Archive of SID

سال اول/ شماره اول/ تابستان ۱۴۰۰ https://www.qafj.iauk.ac.ir

بررسی تنوع ژنتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از نمونه‌های شیر گاو به روش RAPD-PCR

حکیمه قلعه‌خانی[۱]، معصومه حاجی‌رضایی*[۲]، آرتادخت توکلی[۲]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

* نویسنده مسئول: Ma.hajirezaei@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۲/۷، پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۳/۲۱

چکیده

محصولات لبنی مناطق مختلف می‌توانند منبعی برای سویه‌های جدید *لاکتوباسیلوس* باشند، بنابراین شناسایی مولکولی و بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌تواند گام موثری در شناسایی ذخیره *لاکتوباسیلوس‌های* بومی با خصوصیات عملکردی ویژه و به کارگیری آنها در محصولات لبنی صنعتی شود. هدف از این تحقیق جداسازی *لاکتوباسیلوس‌ها* از فلور موجود در شیر گاو شهرستان نرماشیر و بررسی تنوع ژنتیکی آنها می‌باشد. بدین‌منظور تعداد ۲۱ نمونه شیر از مناطق مختلف این شهرستان جمع‌آوری و با روش‌های مرسوم فنوتیپی و بیوشیمیایی *لاکتوباسیلوس‌ها* جداسازی شدند. به منظور غربالگری و بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده، پنج پرایمر RAPD به طور تصادفی انتخاب گردید و پس از PCR، تجزیه و تحلیل تنوع ژنتیکی و فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Pyelph انجام و درخت فیلوژنی رسم شد. تجزیه خوشه‌ای داده‌های مولکولی توانست جدایه‌ها را در فاصله ژنتیکی ۱۰ به هفت گروه مجزا تقسیم‌بندی کند. جدایه‌های K3 و K4 در گروه یک و جدایه‌های K21 و K13 و K11 در گروه چهار قرار گرفتند. بقیه جدایه‌ها در گروه‌های مجزا قرار گرفتند. از آنجائیکه جدایه‌های K3 و K4 از یک ناحیه و جدایه‌های K21 و K13 نیز از یک ناحیه جمع‌آوری شده‌اند، قرار گرفتن آنها در یک گروه منطقی به نظر می‌رسد. نتایج بدست آمده از این تحقیق بیانگر تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌های بومی شهرستان نرماشیر و مناسب بودن تکنیک RAPD-PCR برای مطالعات مشابه می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *لاکتوباسیلوس*، تنوع ژنتیکی، RAPD-PCR، درخت فیلوژنی

مقدمه

باکتری‌های اسیدلاکتیک، باکتری‌های گرم مثبت، بی‌حرکت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیاء نیترات منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر به ذوب ژلاتین و تولید ایندول نمی‌باشند. این باکتری‌ها مکمل‌های غذایی هستند که روی میزبان تأثیرات سودمندی داشته و به تعادل فلور میکروبی روده کمک می‌کنند (۱). این باکتری‌ها اولین بار از شیر جداسازی شدند و امروزه به صورت گسترده به عنوان کشت آغازگر در صنایع لبنی، گوشت، سبزی‌ها و غلات، به کار می‌روند (۲). همچنین استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های ضد میکروبی آن‌ها در پیشگیری از فساد فرآورده‌های غذایی و افزایش زمان ماندگاری، به ویژه در فرآوردهایی که غنی از مواد مغذی و ویتامین هستند استفاده از آنها بسیار رایج شده است (۳). با افزایش مقاومت دارویی و عوارض ناشی از مصرف داروهای شیمیایی استفاده از درمان‌های طبیعی جایگزین، ضروری به نظر می‌رسد (۴).

باکتری‌های اسید لاکتیک علاوه بر این که قادر به کاهش میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد هستند، می‌توانند متابولیت‌های تولیدی و توکسین‌های احتمالی تولید شده توسط آن‌ها را نیز بی‌اثر کنند. فعالیت ضد

www.SID.ir

Archive of SID

میکروبی این باکتری‌ها، ناشی از عوامل گوناگون از جمله تولید اسیدهای آلی (اساساً اسیدهای لاکتیک و استیک)، باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید و آمونیاک می‌باشد. مطالعات نشان می‌دهد که تغییرات در میکروبیوم ممکن است در دوره شیرخوارگی و یا دوران کودکی در اثر عوامل مختلف مثل عفونت اتفاق بیفتد. علاوه بر این، بیماری‌های دوران کودکی مانند آنتروکولیت نکروزان، کولیک شیرخواران، آسم، بیماری آتوپیک، بیماری‌های گوارشی، دیابت، سوءتغذیه، خلق و خوی، اختلالات اضطرابی و اختلالات طیف اوتیسم با تغییرات میکروبیوم در ارتباط بوده است (۵).

جنس *لاکتوباسیلوس* بزرگترین جنس در گروه باکتری‌های اسیدلاکتیک هتروژن است. *لاکتوباسیلوس‌ها* باکتری‌های میله‌ای شکل به طول ۱۰-۱ و عرض ۱/۲-۰/۵ میکرون می‌باشند. این باکتری‌ها با اینکه فاقد کاتالاز و سیتوکروم اکسیداز هستند، ولی در مجاورت اکسیژن هوا رشد می‌کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود ۵٪ دی‌اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می‌شود. دمای بهینه رشد آنها بین ۴۰-۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد اما توانایی رشد تا دمای ۵۳-۵۰ درجه سلسیوس را نیز دارند (۲). در حال حاضر بیش از صد گونه از این جنس شناسایی شده است (۶، ۷). مهم‌ترین جنس‌های باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل: *لاکتوباسیلوس*[1]، *لاکتوکوکوس*[2]، *انتروکوکوس*[3]، *استرپتوکوکوس*[4]، *پدیوکوکوس*[5]، *لوکونوستوک*[6] و *بیفیدوباکتریوم*[7] می‌باشند (۲).

لاکتوباسیلوس‌هایی که به عنوان آغازگر برای تولید فرآورده‌های لبنیاتی استفاده می‌شوند، عامل اصلی تخمیر و محافظت کننده غذا نیز هستند. این باکتری‌ها همچنین در ایجاد بو، طعم و بافت فرآورده‌های تخمیری نقش بسزایی دارند (۸).

سویه‌های متعددی از *لاکتوباسیلوس*‌های پروبیوتیک در طیف وسیعی از محصولات غذایی انسان‌ها و حیوانات وجود دارند (۹). از آنجا که ظرفیت‌های پروبیوتیکی وابسته به سویه می‌باشند، انتخاب متدهای قابل اطمینان برای شناسایی *لاکتوباسیلوس‌ها* از اهمیت خاصی برای محققین برخوردار است. اغلب جنس‌ها از نظر فنوتیپی ناهمگن هستند و شناسایی سویه‌های *لاکتوباسیلوس* بسیار وابسته به خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی است (۱۰). به کارگیری روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار وقت‌گیر و ابهام‌آمیز می‌باشند. در بسیاری از آزمایشگاه‌های تحقیقاتی و رده‌بندی باکتری‌ها، کوشش در طبقه‌بندی باکتری‌ها بر اساس تست‌های مولکولی می‌باشد. امروزه شناسایی از روش‌های فنوتیپیکی به ژنوتیپیکی تغییر یافته است، چون دارای دقت و صحت بالاتری هستند. مطالعات مولکولی از جمله هیبریداسیون DNA و شناسایی از طریق ژن‌های rRNA می‌توانند در شناسایی مفید واقع شوند (۱۱). واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[8] روش قابل اعتمادی است که با صحت بسیار بالا و به طور موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی بسیاری از ارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها، ویروس‌ها و گونه‌های *لاکتوباسیلوس* مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۲).

در بین روش‌های مولکولی، RAPD-PCR[9] روش موفقیت‌آمیزی در طبقه‌بندی و مشخص نمودن تنوع ژنتیکی باکتری‌ها به خصوص *لاکتوباسیلوس‌ها* می‌باشد. اساس این روش بر پایه استفاده از تنها یک پرایمر با طول کوتاه و توالی‌های اختیاری است. در این روش قطعاتی از ژنوم (یک تا ده قطعه و یا حتی بیشتر) به طور تصادفی تکثیر می‌شوند. حضور و یا عدم حضور این قطعات یا باندها معیاری برای بررسی پلی‌مورفیسم در بین سوش‌های یک گونه است (۱۳). به دلیل صحت بالا و توانایی این روش در طبقه‌بندی و تعیین ارتباطات ژنتیکی، در مطالعات بررسی تنوع ژنتیکی بسیاری از موجودات استفاده شده است.

[1] *Lactobacillus*
[2] *Lactococcus*
[3] *Enterococcus*
[4] *Streptococcus*
[5] *Padiococcus*
[6] *Leuconostoc*
[7] *Bifidobacterium*

[8] Polymerase Chain Reaction
[9] Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

هدایتی و همکاران (۱۴) و صفری و همکاران (۱۵) در دو تحقیق مجزا از روش RAPD-PCR برای بررسی تنوع ژنتیکی کلزا استفاده کردند (۱۵). از RAPD-PCR همچنین برای بررسی تنوع ژنتیکی صنوبر (۱۶)، گندم (۱۷، ۱۸) پسته (۱۹) و انار (۲۰) و دیگر گیاهان استفاده شده است.

از این روش همچنین برای بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های بالینی *مایکوباکتریوم فورچونتیوم*[1] استفاده کردند (۲۱). از RAPD_PCR در تحقیقات مجزایی برای تعیین تنوع ژنتیکی *هلیکوباکترپیلوری*[2] (۲۲)، *سالمونلا پارا تیفی B*[3] و *سالمونلا پاراتیفی C* (۲۳) جدا شده از بیماران، *اشرشیاکلی*[4] جدا شده از نمونه‌های عفونت ادراری (۲۴) و گروهی از استرپتوکوکوس‌های[5] بیمارستانی (۲۵) نیز استفاده شده است.

از این روش در طبقه‌بندی *لاکتوباسیلوس‌ها* نیز استفاده شده است. تفویضی (۱۳) و مختاری زنوزی در دو تحقیق مجزا به بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از محصولات لبنی سنتی ایران توسط RAPD-PCR پرداختند (۲۶). همچنین برای مطالعه و شناسایی *لاکتوباسیلوس‌های* جداسازی شده از پنیر لیقوان (۲۷)، پنیر سنتی مانچگو (۲۸) و پنیر ایتالیایی (۲۹) نیز از RAPD-PCR استفاده شده است.

در تحقیق حاضر هدف جداسازی و بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* موجود درشیر سنتی شهرستان نرماشیر به روش RAPD-PCR می‌باشد. این اقدام می‌تواند اولین قدم برای توسعه یک آغازگر جهت استفاده در سطح صنعتی برای تولید محصولات سالم و با طعم و بافت بهتر باشد.

مواد و روش‌ها

این تحقیق از نوع تحقیق توصیفی مقطعی می‌باشد.

نمونه‌گیری

تعداد ۲۱ نمونه شیر گاو محلی در بهار ۱۳۹۷ از روستاهای شهرستان نرماشیر، تحت شرایط استریل در فالکون‌های درب‌دار استریل جمع‌آوری و درون بسته‌های یخی به آزمایشگاه منتقل شدند. در آزمایشگاه نمونه‌ها در شرایط استریل و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام مراحل بعدی، نگهداری شدند (۳۰).

آماده‌سازی نمونه‌ها

در فاصله زمانی کمتر از ۲۴ ساعت رقت‌سازی نمونه‌ها در سرم فیزیولوژی استریل انجام شد. برای این منظور ابتدا از نمونه شیر، یک سی‌سی با سمپلر برداشته و آن را در ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل ریخته شد و از آن به عنوان رقت 10^{-1} برای تهیه رقت‌های بعدی (رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6}) مورد استفاده قرار گرفت (۳۱).

برای جداسازی *لاکتوباسیلوس‌ها* از سری پنج‌تایی، لوله‌های حاوی ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی استریل استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت بر روی محیط کشت اختصاصی ام‌آراس آگار استریل، به روش خطی کشت داده شد. به مدت ۷۲ ساعت در دمای $30^{\circ C}$ در جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک نوع A گرمخانه‌گذاری شد. برای تأمین دی‌اکسیدکربن جهت رشد بهتر *لاکتوباسیلوس‌ها*، شمع روشنی داخل جار قرار داده شد. کشت‌ها در دو تکرار انجام شدند. پس ازگذشت ۴۸ و ۷۲ ساعت، نمونه‌های کشت داده شده از لحاظ وجود یا عدم وجود *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی قرار گرفتند (۳۲).

کلنی‌هایی که از لحاظ شکل، اندازه، کدر یا شفاف بودن و سایر ویژگی‌های ظاهری متفاوت بودند، به صورت جداگانه روی پلیت‌های حاوی محیط ام‌آراس آگار ۲ الی ۳ بار کشت چند شعله داده شده و به مدت ۷۲ ساعت در دمای $30^{\circ C}$ در جار بی‌هوازی و با استفاده از گاز پک A انکوبه شدند. سپس تمامی کلنی‌ها جهت بررسی رنگ‌آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی، مورفولوژی سلولی و کلنی مورد آزمایش قرار گرفتند (۳۱). تمامی باکتری‌های

[1] *Mycobacterium fortuitum*
[2] *Helicobacter pylori*
[3] *Salmonella*
[4] *Escherichia coli*
[5] Streptococcus

www.SID.ir

Archive of SID

گـرم مثبـت، کاتـالاز منفـی بـدون اسـپور بـه عنـوان *لاکتوباسیلوس* در نظر گرفته شدند.

تعیین الگوی تخمیر کربوهیدرات‌ها

جهت بررسی واکنش تخمیر جدایه‌های بدست آمـده از محیط کشت فنل رد براث با ده درصد قندهای سـوربیتول، آرابینوز، گلوکز، گالاکتوز استفاده شد. تخمیـر قنـد بـا زرد شدن محیط کشت به واسـطه تولیـد اسـید و تغییـر رنـگ معرف از قرمز به زرد مشخص گردید (۳۳).

تست همولیز

برای انجام این تست نیاز به محیط بلادآگار مـی‌باشـد. پس از کشت باکتری‌های موردنظر و انکوباسیون بـه مـدت ۲۴ ساعت، محیط‌ها از نظر انواع همـولیز (آلفـا، بتـا، گامـا) بررسی شدند (۳۳).

بررسی رشد باکتری در دماهای مختلف

بـاکتری‌هـای خـالص‌شـده را در محـیط ام‌آراس بـراث کشت داده و در انکوباتور در دماهـای ۳۰، ۱۵ و ۴۵ درجـه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲۴-۴۸ ساعت بعـد از نظـر رشـد با توجه به کدورت بررسی شدند (۲).

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

برای بررسـی جدایـه‌هـا بـه روش مولکـولی، اسـتخراج DNA بـا کیـت EZ-10 SPIN COLUMN GENOMIC DNA (BS423-L515R0C) صـورت گرفت. غلظت و خلوص نمونه‌های استخراج شده با استفاده از اسپکتوفتومتر بررسی گردید (۲).

بعد از بررسی منابع مختلف، تعداد پنج پرایمر (جـدول ۱) برای انجام کار انتخاب شـدند (۱۳) و جهـت سـنتز بـه شرکت آروین کویر کریمان فرستاده شدند.

جدول ۱- پرایمرهای استفاده شده جهت بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده (۱۳)

۱	۲	۳	۸	۹	۱۰
شماره	**نام**	**توالی**	**TM**	**GC%**	**Mer**
۱	OPA-08	GTGACGTAGG	۳۲/۰۰	۶۰	۱۰
۲	OPA-13	CAGCACCCAC	۳۴/۰۰	۷۰	۱۰
۳	OPB-05	TGCGCCCTTC	۳۴/۰۰	۷۰	۱۰
۴	OPB-07	GGTGACGCAG	۳۴/۰۰	۷۰	۱۰
۵	OPB-20	GGACCCTTAC	۳۲/۰۰	۶۰	۱۰

برنامه زمـانی و دمـایی واکـنش زنجیـره‌ای پلیمراز

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز طبق برنامه دمـایی و زمـانی جدول شماره ۲ برای همه پرایمرها صورت گرفت (۱۳).

محصولات بدست آمده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بـا استفاده از ژل آگـارز ۱ درصـد درکنـار DNA مـارکر bp ۱۰۰ مطالعه شدند. سپس جهـت آنـالیز باندهـای بدسـت آمده از پنج پرایمر بـرای هـر نمونـه از نـرم‌افـزار Pyelph جهت رسم درخت استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- برنامه زمانی و دمایی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (۱۳)

ردیف	مرحله	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)
۱	دناتوراسیون اولیه	۹۲	۴
۲	دناتوراسیون	۹۲	۱
۳	اتصال	۳۶	۱
۴	گسترش	۷۲	۲
	تکرار مراحل ۲ تا ۴، تعداد سیکل: ۳۵		
۵	گسترش نهایی	۷۲	۵
۶	نگهداری	۴	۱۰

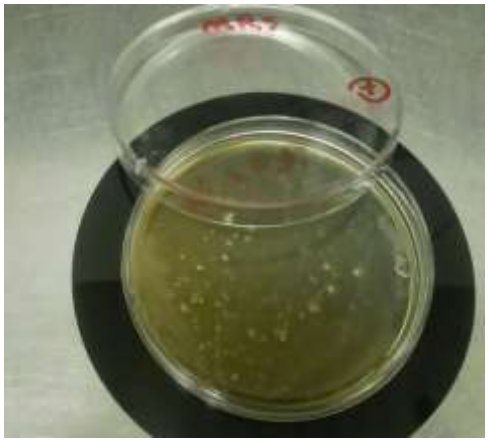
نتایج

آزمون‌های کاتالاز و رنگ‌آمیزی گرم

جدایه‌های باکتریایی کاتالاز منفی و گرم مثبت برای ادامه کار انتخاب شدند.

بررسی مورفولوژیکی و رشد در دماهای مختلف

*باسیلوس*ها و *کوکوباسیلوس*های گرم مثبت کاتالاز منفی، با توانایی رشد در دماهای ۱۵، ۳۰ و ۴۵ درجه سلسیوس جهت ادامه کار انتخاب شدند (شکل ۱). نتایج بررسی مورفولوژی در جدول ۳ آمده است.



شکل ۱- تصویر رشد جدایه‌ها در محیط کشت

آزمون تخمیر قندها

تست تخمیر ۴ قند انجام شد (شکل ۲)، و نتایج آن برای جدایه‌های باکتریایی در جدول ۴ آمده است.

شکل ۲- نتایج تخمیر قندها برای یک جدایه

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- نتایج بررسی مورفولوژی جدایه‌های باکتریایی

ردیف	شماره جدایه	فرم	حاشیه	سطح	رنگ	اندازه (میلی‌متر)
۱	K1	دایره‌ای	صاف	محدب	سفید	۴-۳
۲	K3	دایره‌ای	صاف	محدب	سفید	۲
۳	K4	دایره‌ای	صاف	محدب	شیری	۳
۴	K6	دایره‌ای	صاف	محدب	زرد تا بی‌رنگ	سوزنی
۵	K9	دایره‌ای	صاف	محدب	کرم	۲-۱
۶	K10	دایره‌ای	صاف	محدب	سفید	۳-۲
۷	K11	دایره‌ای	صاف	محدب	کرم	۴-۳
۸	K13	دایره‌ای	صاف	محدب	سفید	سوزنی
۹	K21	دایره‌ای	صاف	محدب	سفید	۴-۳
۱۰	K23	دایره‌ای	صاف	محدب	کرم	سوزنی

جدول ۴- نتایج تست تخمیر قندها

ردیف	شماره جدایه	سوربیتول	آرابینوز	گلوکز	گالاکتوز
۱	K1	+	+	+	–
۲	K3	+	+	+	–
۳	K4	+	–	+	–
۴	K6	+	+	+	–
۵	K9	+	+	+	+
۶	K10	+	+	+	–
۷	K11	+	+	+	–
۸	K13	+	–	+	–
۹	K21	+	+	+	–
۱۰	K23	+	+	+	–

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون همولیز

آزمون همولیز برای کلنی‌های منتخب صورت گرفت. جدایه‌های K9، K11، K13 و K23 بدون همولیز (گاما)، K1، K4، K6 و K21 همولیز کامل (بتا)، K3 و K10 همولیز ناقص (آلفا) را نشان دادند.

شناسایی مولکولی

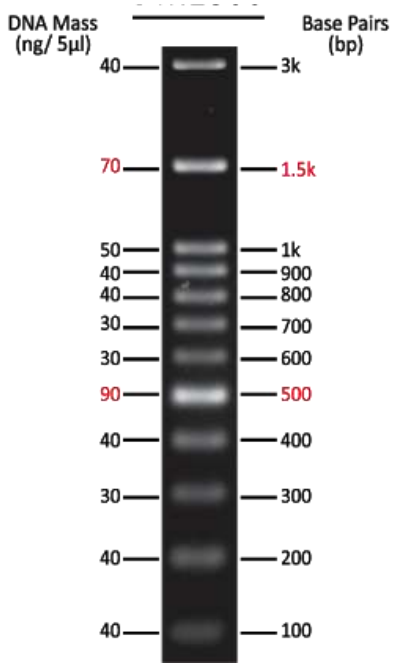
DNA کروموزومی از *لاکتوباسیلوس‌ها* استخراج شده و با استفاده از جذب نوری DNA در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و بررسی نسبت جذب در ۲۶۰ به ۲۸۰، غلظت و خلوص DNA استخراج شده بررسی شد. نمونه‌های دارای غلظت و خلوص مناسب جهت ادامه کار انتخاب شدند. سپس واکنش PCR با استفاده از پنج پرایمر ذکر شده صورت گرفت. محصولات PCR مربوط به هر پرایمر بر روی ژل ۱ درصد در کنار لدر bp ۱۰۰ (شکل ۳) الکتروفورز گردیدند (شکل ۴، ستون ۱).

از پنج پرایمر استفاده شده در این تحقیق هر پنج پرایمر باندهای قابل کدگذاری ایجاد کردند. باندهای حاصل شده از این پرایمرها در محدوده ۲۰۰ جفت باز و ۹۰۰ جفت باز قرار داشتند. تعداد کل باندهای تکثیر شده توسط کل پرایمرها ۱۵۵ عدد برآورد شد که شامل ۲۶ باند مشترک و شش باند اختصاصی بود. پرایمر OPB-07 بیشترین تعداد کل باند (۴۴ باند) و پرایمر OPB-05 کمترین تعداد کل باند (۲۶ باند) را دارا بودند.

جدایه K23 با ۱۹ باند، بیشترین و جدایه‌های K9، K21 و K3 با ۱۴ باند، کمترین باندها را ایجاد کردند.

نتایج حاصل از بررسی با نرم‌افزار Pyelph

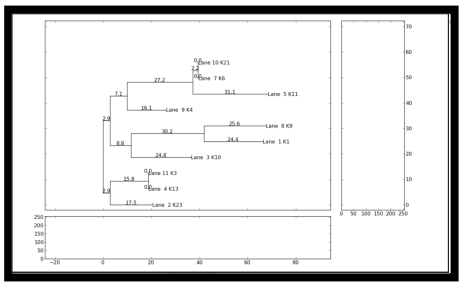
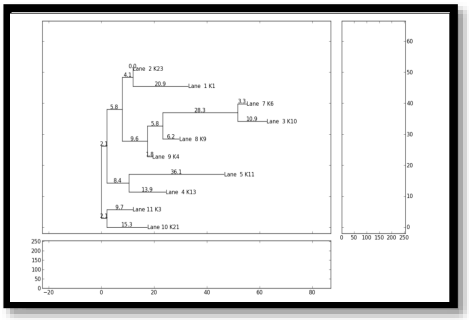
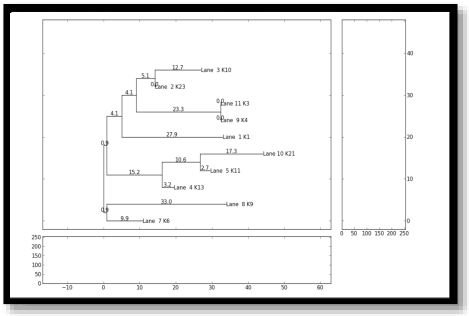
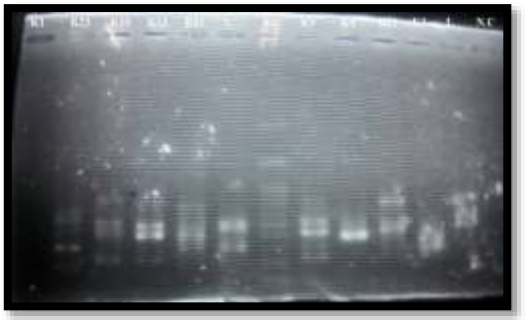
از نرم‌افزار Pyelph جهت آنالیز باندهای بدست آماده از پنج پرایمر و رسم دندروگرام‌ها برای باندهای بدست آمده از نمونه‌ها برای هر پرایمر (شکل ۴ ستون ۲) و دندروگرام نهایی (شکل ۵) استفاده شد. در درخت حاصل از مقایسه اطلاعات بدست آمده از هر پنج پرایمر، می‌توان بر اساس برش انجام شده در فاصله ژنتیکی ۱۰ جدایه‌ها را در هفت گروه اصلی قرار داد. در گروه اول نمونه K3 و K4، در گروه دوم جدایه K23، در گروه سوم جدایه K9، گروه چهارم K21-K11 و K13، گروه پنجم K10، گروه ششم K6 و در گروه هفتم K1 قرار می‌گیرند.



شکل ۳- لدر bp ۱۰۰

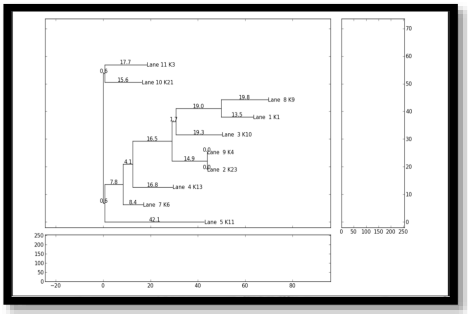
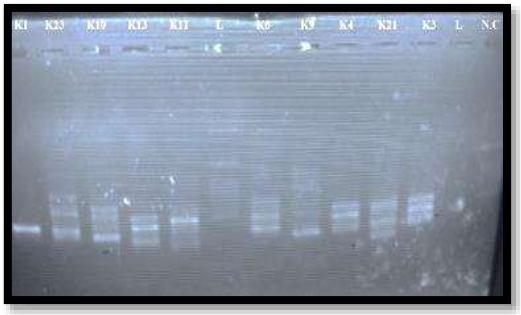
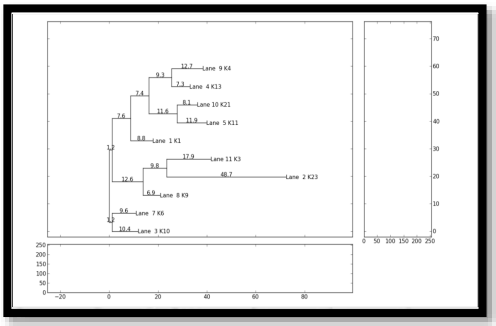
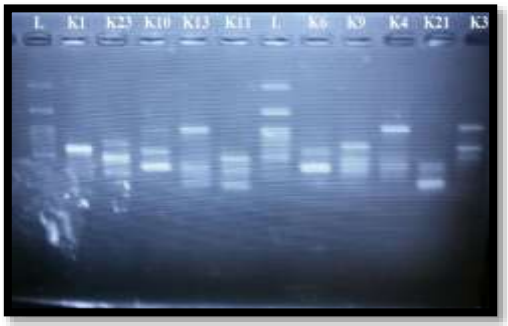
www.SID.ir

Archive of SID

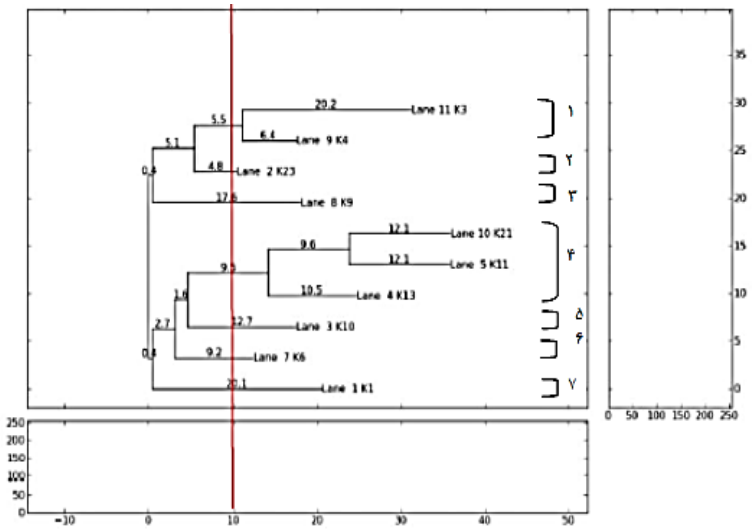
۲	۱
	
درخت مربوط به پرایمر OPB-05	ژل الکتروفورز پرایمر OPB-05
	
درخت مربوط به پرایمر OPB-07	ژل الکتروفورز پرایمر OPB-07
	
درخت مربوط به پرایمر OPA-08	ژل الکتروفورز پرایمر OPA-08

www.SID.ir

Archive of SID

	
درخت مربوط به پرایمر OPA-13	ژل الکتروفورز پرایمر OPA-13
	
درخت مربوط به پرایمر OPB-20	ژل الکتروفورز پرایمر OPB-20

شکل ۴- تصاویر مربوط به الکتروفورز محصولات PCR مربوط به هر پرایمر بر روی ژل ۱٪ آگارز (ستون ۱) و درخت مربوط به هر پرایمر (ستون ۲)



شکل ۵- تصویر درخت مربوط به اطلاعات تمامی ژل‌های حاصل از RAPD-PCR

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

باکتری‌های اسید لاکتیک حاوی متابولیت‌هایی هستند که دارای خاصیت ضد میکروبی علیه بعضی از باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌باشد. به‌طور کلی در بین انواع باکتری‌های اسیدلاکتیک، *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس* و *استرپتوکوکوس* اهمیت بیشتری نسبت به دیگر اعضای این گروه دارند و مطالعات زیادی بر روی این باکتری‌ها از نظر پتانسیل پروبیوتیکی، تولید مواد ضد میکروبی و امکان استفاده آن‌ها به‌عنوان نگهدارنده غذایی انجام شده است. با توجه به گسترش فزاینده‌ی محصولات لبنی صنعتی به جای محصولات سنتی امکان از دست دادن بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک وجود دارد، بنابراین با توجه به اهمیت *لاکتوباسیلوس‌ها* در سلامت انسان جداسازی، شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها از منابع سنتی و به کارگیری نتایج در تولید محصولات لبنی امری ضروری به نظر می‌رسد. جداسازی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* موجود در شیر از اهمیت زیادی برخوردار است به همین دلیل تحقیقات زیادی در این زمینه در داخل و خارج از کشور انجام شده است (۳۴).

امروزه استفاده از روش‌های فنوتیپی و تست‌های بیوشیمیایی در شناسایی *لاکتوباسیلوس‌ها* بسیار رایج است (۳۵). ولی آنچه مسلم است این تست‌ها دارای محدودیت-هایی هستند و گاه در بین تعداد زیادی جدایه، خصوصیات فیزیولوژیکی مشابه‌ای دیده می‌شود. به علاوه نتایج این روش‌ها همیشه دقیق نیست (۳۶).

با پیشرفت‌های صورت گرفته در سطح مولکولی، تکنیک‌های ژنوتیپی زیادی به عنوان ابزاری برای شناسایی گونه‌ها و بررسی ژنوتیپی بکار می‌رود. در مقایسه با روش-های فنوتیپی، مزیت عمده این روش‌ها قدرت تفکیک بالا و تکرارپذیری آنهاست و امروزه کاربرد زیادی دارند. امروزه پروفایل RAPD به عنوان یک ابزار فیلوژنتیکی و تاکسونومی معتبر مورد قبول همگان است.

در تحقیق حاضر به منظور بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* جدا شده از شیر گاو در شهرستان نرماشیر از روش مولکولی RAPD-PCR استفاده گردید. از این روش در مطالعات مختلف برای بررسی تنوع ژنتیکی میکروارگانیسم‌های موجود در مواد غذایی بخصوص *لاکتوباسیلوس‌ها* استفاده شده است.

برای مطالعه و شناسایی *لاکتوباسیلوس‌های* جداسازی شده از پنیر لیقوان در سال ۱۳۸۸ از دو روش DGGE و RAPD-PCR استفاده شده است. نتایج این مطالعه نشان داد روش RAPD-PCR به دلیل فراهم کردن داده‌های کمی برای جمعیت باکتریایی مختلف نسبت به روش دیگر که تنها قادر به فراهم آوردن داده-هایی نیمه کمی بود، ارجحیت دارد (۲۷).

مختاری زنوزی و همکاران در تحقیقی به بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* با پتانسیل پروبیوتیکی جدا شده از محصولات لبنی سنتی آذربایجان توسط RAPD-PCR می‌پردازند (۲۶). همچنین در سال ۱۳۹۰، تفویضی و همکاران تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌های* جداشده از محصولات لبنی سنتی را با RAPD-PCR بررسی کردند. از ۲۰ پرایمر استفاده شده در تحقیق آنها تعداد ۱۹ پرایمر باندهای قابل کدگذاری داشتند. ۲۱۹ باند از ۲۲۵ باند ایجاد شده پلی‌مورف و ۶۳ باند اختصاصی بودند (۱۳). حجازی و همکاران نیز، تنوع ژنتیکی باکتری‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی جدا شده از فلور طبیعی ماست و پنیر سنتی مناطق هریس و سراب را با روش RAPD-PCR بررسی کردند (۳۰).

وون و همکاران نیز ارتباط ژنتیکی شش سوش *لاکتوباسیلوس* و پنج جدایه جدا شده از شیر تخمیر شده با کمک RAPD-PCR مشخص نمودند. ۴۲ پرایمر در تحقیق مورد استفاده قرار گرفت و نتایج با نرم‌افزار NTSYS ارزیابی شد. تمام *لاکتوباسیلوس‌ها* در سه گروه مجزا قرار گرفتند (۳۸).

در سال ۲۰۰۶ تنوع ژنتیکی و فعالیت ۲۴۸ سویه غالب *لاکتوباسیلوس* دخیل در پردازش پنیر سنتی مانچگو مورد بررسی قرار گرفت. از میان این جدایه‌ها، با استفاده از RAPD-PCR، تنوع ژنتیکی ۱۹۷ جدایه مشخص شد. ۵۱ جدایه قابل تجزیه نبوده و در نتیجه ژنوتیپ آن‌ها مشخص نشد (۳۹). در تحقیق مشابهی که توسط آبریول[1]

[1] Abriouel

www.SID.ir

Archive of SID

در سال ۲۰۰۸، بر روی تنوع میکروبی موجود در پنیرهای آلبرکیلا[1] انجام گرفت، از روش RAPD-PCR استفاده شد. ۲۰۶ جدایه جداسازی شد که با گروه‌بندی توسط RAPD-PCR در ۵۲ گونه قرار گرفتند و آنالیز پروفایل RAPD، الگوی بسیار متفاوتی را در بین جدایه‌ها نشان داد (۴۰).

در سال ۲۰۱۱ تنوع و ویژگی‌های عملکردی گروه *لاکتوباسیلوس پلانتاریوم*[2] در سویه‌های جدا شده از پنیر ایتالیایی بررسی شد. ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی سویه‌ها به طور قابل‌توجهی متفاوت بود که نشان‌دهنده‌ی تنوع زیستی فنوتیپ‌ها بود. آزمایشات تعیین ژنوتیپ با استفاده از RAPD-PCR و با پرایمر M13 انجام شد که باز هم هتروژنیتی قابل‌توجهی را میان سویه‌ها نشان داد (۲۹).

نتایج تحقیق حاضر و دیگر مطالعات نشان داد که روش مولکولی RAPD-PCR مناسب‌تر و دقیق‌تر از روش‌های بیوشیمیایی و یک روش مولکولی مناسب جهت تعیین ژنوتیپ می‌باشد (۲۰).

در تحقیق حاضر پنج پرایمر RAPD جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، سنتز گردید و سپس اطلاعات حاصل از واکنش با آنها توسط نرم‌افزار Phylen آنالیز و درخت تک تک پرایمرها و درخت نهایی رسم گردید. تجزیه و تفسیر درخت نهایی حاصل شده جدایه‌های این تحقیق را در هفت گروه مجزا دسته‌بندی کرد. در تحقیق آبریول و همکاران، ۲۰۶ جدایه جداسازی شده با گروه‌بندی توسط RAPD-PCR در ۵۲ گونه قرار گرفتند (۴۰). شش سوش *لاکتوباسیلوس* و پنج جدایه جدا شده از شیر تخمیر شده با استفاده از ۴۲ پرایمر در تحقیق وون و همکاران نیز در سه گروه مجزا قرار گرفتند (۳۸). در تحقیق تفویضی و همکاران نیز ۲۰ جدایه باکتریایی با استفاده از ۲۰ پرایمر و به روش UPGMA در ۲ گروه اصلی قرار گرفتند (۱۳). در مقایسه با دیگرتحقیق‌ها قرار گرفتن ۱۰ جدایه این تحقیق در ۷ گروه بیانگر تنوع بالای *لاکتوباسیلوس*‌های موجود در شیر این منطقه نسبت به محصولات لبنی دیگر مناطق است.

تمامی پرایمرهای این تحقیق پلی‌مورفیسم بالایی را نشان دادند و بر همین اساس نتایج حاصل از PCR با این پرایمرها توانستند ۱۰ جدایه را در ۷ گروه مجزا قرار دهند. در تحقیق تفویضی و همکاران نیز این پرایمرها جزو پرایمرهای با پلی‌مورفیسم بالا بودند و باندهای قابل کد-گذاری داشتند (۱۳). این مطلب نشان‌دهنده کارایی بالای چنین پرایمرهایی در جداسازی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* است.

در برخی از تحقیق‌ها علی‌رغم استفاده از تعداد زیاد پرایمر، تنوع ژنتیکی کم بین جدایه‌های مورد بررسی، دیده می‌شود. چنین نتیجه‌ای می‌تواند هم ناشی از شباهت بین جدایه‌ها و هم ناشی از انتخاب پرایمرهای نادرست باشد. از جمله می‌توان به کار وون و همکاران (۳۸) اشاره کردکه ۱۱ جدایه با استفاده از ۴۲ پرایمر فقط در ۳ گروه قرار گرفتند.

همچنین در نتایج بدست آمده از RAPD-PCR تحقیق حاضر، تعداد ۱۵۵ باند از ۵ پرایمر شناسایی شد که از این بین ۲۶ باند در همه جدایه‌ها مشترک و ۱۲۹ باند پلی‌مورف بودند. تعداد بالای باندهای پلی‌مورف در تحقیق حاضر هم بیانگر تنوع ژنتیکی بالا بین جدایه‌های موجود در شیر این منطقه است و هم نشانگر انتخاب درست پرایمرها می‌باشد.

لذا با توجه به اهمیت انتخاب پرایمر مناسب و با توجه به نتایج بدست آمده در این تحقیق و پلی‌مورفیسم بالای پرایمرها می‌توان پرایمر بکار برده شده را جهت استفاده در مطالعات مشابه توصیه کرد.

در نتایج حاصل از بررسی درخت نهایی، جدایه‌های K3 و K4 در گروه ۱ و جدایه‌های K11، K13 و K21 در گروه ۴ قرار گرفتند. از آنجایی که جدایه‌های K3 و K4 از یک ناحیه و جدایه‌های K13 و K21 نیز از یک ناحیه جمع‌آوری شده‌اند قرار گرفتن آنها در یک گروه منطقی به نظر می‌رسد. همچنین جدایه K11 در برخی خصوصیات فنوتیپی مشابه به جدایه K13 می‌باشد لذا قرارگیری آن نیز در گروه چهارم توجیه‌پذیر است.

[1] Alberquilla
[2] *Lactobacillus plantarum*

www.SID.ir

Archive of SID

جدایه‌های K23 و K9 به ترتیب در گروه‌های ۲ و ۳ قرار گرفتند. با توجه به اینکه این جدایه‌ها در یکسری از خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی مانند رنگ کلنی و همولیز مشابه و در دیگر خصوصیات متفاوت هستند، قرار گرفتن آنها در گروه‌های جدا ولی نزدیک به هم منطقی است. جدایه‌های K10، K6 و K1 نیز به ترتیب در گروه‌های ۵، ۶ و ۷ قرار گرفتند. جدایه‌های K6 و K1 در خصوصیاتی مانند همولیز و تخمیر قند رفتار مشابه نشان داده بودند لذا قرارگیری آنها نیز در گروه‌های مجزا و نزدیک به هم قابل توجیه است.

نتیجه‌گیری

جمع‌آوری مشخصات سویه‌های بومی هر ناحیه از کشور می‌تواند علاوه بر حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی، اطلاعات مفید برای استفاده‌های علمی ارائه نماید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که مارکر RAPD در شناسایی و غربالگری اولیه نمونه‌ها و بررسی تنوع ژنتیکی *لاکتوباسیلوس‌ها*، یک مارکر قوی، موثر، سریع و ارزان است و پیچیدگی‌های کمتری نسبت به دیگر روش‌ها دارد. همچنین نتایج بدست آمده بیانگر تنوع ژنتیکی بالای جدایه‌های بومی شهرستان نرماشیر می‌باشد.

References

1-Guandalini S, Pensabene S, Abu M, Gobio L. *Lactobacillus* GG Administered in Oral Rehydration Solution to Children with Acute Diarrhea: A Multicenter European Trial. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 2000;30(1):54-60.

2-Bazarcheh Shabestari N, Hajirezaei M. Molecular identification of lactobacilli isolated from traditional cheeses of Bandar Abbas city. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2020;10(39): 79-90. [In persian]

3-Moreno MF, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. International journal of food microbeology. 2006;106(1):1-24.

4-Klewicki R, Klewicka E. Antagonistic activity of lactic acid bacteria as probiotics against selected bacteria of the *Enterobaceriacae* family in the presence of polyols and their galactosyl derivatives. Biotechnology letters. 2004;*26*(4): 317-320.

5-Reid A, Rawls JF, Pierce NE. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2013;110(9): 3229-3236.

6-Sanders ME, Klaenhammer TR. Invited Review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. Journal of dairy science. 2001; 84(2):319-33.

7-Torres-Llanez MJ, Vallejo-Cordoba B, Diaz-cinco ME, Mazorra-Manzano MA, Gonzalez-Cordova AF. Characterization of the natural microflora of artisanal Mexican Fresco cheese. Food Control. 2006; 17:683-690.

8-Soleymani Fard F, Ghobadi Dana M, Piravi Vanak Z. Screening local *Lactobacilli* from Iran in terms of production of lactic acid and identification of superior strains. Biological Journal of Microorganisms. 2015;15:155-166. [In Persian]

9-Roy D, Ward P, Vincent D, Mondou F. Molecular identification of potentially probiotic *lactobacilli*. Current microbiology. 2000;40(1):40-46.

10-Visintin S, Alessandria V, Valente A, Dolci P, Cocolin L. Molecular identifi-

www.SID.ir

Archive of SID

sh-Va-Sazandegi. 2001;14(1):36-44. [In Persian]

17-Dashti H, Naghavi MR, Shah Nejat Boshehri AL, Shirani H. Evaluation of genetic diversity of wheat germplasm using markers RAPD. Modern genetic journal. 2009;4(3):55-62. [In Persian]

18-Behnam B, Bahman Yazdi S, Abd mM-ishani S, Talei AR, Shah Nejat Boshehri AL. Apllication of the Random Amplified Polymorphic (RAPD) technique as a DNA marker for detection of polymerphism among Italian durum wheat cultivars. Oolom zeraei Iran. 2000;2(2):29-34. [In Persian]

19-Hajirezaei M, Baghizade A, Javadi GH, Sadeghizadeh M. Genetic diversity assessment of a few numbers of pistachio cultivars in Kerman province based on RAPD markers. Iranian journal of boilogy. 2008;22(3):462-469. [In Persian]

20-Zamani ZA, Sarkhosh A, Fatahi Moghadam MR, Ebadi A. Evaluation of genetic diversity among a number of pomegranate genotypes using RAPD markers. Iranian Journal of Agricultural Sciences. 2006;37(5):865-873. [In Persian]

21-Sheini Mehrabzadeh R, Khosravi A, Hashemi A, Jamali H. Investigation of genetic diversity of *Mycobacterium fortuitum* clinical isolated by RAPD-PCR. Journal of Microbial World. 2014;6(4):281-289. [In Persian]

22-Siavoshi F, Shokouhfard M, Malekzadeh R, Dinparast Jadid N, Massarrat S, Emrani A. Genotype Variation in *H. Pylori* Isolates from Iranian Patients by RAPD-PCR. Govaresh. 2004;9(1):7-11. [In Persian]

cation and physiological characterization of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria isolated from heap and box cocoa bean fermentations in West Africa. International journal of food microbiology. 2016;216:69-78.

11-Anderson AC, Sanunu M, Schneider C, Clad A, Karygianni L, Hellwig E, Al-Ahmad A. Rapid species-level identification of vaginal and oral *lactobacilli* using MALDI-TOF MS analysis and 16S rDNA sequencing. BMC microbiology. 2014;14(1):312.

12-Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. *Lactobacilli* and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. Journal of pediatric gastroenterology and nutrition. 2014; 59(1):78.

13-Tafvizi F, Tajabadi ebrahimi M, Heydari Nasrabadi M, Bahrami H. Detection of genetic diversity of *lactobacillus* species isolated from different traditional dairy products by RAPD markers. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2011;1(3):33-42. [In Persian]

14-Hedaiati Marzoni H, Samiezadeh lahiji-Genetic HA. Diversity Assessment of Lines and Varieties in Winter Rapeseed (Brassica napus L.) using RAPD and SSR Molecular Markers. Journal of Crop Breeding. 2016;8(17):139-131. [In Persian]

15-Safari S, mehrabi AA. Genetic Relationships of Rapeseed Cultivars Revealed by RAPD Markers. Journal of Crop Breeding. 2017;8(19):177-170. [In Persian]

16-Asadi F, Naderi Shahab MA, Mirzaii nadoshen H. Genetic diversity of poplar clones using random amplification polymorphism DNA (RAPD PCR). Pajouhe-

www.SID.ir

Archive of SID

23-Baghbani-arani F, Tajbakhsh M, Hashemi SA, Rajai B, Siadat SD, Aghasadeghi MM, Sadat SM. Molecular Typing of *Salmonella* Paratyphi B and Salmonella paratyphi C Isolatedfrom Clinical Samples in Iran. Journal of Fasa University of Medical Sciences. 2012;1:19-25. [In Persian]

24-Asadi H, Yari R, Zargar M. Genetic Variation of *Escherichia coli* Bacteria Isolatedfrom Urinary Tract Infections Using RAPD-PCR. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2016; 26(134):114-123. [In Persian]

25-González-Rey C, Belin AM, Jörbeck H, Norman M, Krovacek K, Henriques B, Källenius G, Svenson SB. RAPD-PCR and PFGE as tools in the investigation of an outbreak of beta-haemolytic *Streptococcus* group A in a Swedish hospital. Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 2003;26(1):25-35.

26-Mokhtazi Zenozi P, Hejazi MA, Lotfi H, Eslami. 2011. Using RAPD-PCR technique to study the genetic diversity of *lactobacilli* with probiotic potential. 20th International Congress on Food Technology, 25 July. Tehran. Iran. 86. [In Persian]

27-Kafili T, Razavi S, Imam Juma Z, Salehi Jozani Gh, Naqavi M. Comparison of Molecular Methods of RAPD-PCR and DGGE-PCR in Identifying Isolated *Lactobacillus* during Liquvan Cheese Ripe, Iranian Journal of Biosystem Engineering. 2009;(40)1:87-91. [In Persian]

28-Sanders M. Considerations for Use of Probiotic Bacteria to Modulate Human Health. The Journal of Nutrition. 2000; 130(2):384-390.

29-Pisano MB, Patrignani F, Cosentino S, Guerzoni ME, Franz CM, Holzapfel WH. Diversity and functional properties of *Lactobacillus plantarum*-group strains isolated from Italian cheese products. Dairy Science & Technology. 2011;91(1):65-76.

30-Hejazi MA, Lotfi H, Zanjani B, Maleki Barzegari A. Isolation, biochemical and molecular identification of bacteria with probiotic potential from traditional dairy products in Harris and Sarab regions. Journal of Food Research. 2010;1(3):1-19. [In Persian]

31-Hasani M, Farajniya S, Hesari J, Mosavi. 2008. Isolation and identification useful practical properties two species *Lactobacillus* from traditional Lighvan cheese. 18 the International congress food science and technology. 15 October. Mashhad. Iran. 108. [In Persian]

32-Ahamdi SM, Khamiri M, Khosroshahi A, Kashani Negad M. Isolation and identification of Lacic acid bacteria from Lighvan cheeses. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources. 2008;3(16): 80-91.

33-Pourahmad R, Assadi MM. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. International journal of dairy technology. 2007;60:259-262.

34-Ehsani A, Mahmoodi R, Hashemi M, Raeisi M. Isolation and identification of *lactobacillus* in traditional cheeses of West Azarbaijan province. Iranian Journal of Medical Microbiology. 2014;9:38-43. [In Persian]

35-Swearingen PA, O'sullivan DJ, Warthesen JJ. Isolation, characterization, and influence of native, nonstarter lactic acid

www.SID.ir

Archive of SID

bacteria on Cheddar cheese quality. Journal of Dairy Science. 2001;84(1):50-9.

36-Ghobadi Dana M, Hatef Soleimanian A, Yakhchali B. Isolation and molecular identification of *lactobacilli* in some native dairy products. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology. 2012;2:99-116. [In Persian]

37-Rivas B, Marcobal A, Munoz R. Development of a multilocus sequence typing method for analysis of *Lactobacillus plantarum* strains. Microbiology. 2006;152: 85-93.

38-Woon PY, Tateno M. Osoegawa KBacterial artificial chromosome libraries for mouse sequencing and functional analysis. Genome Research. 2000;52(120): 126-139.

39-Sánchez I, Sesena S, Poveda JM, Cabezas L, Palop L. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. International journal of food microbiology. 2006; 107(3):265-273.

40-Abriouel H, Martin A, Maqueda M, Valdivia E. Biodiversity of the microbial community in a Spanish farmhouse cheese as revealed by culture-dependent and culture-independent methods. International Journal of Food Microbiology. 2008; 127(3):200-208.

www.SID.ir

Archive of SID

Vol.1/No.1/Summer 2021 https://www.qafj.iauk.ac.ir

Investigation of Genetic Diversity of *Lactobacilli* Isolated From Cow Milk Samples by RAPD-PCR

Hakime GhaleKhani[1], Masoumeh Hajirezaei[*2], Artadokht Tavakoli[2]

1-M.S, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

2-Assistant Professor, Department of Microbiology, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

* Corresponding Author: ma.hajirezaei@gmail.com

Received: 27/4/2021, Accepted: 11/5/2021

Abstract

The use of lactobacilli in the production of fermented foods has several thousand years old due to their ability to make the desired changes in the taste and texture of the food, as well as their importance in the human health. Different dairy products can be a source of new strains of *Lactobacillus*. Therefore, molecular identification and their genetic variation can be an effective step in identifying native lactobacilli reserves with specific functional characteristics and applying them to industrial dairy products. The purpose of this study is to isolate lactobacilli from flora in cow's milk of Narmeshir city and study their genetic diversity. For this purpose, 21 milk samples were collected from different regions of the city, and Lactobacilli were isolated by the conventional phenotypic and biochemical methods. In order to screen and investigate the genetic diversity of isolated lactobacilli, five RAPD primers were randomly selected. After doing PCR, the analyses of genetic and phylogenetic diversity were performed using Pyelph software and phylogeny trees were drawn. Cluster analysis of molecular data was able to divide the isolates into seven distinct groups at a genetic distance of 10. K3 and K4 isolates were in group 1 and isolates K21, K13, and K11were in group 4. The remaining isolates were placed in separate groups. Since K3 and K4 isolates were from a region and K21 and K13 isolates were also collected from a region, their placement seems to be logical in a group.

Keywords: *Lactobacilli*, Genetic Diversity, RAPD-PCR, Phylogeny Tree

www.SID.ir