

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

## چکیده

هدف از این پژوهش، ارزیابی اثرات سطوح مختلف میوه بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های مرخز بود. تعداد ۲۴ راس بزغاله مرخز با میانگین وزنی  $1/25 \pm 16/93$  و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماه در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و ۶ تکرار به مدت ۱۰۵ روز مورد آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل ۱) جیره شاهد، ۲) جیره حاوی ۸ درصد میوه بلوط، ۳) جیره حاوی ۱۷ درصد میوه بلوط و ۴) جیره حاوی ۲۵ درصد میوه بلوط بود. نتایج نشان داد که تاثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه معنی‌دار است ( $P < 0/001$ ). کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت ( $P < 0/05$ ). جایگاه نمونه‌برداری تاثیری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه نداشت ( $P > 0/05$ ) بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه و کنترل شکمبه و کمترین آن مربوط به رتیکولوم بود. اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه معنی‌دار می‌باشد ( $P > 0/05$ ). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از میوه بلوط تا سطح ۱۷ درصد در جیره غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه شد درحالی‌که استفاده از سطوح ۲۵ درصد میوه بلوط در جیره غذایی موجب کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی ایپمورال شکمبه شد.

**کلید واژه‌ها:** بزغاله‌های مرخز، تنوع زیستی جمعیت باکتریایی، ایپمورال شکمبه، میوه بلوط، PCR-SSCP

## مقدمه

شکمه یکی از غنی‌ترین زیستگاه‌های گونه‌های متعدد میکروارگانیسم‌ها است که از پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها تشکیل شده است. شکمه تحت تاثیر ترکیبی از تعاملات پویا میان میزبان (حیوان نشخوارکننده) و میکروارگانیسم‌ها و نیز میان خود میکروارگانیسم‌ها قرار دارد (Patra & Saxena., 2009b). عملکرد نشخوارکنندگان وابسته به فعالیت میکروارگانیسم‌ها در استفاده از خوراک‌های جیره است (Jenkins et al., 2007). نشخوارکنندگان یک رابطه همزیستی با میکروارگانیسم‌های شکمه ایجاد می‌کنند (Boubaker et al., 2007; Jany et al., 2008; Pitta et al., 2010) که توسط آن مواد مغذی و شرایط محیطی بهینه را برای تخمیر خوراک، تجزیه فیبر و سنتز پروتئین میکروبی به‌عنوان انرژی و پروتئین مهیا شده برای حیوان تامین می‌کنند (Boubaker et al., 2007; Pitta et al., 2007). این تعامل پیچیده میکروبیهای شکمه نشخوارکنندگان را قادر به تغذیه از مواد گیاهی غنی از سلولز و همی سلولز می‌سازد (Kamra., 2005). تنوع بسیار اکوسیستم میکروبی شکمه متشکل از باکتری ( $10^{11}$ – $10^{12}$  سلول در میلی لیتر با حضور بیش از ۵۰ جنس)، پروتوزوا (مژکدار) ( $10^6$ – $10^8$  میلی لیتر از ۲۵ جنس)، قارچ‌های بی‌هوازی ( $10^3$ – $10^5$  هاگ در میلی لیتر با حضور ۵ جنس) و باکتریوفاژها ( $10^8$ – $10^9$  میلی لیتر) است (Mccowan et al., 1980; Jany et al., 2008) که شمار زیادی و حتی ممکن است اکثریت آنها غیرقابل کشت باشند (Jany et al., 2008). میان گروه‌های مختلف میکروبیهای ساکن پیش معده نشخوارکنندگان باکتری‌ها بیشترین تنوع و نقش ضروری را در سلامت و تغذیه دارند (Lawrence et al., 2001). بخش عمده ایی از مواد گیاهی مصرف شده توسط حیوان به واسطه باکتری‌ها مورد تجزیه اولیه قرار می‌گیرد. اکثریت این باکتری‌ها متعلق به تنها چهار زیر راسته باکتریوئیده<sup>۱</sup>، فیرمیکتوس<sup>۲</sup>، پروتئوباکتیریا<sup>۳</sup>، اسپیروچتس<sup>۴</sup> هستند (Kamra., 2005). تفاوت در ساختار جمعیت باکتریایی در سه فاز جامد، مایع و اپیتلیوم شکمه مشاهده شده است (Bretschger et al., 2010). باکتری‌های موجود در فاز مایع مخلوطی از میکروارگانیسم‌هایی هستند که از ذرات خوراک جدا شده‌اند و بر ترکیبات محلول خوراک در داخل مایع شکمه زندگی می‌کنند. باکتری‌های این مجموعه به ذرات خوراک متصل شده و هضم اولیه را آغاز می‌کنند (Lorna et al., 1981). باکتری‌های مرتبط با ذرات خوراک از نظر عددی غالب هستند و به‌عنوان مهم‌ترین گروه برای تجزیه خوراک در نظر گرفته شده‌اند (Lawrence et al., 2001; Ranilla et al., 2009). این مجموعه ۷۰ تا ۸۰٪ از اجزا میکروبی شکمه را تشکیل می‌دهد (Lorna et al., 1981). جمعیت باکتری‌های متصل به دیواره شکمه که بعداً به‌عنوان جمعیت باکتریایی اپیمورال<sup>۵</sup> شناخته شدند طبقه‌بندی مجزایی از دیگر باکتری‌های فاز مایع یا جامد شکمه در گاو و گوسفند دارند (Ranilla et al., 2009). اپیتلیال در واقع حد فاصل بین بافت‌های میزبان و محتویات شکمه است که در تماس با انواع سوپستراها و شرایط میکروسکال<sup>۶</sup> است (Russell et al., 2008). جمعیت باکتریایی اپیمورال حدود ۱٪ از کل باکتری‌های شکمه را تشکیل می‌دهند و نقش آنها در تجزیه خوراک کمتر است با این حال جمعیت باکتریایی اپیمورال نقش مهمی را در هیدرولیز سیستمیک اوره که از خون به سراسر دیواره شکمه منتشر می‌شود ایفا می‌کنند 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 از باکتری‌های یورولایتیک و ارگانیسم‌های بی‌هوازی اختیاری وابسته به دیواره شکمه وجود دارند (Mcallister et al., 1994; Lorna et al., 1981). توزیع ارگانیسم‌های یورولایتیک بر اپیتلیوم بطور قابل ملاحظه‌ای متفاوت از توزیع کل باکتریها است. این باکتریها اغلب جایگاه‌های ترجیحی را نشان میدهند که آنها را متصل می‌کند، بطوریکه تنها یک گونه جمعیت یا نوع مورفولوژیکی را در یک جایگاه خاص در دستگاه گوارش می‌توان یافت (Mcallister et al., 1994).

1. Bacteroidetes
2. Firmicutes
3. Proteobacteria
4. Spirochaetes
5. Bacterial Epimural Community (BEC)
6. Microscale

اکوسیستم میکروبی شکمبه در یک زمان معین پویا و پایدار می‌باشد. وجود اکوسیستم پایدار به خوبی عملکرد آن را در جهت تبدیل زیستی خوراک به اسیدهای چرب فرار برقرار می‌کند (Maldar et al., 2009). عوامل تغییردهنده در جمعیت میکروبی شامل سن حیوان، استفاده از آنتی بیوتیک‌ها، سلامت حیوان میزبان، تفاوت موقعیت جغرافیایی، فصل سال و مهمتر از همه از دیدگاه کشاورزی جیره غذایی حیوان میزبان است (Patra & Saxena., 2010; Pitta et al., 2010) جیره یک فاکتور موثر بر ساختار و عملکرد جمعیت باکتریایی شکمبه است. طبیعت خوراک‌ها و نیز تغییرات فیزیکیوشیمیایی القا شده با تخمیر آنها در توسعه برخی از اعمال اکوسیستم میکروبی در فاز جامد و مایع شکمبه سودمند شناخته شده است (Ranilla et al., 2009). اکوسیستم پویا است و تغییرات جمعیت میکروبی به‌طور قابل ملاحظه‌ای در جهت تغییر جیره و بنابراین آدابته‌شدن میکروارگانیسم‌ها به اجزاء خوراک جدید است. این اتفاقات به این دلیل است که میکروب‌های شکمبه به زنده ماندن در مجموعه-ایی از محدودیت‌های رایج در شکمبه آدابته شده‌اند (Maldar et al., 2009).

بلوط ایرانی با نام علمی کوئرکوس پرسیکا<sup>۷</sup> درختانی بزرگ به ارتفاع ۲۰ متر با تاج کروی بزرگ از خانواده فاباسه<sup>۸</sup> (Ebrahimi et al., 2009) و جنس کوئرکوس<sup>۹</sup> می‌باشند (Ghaderi et al., 2011). حدود سه میلیون هکتار از جنگل‌های غرب ایران پوشیده از گونه‌های مختلف بلوط، بطور عمده کوئرکوس پرسیکا<sup>۱۰</sup>، کوئرکوس لیبانی<sup>۱۱</sup> و کوئرکوس این فکتوریا<sup>۱۲</sup> است (Ebrahimi et al., 2009). میوه بلوط حاوی مقادیر قابل توجهی از ترکیبات فعال بیولوژیکی از جمله تانن، گالیک اسید، الاجیک اسید و مشتقات گالویل یا هگزا هیدروکسی دی فنوئیل می‌باشد که تمامی این ترکیبات دارای خواص آنتی اکسیدانی هستند (Firkins et al., 2010). تانن‌ها گروه پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه گیاهی (Rosales et al., 1999). پلی فنولیک حاضر در جیره غذایی حیوانات و انسان هستند (Russell et al., 2008) که قابل حل در آب (Camper & Nocker., 2007) و دیگر حلال-های قطبی بوده (Rosales et al., 1999) و قادر به رسوب با پروتئین‌ها، آلکالوئیدها و ژلاتین می‌باشند (Camper & Nocker., 2007) تانن‌ها به دو گروه تانن‌های قابل هیدرولیز و تانن‌های متراکم یا پروآنتوسیانیدین<sup>۱۳</sup> طبقه‌بندی می‌شوند (Russell et al., 2008). اختلاف زیادی میان باکتری‌ها برای باندشدن با تانن و مقدار تانن مورد نیاز برای مهار رشد وجود دارد (McSweeney et al., 2009). تاثیر تانن بر باکتری شکمبه وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن موجود است (Camper & Nocker., 2007). تانن هر دو اثر مفید و مضر را بسته به غلظت و ماهیت خود دارد (Ghaderi et al., 2011)، سه مکانیسم سمیت تانن در باکتری‌های شکمبه پیشنهاد شده است: ۱- مهار فعالیت آنزیم و از دسترس خارج کردن سوبسترا، ۲- فعالیت در غشاهای بیولوژیکی و ۳- از دسترس خارج کردن یون‌های فلزی (Camper & Nocker., 2007). مکانیسم‌هایی که توسط آن باکتری‌ها می‌توانند اثر تانن را مهارکنند عبارتند از: ۱- تغییر تانن، ۲- تجزیه کمپلکس تانن-سوبسترا، ۳- غیر فعال کردن تانن توسط ایجاد باندهای با تمایل بالا برای باندشدن با تانن، ۴- تغییر غشاء، ۵- جداسازی یون‌های فلزی (Russell et al., 2008) و ۶- تولید تانن‌آز میکروبی (Bretschger et al., 2010; Patra & Saxena., 2009b) در طول قرن بیستم مطالعه میکروبیولوژی شکمبه اصولاً براساس تکنیک‌های محیط کشت بوده است (Ephraim et al., 2009) که تنوع میکروبی را به میزان بسیار کمی در حدود ۱۰-۵۰ درصد تخمین می‌زدند (Cheng et al., 2009). ظهور تکنیک‌های ژنتیکی نشان داد که تنوع میکروبی بسیار گسترده است و تخمین این تنوع با استفاده از روش‌های وابسته به محیط کشت غیر قابل تشخیص می‌باشد (Ranilla et al., 2009).

مشکل در کشت بسیاری از میکروب‌های حاضر در محیط کشت طبیعی یا مدیریت محیط میکروب شناسان را وادار به استفاده از ژن 16S rRNA<sup>۱۴</sup> به‌عنوان مارکر یا نشانگر فیلوژنتیکی در بررسی‌های تنوع میکروبی و طبقه‌بندی میکروبی کرده‌است (Kamra., 2005). براساس آنالیز 16S rRNA پیشنهاد شده‌است که ۳۰۰-۴۰۰ گونه مختلف باکتریایی در شکمبه وجود دارند (Donovan et al., 2001). برای اولین بار لین و همکاران در سال ۱۹۸۵ از ژن 16S rRNA در تعیین و طبقه‌بندی میکروب‌های غیرقابل کشت

1. *Quequs persica*
2. *Fagaceae*
3. *Querqus*
4. *Quequs persica*
5. *Querqus libani*
6. *Querqus infectoria*
7. *Proanthocyanidin*
14. 16S ribosomal RNA

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 مقایسه چندین نمونه، این تکنیک به عنوان بهترین تخمین زنده تنوع زیستی شناسایی شده است (Russell et al., 2008). ژن 16SrRNA شامل نه منطقه بسیار متغیر<sup>۱۵</sup> V<sub>1</sub>-V<sub>9</sub> است (Martin., 2008; Jany et al., 2011)، که بطور قابل توجهی تنوع توالی میان گونه‌ها در آن بالا است (Camper & Nocker., 2007) و برای تعیین گونه‌های باکتریایی استفاده شود. این مناطق بسیار متغیر در بسیاری از باکتری‌ها حفاظت شده است (Boubaker et al., 2009; Sun et al., 2007). در آزمایش ژن مورد نظر در گونه‌های مختلف، جنس و یا حتی واحدهای بالاتر طبقه بندی توسط PCR<sup>۱۶</sup> با پرایمرهای عمومی گسترش می‌یابد. تکنیک‌های بر اساس PCR جهت شناسایی ژن شامل روش‌های مختلفی است که SSCP<sup>۱۷</sup> یکی از آینده‌نگرترین و راحت‌ترین این روش‌ها است. اولین کاربرد تکنیک SSCP برای نظارت بر جامعه میکروبی بوده است و جهت شناخت جامعه میکروبی در سیستم‌های طبیعی به کار برده می‌شود. در آنالیز SSCP قطعه DNA با اندازه مشابه اما توالی متفاوت می‌تواند به صورت باندهای مختلف در طول الکتروفورز ژل پلی آکریل آمید به دلیل تفاوت تحریر پذیر ساختار تا خورده خود از هم جدا شوند در واقع DNA تک رشته به یک ساختار عالی بر اساس توالی نوکلئوتیدی خود و محیط فیزیکی شیمیایی آن تبدیل می‌شود (Sun et al., 2009). گسترش PCR و آنالیز الگوی SSCP از ژن 16SrRNA، یک ابزار مفید در جهت مطالعه ساختار جمعیت باکتریایی در اکوسیستم‌های مختلف است. با توجه به موارد ذکر شده هدف از این مطالعه ارزیابی اثرات سطوح مختلف تانن میوه بلوط بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی شکمبه با استفاده از تکنیک مولکولی PCR-SSCP در بزغاله‌های مرکز است.

## 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 از ۲۴ راس بزغاله مرکز (میانگین وزنی  $1/25 \pm 16/93$  و میانگین سنی ۴ تا ۵ ماه) در قالب یک طرح کاملاً تصادفی به چهار جیره غذایی اختصاص داده شد که در هر تیمار ۶ راس بزغاله مرکز مورد آزمایش قرار گرفت. جیره‌های غذایی شامل ۱) جیره شاهد، ۲) جیره حاوی ۸ درصد میوه بلوط، ۳) جیره حاوی ۱۷ درصد میوه بلوط و ۴) جیره حاوی ۲۵ درصد میوه بلوط بود. دلیل انتخاب درصدهای متفاوت میوه بلوط در جیره‌های آزمایشی بر اساس دیگر مطالعات صورت گرفته و تعیین ارزش غذایی میوه بلوط بود. قبل از شروع آزمایش یک دوره عادت دهی ۱۵ روزه اجرا شد. طول دوره انجام آزمایش خوراک‌دهی به دام‌ها ۱۰۵ روز بود و مدت زمان انجام آزمایشات آزمایشگاهی حدود ۱۸۰ روز بود.

بخش علوفه جیره شامل علوفه یونجه و کاه گندم بود و بخش کنسانتره جیره شامل سبوس گندم، کنجاله سویا، دانه جو، میوه بلوط و کربنات کلسیم بود. ترکیبات شیمیایی مواد خوراکی، اجزا تشکیل دهنده جیره‌های آزمایشی و مواد مغذی موجود در آنها در جداول ارائه شده است. جیره‌ها به‌طور کاملاً مخلوط و تا حد اشتها در اختیار دام قرار می‌گرفت (جدول ۱). خوراک دهی در دو نوبت صبح و بعدازظهر انجام شد. ترکیبات شیمیایی شامل ماده خشک (دمای ۱۰۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت)، پروتئین (روش کج‌لدال)، چربی (دستگاه سوکسله) و خاکستر (۵۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۶ ساعت) با استفاده از روش انجمن رسمی شیمی - دانان کشاورزی آنالیز شد (جدول ۱). میوه بلوط مورد استفاده قرار گرفته در این آزمایش از گونه کوئرکوس پرسیکا تهیه شده از جنگل‌های بلوط استان کردستان بود. میزان تانن متراکم و تانن قابل هیدرولیز موجود در میوه بلوط نیز اندازه‌گیری شد (جدول ۲) و میزان تانن موجود در سطوح متفاوت از جیره غذایی اندازه‌گیری شد (جدول ۳).

15. Hypervariable

16. Polymerase chain reaction

17. Single-stranded conformation polymorphism

جدول ۱. مواد خوراکی و ترکیبات شیمیایی تشکیل دهنده جیره‌ها (براساس ۱۰۰ درصد ماده خشک)

Table 1. Ingredients and chemical composition of the experimental diets (% DM)

Ingredients	Experimental diets (100%)			
	25% oak Acorn	17% oak Acorn	8% oak Acorn	Non oak Acorn
Alfalfa	16.50	16.50	17.80	18.23
Straw	16.67	18.47	18.65	21.74
Wheat bran	4.70	3.80	4	1
Soyben meal	6.24	5.30	3.60	3.06
Barley	30.50	38.50	47.50	55.50
Oak	25	17	8	0
Calcium carbonate	0.39	0.43	0.45	0.47
Chemical composition				
Dry Matter (%)	92.75	92.77	92.74	92.76
Metabolizable Energy (Mcal/kg)	2.55	2.55	2.55	2.55
Protein (%)	11.09	11.09	11.09	11.09
Calcium (%)	0.52	0.52	0.52	0.52
Phosphorus (%)	0.31	0.31	0.32	0.30
NDF (%)	37.46	38	38	38.67
ADF (%)	23.80	23.12	21.92	21.68

جدول ۲. میزان تانن موجود در بلوط

Table 2. The amount of tannin in the oak

Amount	Tannin condensed	Tannin hydrolyzable	Total tannin
(gr/kg)	0.15	4.19	4.34
(%)	3.5	96.5	100

جدول ۳. غلظت تانن موجود در سطوح متفاوت از بلوط استفاده شده در جیره

Table 3. The concentration of tannins found on different levels of oak used in the diet

Experimental diets	Tannin condensed (gr/kg)	Tannin Hydrolyzable (gr/kg)	Total tannin (gr/kg)	Amount of oak (gr/kg)
8% oak Acorn	0.1	3.4	3.5	80
17% oak Acorn	0.3	7.1	7.5	170
25% oak Acorn	0.4	10.5	11	250

بعد از ۱۰۵ روزگی بصورت تصادفی از هر تیمار ۳ رأس کشتار شدند. بلافاصله بعد از کشتار شکمبه-نگاری دام جهت نمونه برداری آماده شد. شکمبه-نگاری ابتدا به شش قسمت تقسیم شد و نمونه برداری از این شش جایگاه مختلف که عبارتند از: نگاری<sup>۱۸</sup>، قسمت‌های پشتی<sup>۱۹</sup>، شکمی<sup>۲۰</sup>، جانبی<sup>۲۱</sup>، خلفی<sup>۲۲</sup> و پیلا<sup>۲۳</sup> شکمبه انجام شد. از هر جایگاه انتخاب شده یک نمونه از بافت آن جایگاه گرفته شده و با سرم نمکی شستشو داده شد. نمونه‌ها در ظرف‌های استریل جمع آوری شدند و تا زمان استخراج

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

DNA در ۵۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در زمان استخراج DNA ابتدا نمونه‌ها در دمای آزمایشگاه یخ‌گشایی شدند. جهت استخراج DNA از نمونه‌ها از پروتکل فنل کلروفورم ارائه شده توسط تاجیما و همکاران (۱۹۹۹) استفاده شد (Kamra., 2005). آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق دو آغازگر رفت و برگشت با طول ۱۷ باز مربوط به قطعه V3 از ژن 16SrRNA بز جهت انجام روش PCR-SSCP به کار برده شدند. توالی آغازگرها در جدول (۴) نشان داده شده است (Pitta et al., 2010).

جدول ۴. آغازگرهای استفاده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر ژن 16SrRNA

Table 4. Primers used to propagate the desired 16SrRNA gene

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

برای انجام واکنش‌های PCR از میکروتیوب‌های ۲۰۰µl استفاده شد. حجم نهایی برای هر واکنش ۱۰µl بود. Master Mix مورد استفاده به صورت کیت‌های آماده از شرکت فرمنتاز خریداری شد. برای جلوگیری از تبخیر، یک قطره (۱۰µl) روغن معدنی به هر لوله افزوده شد. غلظت هر پرایمر ۰/۲ میکرومولار بود و از کیت شرکت سیناژن برای PCR استفاده 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 درجه سانتیگراد به مدت ۱۵ دقیقه، مرحله ۲ یا Touchdown شامل ۱۰ چرخه هر چرخه بصورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۱ درجه سانتیگراد (به ازای هر سیکل ۰/۵ درجه سانتیگراد دما کاهش می‌یابد) به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه، مرحله ۳ یا اتصال شامل ۲۵ چرخه هر چرخه بصورت ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و مرحله ۴ یا تکثیر نهایی شامل ۱ چرخه بصورت ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه بود. جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA های استخراج شده از الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آکریل آمید ۸ درصد و رنگ آمیزی با نیتراز نقره استفاده شد. در این پژوهش برای تهیه ژل آکریل آمید ۸ درصد از استوک ۲۹:۱ آکریل آمید به بیس آکریل آمید 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 تترامیل تیلندامین<sup>۲۴</sup> اضافه شد.

جهت انجام روش SSCP از ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲ درصد استفاده شد. از استوک‌های ۴۹:۱ و ۳۷٫۵:۱ برای تهیه ژل پلی‌آکریل آمید 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 دوار تقطیر با هم مخلوط شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر آمونیوم پر سولفات ۱۰ درصد و ۲۵ میکرولیتر TEMED اضافه شد. پس از بارگذاری نمونه‌ها بر روی ژل پلی‌آکریل آمید ۱۲٪، تانک الکتروفورز به درون یخچال (دمای ۴ درجه 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 رنگ آمیزی با نیتراز نقره گردید. پس از رنگ آمیزی ژل با استفاده از نیتراز نقره، عکس ژل با استفاده از دستگاه اسکنر تهیه شد. جهت تعیین باندهای موجود 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 مشخص کننده تعداد و نوع باند بصورت اعداد ۰ و ۱ که به ترتیب نشان‌دهنده عدم حضور و حضور باند بود تهیه گردید. در این بررسی هر باند نشان‌دهنده یک واحد تاکسونومی<sup>۲۵</sup> 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

24. Tetramethylethylenediamine (TEMED)

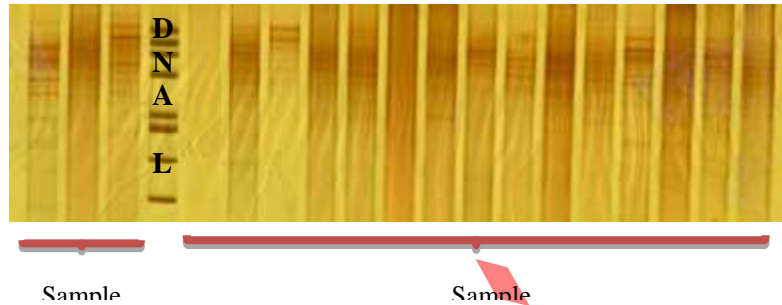
25. Operational Taxonomy Unit (OTU)



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.

شکل ۱. ژل پلی آکریل آمید ۱۲ درصد (نمونه بافت اپیتلیال دورسال)

Figure 1. 12% polyacrylamide gel (sample epithelial tissue dorsal)



## نتایج و بحث

تحقیقات زیادی در ارتباط با مصرف خوراک و بررسی عملکرد دام انجام گرفته است. بررسی تاثیر خوراک بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه به‌عنوان یک جزء ضروری در هضم خوراک و در نهایت متابولیسم حیوان میزبان بسیار کم بوده است. بررسی تاثیر خوراک بر تنوع جمعیت باکتریایی نقش بسیار مهمی در بررسی تاثیر جیره بر عملکرد دام دارد. این تحقیق به‌منظور تاثیر گونه بلوط ایرانی بعنوان یک منبع خوراکی حاوی تانن بر تنوع میکروارگانیسم‌های شکمبه در نژاد بز مرخز انجام گرفته است. نتایج به‌دست آمده از این آزمایش نشان داد که استفاده از سطوح متفاوت بلوط در جیره غذایی دام بطور معنی‌داری بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم شکمبه تاثیرگذار است. استفاده از میوه بلوط در مقایسه با جیره شاهد موجب افزایش تنوع جمعیت باکتریایی اپیتلیال شکمبه- نگاری بطور غیرمعنی‌داری کاهش پیدا کرد.

جدول ۵. تاثیر سطوح مختلف میوه بلوط و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه

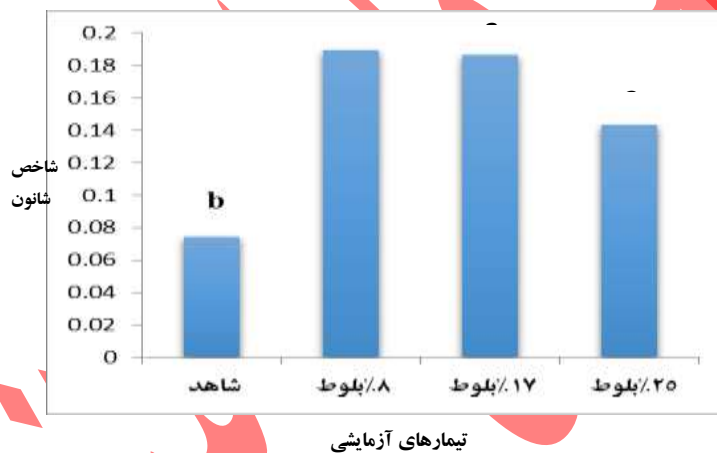
Table 5. The effect of different levels of oak acorn and sampling site on biodiversity of ruminal epimoral bacterial population

Sample	Ration (%)	Shannon Indicator
Rumen epithelial tissue	0	0.07455 <sup>b</sup>
Rumen epithelial tissue	8	0.18923 <sup>a</sup>
Rumen epithelial tissue	17	0.18636 <sup>a</sup>
Rumen epithelial tissue	25	0.14333 <sup>a</sup>
P Value		P Value < 0/0001
Sample	Sampling Position	Shannon Indicator
Rumen epithelial tissue	Dorsal rumen	0.16343 <sup>ab</sup>
Rumen epithelial tissue	Ventral rumen	0.15052 <sup>ab</sup>
Rumen epithelial tissue	Caudal rumen	0.14622 <sup>ab</sup>
Rumen epithelial tissue	Lateral rumen	0.12902 <sup>b</sup>
Rumen epithelial tissue	Pilar rumen	0.10322 <sup>b</sup>
Rumen epithelial tissue	Reticulum	0.19783 <sup>a</sup>
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 (۵) ارائه شده است. نتایج نشان داد که تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی دار است ( $P < 0.001$ ). کمترین مقدار شاخص شانون مربوط به تیمار شاهد بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی داری داشت ( $P < 0.05$ ). در بین سایر تیمارها اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $P > 0.05$ ), 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 معنی داری در جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه در نتیجه استفاده از جیره غذایی حاوی سطوح ۸۰، ۱۷۰ و ۲۵۰ گرم بلوط در کیلوگرم جیره غذایی با میزان ۳/۵، ۷/۵ و ۱۱ گرم تانن در کیلوگرم جیره غذایی (به ترتیب) نسبت به تیمار شاهد مشاهده شد که این نتایج می تواند 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 معنی داری 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 ۲).

شکل ۲. تأثیر جیره بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون  
Figure 2. Effect of diet on biodiversity of ruminal epimoral bacterial population using Shannon index



کاهش فعالیت اوره آز و پروتئاز در رابطه با تانن بلوط در شرایط *in vivo* گزارش شده است. بنابراین انتظار می رود هنگامیکه بلوط به تغذیه حیوان می رسد فعالیت آنزیمی شکمبه به سطح پائینی برسد (Lee et al., 1996). در بررسی اثر تانن اسپرس بر رشد و تجزیه پروتئین توسط چهار سویه باکتریایی گزارش شده که رشد باکتری های پروتئولایتیک از جمله رومینوباکتر آمیلوفیلیس<sup>۲۶</sup>، بوتیریوویریوفیبریولونوس<sup>۲۷</sup> و استرپتوکوکوس بویس<sup>۲۸</sup> کاهش یافت اما تأثیر کمی بر رشد سویه پروتلا رومینی کولا<sup>۲۹</sup> دارد. در باکتری هایی که توسط تانن مهار شده اند تغییرات مورفولوژیکی رخ داده است در حالیکه پروتلا رومینی کولا مواد خارج سلولی تولید کرده است که این باکتری را از تأثیرات مستقیم تانن محافظت می کند. تانن متراکم از فعالیت آنزیم های آندوژنوسی ممانعت می کند در نتیجه با تشکیل کمپلکس تانن- پروتئین در شکمبه، تجزیه پروتئین در شکمبه ممکن است کاهش یابد که این ممکن است موجب ممانعت از رشد و فعالیت باکتری های تجزیه کننده پروتئین شود (Nishitani, & Osawa., 2005). شمار کل باکتریها در شکمبه بز هنگامیکه حیوانات با گیاهان حاوی تانن بالا تغذیه شدند بطور معنی داری کاهش پیدا کرد و کاهش در تعداد به طور

26. *Ruminobacter amylophilus*  
27. *Butyrivibrio fibrisolvens*  
28. *Streptococcus Bovis*  
29. *Prevotella ruminicola*

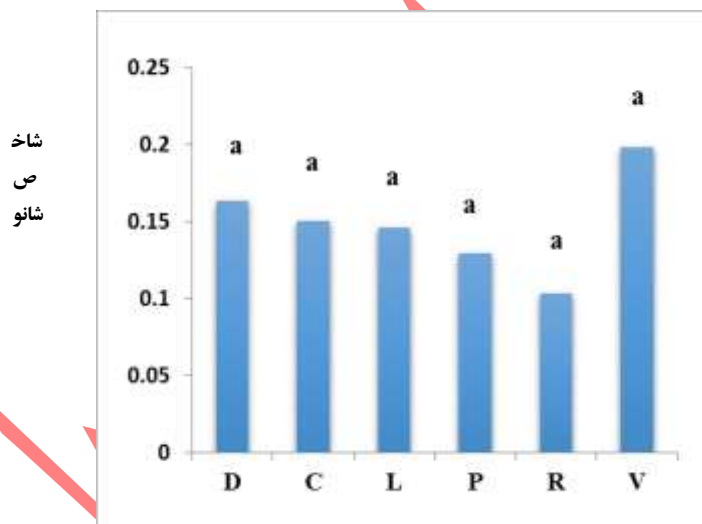


مستقیم با سطح این خوراک در جیره مرتبط بود (Jill., 2004). حدوداً ۱۰ دقیقه بعد از اضافه کردن تانن به محیط، تانن با باکتریها باند می‌شود. اختلاف زیادی میان باکتری‌ها برای باندشدن با تانن و مقدار تانن مورد نیاز برای مهار رشد وجود دارد (Muetzel & Becker., 2006). تاثیر تانن بر باکتری شکمبه وابسته به گونه میکروارگانیسم و یا منبع تانن موجود در خوراک است (Patra & Saxena., 2009a). شرایط محیطی مانند pH، درجه بی‌هوازی بودن و نیز منابع و مقدار سوپسترا بر جمعیت باکتریایی شکمبه بسیار تاثیرگذار است (Mehansho et al., 1992). در زمانیکه بلوط به همراه جو به جیره افزوده شده است دو منبع کنسانتره‌ای دانه جو و میوه بلوط تامین کننده میزان کنسانتره مورد نیاز دام می‌باشند که این خود موجب افزایش تنوع در منابع خوراکی جیره می‌گردد و این بر تنوع جمعیت میکروارگانیسم‌ها تاثیرگذار است.

**تاثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه:** تاثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون محاسبه شد و نتایج در جدول (۵) ارائه شده است. نتایج نشان داد که تاثیر جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی‌دار نیست ( $P > 0.05$ ) بیشترین مقدار شاخص شانون مربوط به جایگاه و نترال شکمبه و کمترین مربوط به رتیکولوم بود (شکل ۳).

شکل ۳. تاثیر جایگاه نمونه‌گیری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه با استفاده از شاخص شانون

Figure 3. The effect of sampling position on biodiversity of ruminal epimoral bacterial population using Shannon index



نتایج آزمایش حاضر با یافته‌های سادت و همکاران (۲۰۰۷) 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 (Sadet et al., 2007). همچنین این نتایج مشابه با نتایج لوکاس و همکاران (۲۰۱۰) 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).

**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 (۵) ارائه شده است. نتایج نشان داد که اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه‌برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی‌دار می‌باشد ( $P > 0.05$ ).

## نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که استفاده از میوه بلوط تا سطح ۱۷ درصد در جیره غذایی موجب افزایش در تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیتلیوم شکمبه شد درحالیکه استفاده از سطوح ۲۵ درصد میوه بلوط در جیره غذایی موجب کاهش تنوع زیستی در جمعیت باکتریایی شکمبه شد. نتایج نشان داد که تاثیر جایگاه نمونه برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی اپیمورال شکمبه معنی دار نبود و بیشترین مقدار تنوع زیستی مربوط به جایگاه و نترال شکمبه و کمترین مربوط به رتیکولوم بود. اثر متقابل جیره و جایگاه نمونه برداری بر تنوع زیستی جمعیت باکتریایی محتوی شکمبه معنی دار شد.

## سپاسگزاری

مطالعه حاضر در دانشکده کشاورزی دانشگاه کردستان انجام گرفته است که بدین وسیله از تمامی کسانی که در این مجموعه فعالیت دارند تشکر و قدردانی می گردد.

## منابع

1. Boubaker, A. G, Abdouli, H., Mosquera Losada, M.R., Tayachi, L., Mnsouri, M., & Zidib, L. (2007). Cork oak (*Quercus Suber* L.) acorn as a substitute for barley in the diet of rabbits: Effect on in vivo digestibility, growth and carcass characteristics. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6, 1219-1222.
2. Bretschger, O., Osterstock, J. B., Pinchak, W. E., Ishii, S., & Nelson, K. E. (2010). Microbial fuel cells and microbial ecology: applications in ruminant health and production research. *Journal of Microbial Ecology*, 59, 415-427.
3. 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.
4. 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.
5. 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).
6. 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.
7. 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.
8. 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).
9. Jany, J. L., & Georges, B. (2008). Culture-Independent methods for identifying microbial communities in cheese. *Journal of Food Microbiology*, 25, 839-848.
10. 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.
11. 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.
12. Kamra D. N. 2005. Rumen microbial ecosystem. *Journal of Current Science*, 89, 124-135.
13. 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.
14. 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.
15. 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.

16. Lukas, F., Simunek, J., Mrazek, J., & Kopečný, J. (2010). PCR-DGGE analysis of bacterial population attached to the bovin rumen wall. *Journal of Folia Microbiol*, 55, 345-348.
17. Maldar, S. M., Rozbahan, Y., & Alipur, D. (2009). The effect of habituation to oak leaves on laboratory digestibility and rumen parameters of goats. *Iranian Journal of Animal Sciences*, 3, 252-243. (In Persian).
18. Martin, M. L. (2011). Sainfoin tannins and their impact on protein degradation during silage and rumen fermentation and testing of novel techniques. Doctoral thesis swedish university of agricultural sciences uppsala. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae.
19. 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.
20. 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.
21. McSweeney, Ch., Kang, S., Davis, E. G. C, Morrison, M., & Denman, S. (2009). Recent developments in nucleic acid based techniques for use in rumen manipulation. *Journal of Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 38: 341-351.
22. 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.
23. 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.
24. 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.
25. Nocker, A, Burr, M., & Camper, A, K. (2007). Genotypic microbial community profiling: a critical technical review. *Journal of Microbial Ecology*, 54, 276-289.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. 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.
34. SAS. (2002). User's guide: Statistics, Version 9.1. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA.
35. Sun, Y. Z., Maob, S. Y., & Zhu, W. Y. (2009). Rumen chemical and bacterial changes during stepwise adaptation to a high-concentrate diet in goats. *Journal of the Animal Consortium*, 4, 210-217.

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

### 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 Markhoz goats. A total of 24 Markhoz goats with a mean BW of  $16.93 \pm 1.25$  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.

**Keywords:** Bacterial population, Biodiversity, Markhoz goats, Oak Acorn, Rumen epimural, PCR-SSCP.