวเดียวสายดีเอ็นเอทั้งสองสายจะถูกแยกไปอยู่ที่ตำแหน่งต่างกันบนเจลจึงสามารถเห็นสายดีเอ็นเอของแบคทีเรียแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันบน DGGE gel ลักษณะตัวอย่างของการแยกดีเอ็นเอด้วย DGGE gel และการวิเคราะห์ผลดังแสดงใน **Figure 2** ที่ Mackie et al. (2003) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากรของ *Oscillospira* ในสัตว์ต่างชนิดกันด้วยไพร์เมอร์ที่จำเพาะ พบว่า แถบดีเอ็นเออย่างน้อย 7 แถบที่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงมีหลากหลายทางสายพันธุ์ของ *Oscillospira* โดยพบว่าในกวางนั้นมีเพียง 6 แถบ แกะมี 4 แถบและในโคมีแถบดีเอ็นเอปรากฏ 3 แถบเท่านั้น และแถบดีเอ็นเอ a, f และ g พบได้ในสัตว์ทั้งสามชนิด แต่ c และ d พบได้ในกวาง หรือ e พบได้เฉพาะในโคเท่านั้น และสามารถวิเคราะห์เพื่อแยกกลุ่มประชากรที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมได้ด้วยการนำไปศึกษาลำดับเบสและเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางพันธุกรรมดังแสดงใน **Figure 3** พบว่า *Oscillospira* ในสัตว์เคี้ยวเอื้องมีอย่างน้อย 3 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ low-G+C-Gram-Positive Bacteria (LGGPB) ซึ่ง *Oscillospira* มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมกับ *Clostidium orbiscindens* (ลำดับเบสใกล้เคียงกัน 91%) และใกล้เคียงกับ *Clostidium sp.* (ลำดับเบสใกล้เคียงกัน 92%)

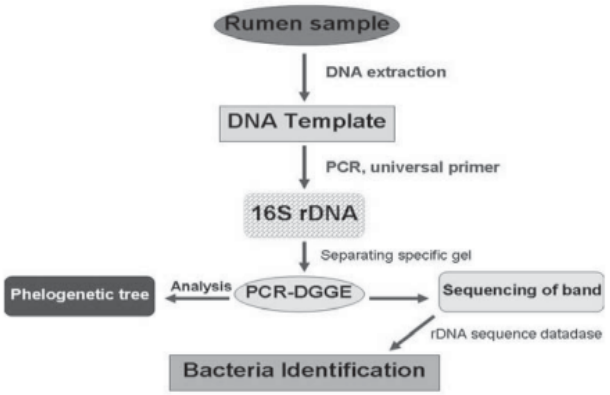

Fig. 1 Step of 16S-DNA fingerprinting (DGGE) for rumen microbial diversity studies
Source: Applied from McSweeney et al. (2007)

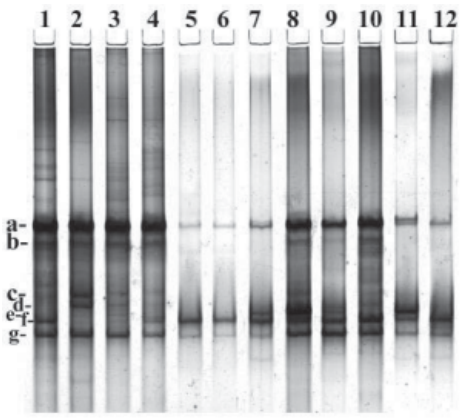

Fig. 2 DGGE analysis PCR-amplified 16S rRNA fragment of *Oscillospira* with the specific. The figure shows the DGGE separation pattern of PCR fragments obtained from Norwegian reindeer (lanes 1 to 4), cattle (lanes 5 and 6), and sheep (lanes 7 to 12). The arrows indicate the representatives of DNA bands, which were excised and subjected to cloning and sequencing.

Source: Mackie et al. (2003)

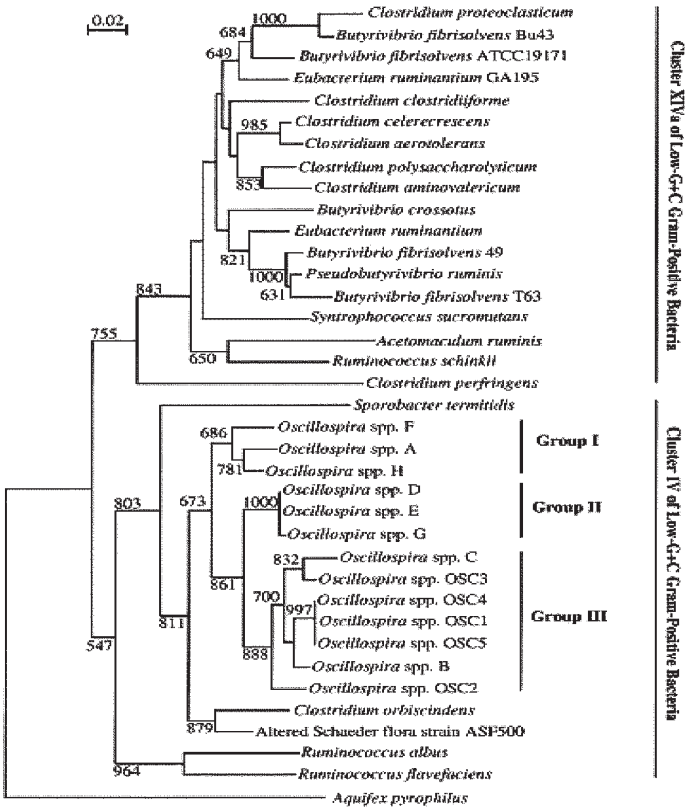

Fig. 3 Phylogenetic placement of partial 16S rDNA sequences, amplified with the *Oscillospira*-specific primer, within the main rumen bacterial phyla. Previously cloned *Oscillospira* sequences are labeled OSC1 through OSC5. The sequences generated in this work are labeled A through H.

Source: Mackie et al. (2003)

แนวทางในการประยุกต์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์

ประโยชน์ของเทคนิค PCR- DGGE นั้นทำให้นักวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะนักอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องได้เข้าใจโครงสร้าง ชนิด และปริมาณของแบคทีเรียซึ่งสามารถศึกษาได้ทั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ได้ และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงบนอาหารจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่ได้ (unculturable) โดยเป็นกลุ่มที่มีจำนวนมากกว่าและต่างมีความสำคัญที่ยังไม่ทราบหน้าที่ และเป็นการยากในการวิเคราะห์หน้าที่ในทางเดินอาหาร (McSweeney et al., 2007) เทคนิคการศึกษาจุลินทรีย์นำไปสู่การปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์บางกลุ่มเพื่อการกระตุ้นกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนเพิ่มการย่อยเยื่อใย หรือลดสารพิษต่างๆ ลดการย่อยสลายโปรตีน ลดการสังเคราะห์ก๊าซเมทเธนซึ่งมีผลต่อการให้ผลผลิตของสัตว์และการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมีความเป็นไปได้ในการปรับเปลี่ยนจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนเพื่อผลผลิตสัตว์ (Wallace, 1994) ในขณะที่ Kobayashi (2006) ได้เสนอแนวทางความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลเพื่อนำไปสู่การเพิ่มผลผลิตสัตว์ ในเบื้องต้นทำให้เข้าใจบทบาทของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน โดยเฉพาะกลุ่มที่ทำหน้าที่หลักในการเข้าย่อยเยื่อใย สามารถจำแนกชนิดได้แม่นยำซึ่งลดข้อจำกัดของวิธีเดิม สำหรับการประยุกต์ด้านอาหารสัตว์นั้นสามารถแยกจุลินทรีย์ เช่น *F. succinogenes* ซึ่งสามารถพัฒนาเป็นอาหารเสริมในลูกโคและเป็นประโยชน์ต่อการหย่านมเร็วหรือการเปลี่ยนแปลงอาหารได้ที่เร็วขึ้นและการปรับปรุงคุณภาพอาหารให้เหมาะสมได้ นอกจากนั้นเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนสร้างขึ้นสามารถนำใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เช่น phytase จาก *S. ruminentium* สามารถใช้ผลิตเป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ได้ หรือ endoglucanase จาก *R. albus* ใช้ในกระบวนการแยกโปรตีนให้บริสุทธิ์ และ cellobiose epimerase เป็นเอนไซม์จาก *R. albus* ที่เปลี่ยน cellobiose เป็น glycosyl-manose ซึ่งสามารถเปลี่ยนอาหารคาร์โบไฮเดรทชนิดอื่นๆ ได้ และนำไปใช้ในอุสาหกรรมอาหารสัตว์หรือมนุษย์ได้ และจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายเยื่อใยยังใช้ในการย่อยสลายเศษเหลือในการผลิตแก๊สชีวภาพ ดังนั้น จุลินทรีย์ที่ยังไม่ทราบบทบาทหน้าที่ในกระเพาะรูเมนอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในอุสาหกรรมอาหารสัตว์ได้ดังแสดงใน **Figure 4** และควรมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ดังกล่าว เพราะหากพิจารณาในระบบทางเดินอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องนั้นจะมีจุลินทรีย์และเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายเซลล์พืชได้อย่างมีประสิทธิภาพ

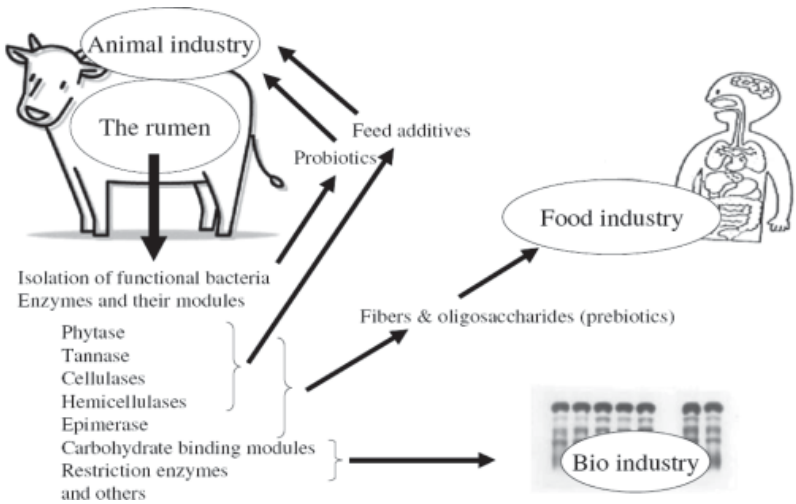

Fig. 4 Possible directions for the application of ruman bacterial functions
Source: Kobayashi (2006)

สรุป

เทคนิค PCR-DGGE ร่วมกับการใช้ 16S rDNA ช่วยทำให้เราสามารถศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนและประเมินความหลากหลายของประชากรจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำสูง จึงนำไปสู่การอธิบายความสัมพันธ์ของประชากรแบคทีเรียที่มีอยู่ในเคี้ยวเอื้องโดยมีความแตกต่างกันตามชนิดอาหารที่ได้รับ พันธุ์สัตว์ นอกจากนี้ความเข้าใจบทบาทหน้าที่การทำงานของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนเพื่อการปรับปรุงกระบวนการหมักที่เหมาะสมเพื่อเพิ่มผลผลิตของสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Fromin, N., J. Hamelin, S. Tarnawski, D. Roesti, K. Jourdain-Miserez, N. Forestier, S. Teyssier-Cuvelle, F. Gillet, M. Aragno, and P. Rossi. 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) ingerprinting patterns. Environ. Microbiol. 4(1):634.

Hungate, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. Methods Microbiol. 3:117-132.

Kobayashi, Y. 2006. Inclusion of novel bacteria in rumen microbiology: Need for basic and applied science. Anim. Sci. J. 77:375-385.

Kocheringskala, S.A., I. K.O. Cann, and R.I. Mackie. 2005. Denaturing gradient gel electrophoresis. In: Markar, H.P.S. and C.S. McSweeney (eds.) 'Methods in gut microbial ecology for ruminants'. Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Natherland. pp. 119-128.

Koike, S., Yoshitani S, Y. Kobayashi, and K. Tanaka. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 229:23-30.

Krause, D.O., S.E. Denman, R.I. Mackie, M. Morrison, A.L. Rae, G.T. Attwood, and C.S. McSweeney. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. FEMS Microbiol. Rev. 27:663-693.

Mackie, R.I., R.I. Aminov, W. Hu, A.V. Klieve, D. Ouwerkerk, M.A. Sundset, and Y. Kamagata. 2003. Ecology of uncultivated *Oscillospira* species in the rumen of cattle, sheep, and reindeer as cssessed by microscopy and molecular approaches. Appl. Environ. Microbiol. 69:6808-6815.

McSweeney, C.S., S.E. Denman, A.D. G. Wright, and Z. Yu. 2007. Application of recent DNA/RNA-based techniques in rumen ecology. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 20(2):283-294.

Minato, H., S. Ishizaki, Y. Adachi, and M. Mitsumori. 1989. Effect on rumen microbial populations of ammonia treatment of rice straw forage for steers. J. Gen. Appl. Microbiol. 35:113-124.

Muyzer, G.1999. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystem. Curr. Opin. Microbiol. 2:317-322.

Orpin, C.G., S.D. Mathisen, Y. Greenwood, and A.S. Blix. 1985. Seasonal changes in the ruminal microflora of the high-arctic Svalbard reindeer (*Rangifer tarandus platyrhynchus*). Appl. Environ. Microbiol. 50:144-151.

Tajima, K., R. I. Aminov, T. Nagamine, H. Matsui, M. Nakamura and Y. Benno. 2001. Diet-dependent shifts in the bacterial population of the rumen revealed with real-time PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67(6):2766-2774.

Wallace, R.J. 1994. Ruminal microbiology, biotechnology, and ruminant nutrition: progress and problems. J. Anim. Sci. 72:2992-3003.

Weimer, P. J., G. C. Waghorn, C. L. Odt, and D. R. Mertens. 1999. Effect of diet on populations of three species of ruminal cellulolytic bacteria in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 82:122-134.

Whitford, M.F., R.J. Forster, C.E. Beard, J. Gong, and R.M. Teather. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. Anaerobes, 4:153-163.

Yokoyama, M.T. and K.A. Johnson. 1988. Microbiology of the rumen and intestine. In: Church, D.C.(ed.) The ruminant animal: Digestive Physiology and Nutrition. Prentice Hall, Englewood Chiffs, New Jersey, pp. 125.