Archive of SID



مجله علمی- پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان ۱۳۸۹، دوره دوم، شماره پنجم، صفحه ۲۸-۲۱

# جداسازی و شناسایی مولکولی باکتری های اسید لاکتیک شیرهای خام ارتفاعات البرز مرکزی با استفاده از High Resolution Melting Real Time PCR و 16S rDNA PCR Sequencing

فریدون فرقانی[۱]، علی ناظمی[۲]، شهرآشوب شریفی[۲]، محمد اسکندری[۲]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن، باشگاه پژوهشگران جوان
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن ،گروه ژنتیک

نویسنده مسؤول: دکتر علی ناظمی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، گروه ژنتیک. alinazemy@yahoo.com

دریافت:۸۹/۱/۲۵ پذیرش: ۸۹/۴/۱۸

## چکیده

**زمینه و هدف:** اهمیت باکتری های اسید لاکتیک(LAB) بر هیچ کس پوشیده نیست. LAB بزرگترین گروه تشکیل دهنده پروبیوتیک ها بوده و کاربردهای فراوانی در صنعت و سلامت دارند. هدف از انجام این پژوهش شناسایی LAB شیرهای خام ارتفاعات بکر البرز و معرفی گونه های بومی مناسب جهت استفاده صنعتی به عنوان جایگزین سویه های وارداتی بوده است. همچنین بررسی تنوع LAB موجود، نگهداری LAB بومی در یک بانک میکروبی و بررسی وجود گونه های جدید از اهداف دیگر پژوهش بوده اند.

**روش بررسی:** نمونه های منتخب شیر خام از ۱٤ نقطه ارتفاعات البرز تهیه، با رعایت شرایط استاندارد به آزمایشگاه منتقل و کلنی های LAB با استفاده از محیط های اختصاصی، مشاهدات ماکروسکوپی و میکروسکوپی و تست های افتراقی جدا شدند. ٦٤ DNA ایزوله بدست آمده استخراج شده و با انجامHigh Resolution Melting Real Time PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی 16S rDNA گروه بندی شدند. در نهایت نمونه های منتخب هر گروه با انجام PCR مجدد برای تعیین توالی ارسال شدند. نتایج بدست آمده از تعیین توالی با توالی های موجود در بانک میکروبی NCBI مقایسه شده، ٦ جنس، ۹ گونه و ۲ گونه جدید احتمالی شناسایی شدند.

**یافته ها:** باکتری های *Streptococcus vestibularis* ، *Enterococcus faecalis* ، *Lactococcus lactis* ، *Streptococcus infantarius*، *Leuconostoc argentinum* ، *Lactobacillus brevis* ، *Pediococcus pentosaceus* ، *Lactobacillus rhamnosus* ، *Lactobacillus plantarum* و دوباکتری از جنس های *Pediococcus* و*Enterococcus* بر اساس آنالیز 16SrDNA شناسایی شدند.

**نتیجه‌گیری :** نتایج حاصل نشان می دهد تنوع ارزشمندی از LAB در شیرهای خام البرز مرکزی وجود دارد. تقریبا همه یافته ها کاربرد صنعتی داشته و می توانند جایگزین سویه های وارداتی شوند. همچنین بر اساس آنالیز 16S rDNA احتمال وجود دو گونه جدید وجود دارد. نکته مهم اینکه با استفاده از High Resolution Melting Real Time PCR امکان کاهش فوق العاده زمان و هزینه پژوهش ایجاد شد که نشان از اهمیت به کارگیری تکنیک های مولکولی در میکروب شناسی و تلفیق آنها با تکنیک های کلاسیک دارد.

**واژه‌های کلیدی:** جداسازی، شناسایی مولکولی، باکتری های اسید لاکتیک، شیرهای خام، البرز مرکزی



www.SID.ir

Archive of SID



## مقدمه

باکتری های اسید لاکتیک (*Lactic Acid Bacteria*) گروه هتروژنی از باکتری های گرم مثبت هستند که بر اساس مجموعه ای از ویژگی های مورفولوژیک، متابولیک و فیزیولوژیک در یک گروه بسیار بزرگ قرار گرفته اند (۱). گرچه هسته مرکزی این گروه بسیار بزرگ را به طور سنتی جنس های *Pediococcus Leuconostoc, Lactococcus* و *Lactobacillus* تشکیل می دهند اما به مرور جنس های دیگری به این گروه اضافه شدند (۲) تا جایی که امروز LAB حدود ۲۰ جنس را در بر می گیرد (۳). LAB باکتری های کروی یا میله ای میکروآئروفیل با GC% پایین هستند (به استثنای بیفیدوباکتریا) که اسید لاکتیک مهمترین محصول آنها از تخمیر کربوهیدرات ها محسوب می شود (۴). دیواره این باکتری ها دارای یک پپتیدوگلایکان ضخیم چندلایه است که همراه با پروتئین ها، تایکوئیک اسید و پلی ساکاریدهای مختلف آرایش پیدا کرده است(۵).

تولید فراورده های پروبیوتیک بدون شک یکی از مهمترین کاربردهای LAB است که بزرگترین گروه باکتری موجود در این نوع محصولات را تشکیل می دهند(۱). تولید Poly Lactic Acid ، غذاهای تخمیری، افزودنی ها، نوشیدنی های تخمیری، اگزوپلی ساکارید، باکتریوسین، اسید لاکتیک میکروبی، استخراج مواد و افزایش کیفیت نگهداری و ماندگاری محصولات غذایی تنها بخشی از کاربردهای مهم LAB هستند که همه و همه این باکتری های پر نیاز را به عنوان گروهی بسیار مهم در میکروبیولوژی صنعتی و پزشکی مطرح می کنند (۶).

LAB را می توان از گستره وسیعی از منابع جدا کرد. انواع دانه‌ها، گیاهان سبز، سبزیجات تخمیری، سطوح مخاطی انسان و حیوان، فرآورده‌های گوشتی، تولیدات لبنی، اسفنج‌های دریایی، صدف‌ها، انواع ماهی و خاک منابعی هستند که بسته به نوع تحقیق می‌توانند برای جستجوی این باکتری‌ها مناسب باشند (۷). به دلیل اهمیت فوق العاده این گروه، یافتن باکتری های جدید مناسب قرار گرفتن در آن از منابع جدید و بکر از اهمیت بالایی برخوردار است. البته با ظهور و ارتقا روش های مولکولی این کار سرعت و دقت بیشتری پیدا کرده تا جایی که امروزه امکان شناسایی یک LAB ناشناخته در یک روز کاری وجود دارد(۸).

در حالی که کشورهای پیشرفته حدود یک قرن است به طور جدی به کشف و شناسایی گونه های جدید LAB جهت استفاده صنعتی پرداخته اند و توانسته اند از این باکتری ها به طور وسیعی در صنعت بهره ببرند، در کشور ما تنها چند سالی است که این مساله مورد توجه قرار گرفته، که با توجه به ناشناخته بودن بسیاری از زیست بوم ها، خصوصاً از نظر میکروبیولوژیک، نیازمند انجام تحقیقات اصولی است تا بتوان در اولین گام بانک های میکروبی قابل قبولی از LAB مناطق بکر ایران ایجاد کرده و در مراحل بعد با بررسی ویژگی های یافته ها، رو به سوی استفاده صنعتی از آنها حرکت کرد.

استفاده از LAB در تولید فرآورده های لبنی در آسیا سابقه ای چند هزار ساله دارد. اما شاید بتوان Metchnikoff را به عنوان پایه گذار توجه علمی به LAB و در کنار آن پروبیوتیک ها معرفی کرد(۹). در قرن اخیر تحقیق در زمینه LAB در کشورهای پیشرفته به سرعت توسعه یافته تا جایی که امروزه هر سال میلیون ها دلار درآمد نصیب این کشورها می کند. سودآوری این تحقیقات و نیاز تمامی کشورها به این باکتری ها سبب شده است تا کشورهای در حال توسعه نیز تلاش های جدی جهت شناسایی LAB بومی را از مدت ها پیش آغاز کنند. Savadogo و همکاران در نیجریه (۱۰)، Singh و همکاران در هند(۱۱) ، Tan و همکاران در مالزی(۱۲) و مادوروبا و همکاران در آفریقای جنوبی(۱۳) و بسیاری دانشمندان دیگر در سال های اخیر به دنبال یافتن LAB بومی با کاربردهای گوناگون بوده اند. در کشورمان نیز پژوهش هایی انجام گرفته است که از آن جمله می توان به پژوهش های آزادنیا و همکاران(۱۴) و تاج آبادی و همکاران(۱۵) اشاره کرد.

ایران، کشوری گسترده، با تنوع آب و هوایی زیاد و اکوسیستم های گوناگون است که از مجموع ۱۴ تنوع آب و هوایی دنیا دارای ۱۱ تنوع می باشد(۱۶). یکی از مهم ترین این اقلیم ها البرز مرکزی محسوب می شود که در مساحتی با طول حدود ۳۰۰ وعرض تا ۹۰ کیلومتر، اکوسیستم های خاص خود را ایجاد کرده است و به همین دلیل می تواند بستری مناسب برای بررسی تنوع زیستی، خصوصا در سطح میکروبی باشد. شرایط زیستی منحصر به فرد، تنوع، گستردگی و از همه مهمتر بکر بودن این مناطق و عدم وجود سابقه بررسی های مشابه، بر لزوم انجام پژوهش های بیشتر برای یافتن باکتری های دارای پتانسیل صنعتی و همچنین



www.SID.ir

Archive of SID


باکتری های جدید در این مناطق تاکید دارد. هدف از انجام این پژوهش بررسی شیر های خام ارتفاعات بکر البرز مرکزی از نظر وجود LAB دستیابی به ایزوله های جدیدو نگهداری یافته ها در غالب یک بانک میکروبی از LAB بومی برای تحقیقات آینده است. همچنین گونه های دارای پتانسیل صنعتی که می توانند جایگزینی مناسب برای باکتری های تجاری وارداتی باشند شناسایی می شوند.

## روش بررسی

**جمع آوری نمونه ها:** نمونه های شیر خام از دام های سنتی۱۴ منطقه منتخب ارتفاعات البرز مرکزی با شرایط استریل تهیه و در دمای ۴ درجه سانتیگراد به آزمایشگاه منتقل شدند(۱۵). انتخاب مناطق نمونه گیری اتفاقی نبوده و دقت شد توزیع مناسبی در طول حدود ۳۰۰ کیلومتری البرز و دامنه های جنوبی و شمالی وجود داشته باشد. همچنین تلاش شد تا حد امکان نمونه ها از مناطق بکر و دارای کمترین آلودگی انسانی و از دام های سنتی تهیه شوند.

**غنی سازی:** همه نمونه ها بلافاصله پس از انتقال به آزمایشگاه ورتکس شده، به طور مجزا در محیط های MRS broth (Merck) و M17 broth (Merck) تلقیح شدند. به این صورت که ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه در ۹۰میلی لیتر محیط آماده تلقیح شده و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در انکوباتور CO2 حاوی ٪ ۱۰ CO2 قرار گرفت(۸). پس از غنی سازی هر نمونه شیر خام، رقت های $10^{-1}$ تا $10^{-8}$ از هر ارلن در بافر سالین نرمال تهیه شده و مقدار ۲۵۰ میکرولیتر از رقت $10^{-4}$ تا $10^{-8}$ در پلیت MRS broth و رقت $10^{-5}$ تا $10^{-8}$در پلیت M17 broth تلقیح شد. پس از انجام کشت سفره ای پلیت ها برای مدت ۴۸ ساعت در جار بی هوازی حاوی Anaerocult C (Merck) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

**جداسازی:** پس از پایان زمان انکوباسیون، پلیت ها از جار خارج شده و بر اساس مشاهدات مورفولوژیک، کلنی های غیر مشابه مورد رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز قرار گرفتند که در این مرحله از بین ۱۶۴ کلنی مورد آزمون های فوق۶۴ کلنی میله ای و کروی از دو محیط M17 و MRS تایید شده(گرم مثبت، کاتالاز منفی) و به صورت کلنی تک در پلیت های جدید کشت خطی داده شدند (۸). انجام کشت خطی از کلنی های مجزا سه بار تکرار شد. انجام این کار در بررسی LAB جهت افزایش خلوص و همچنین فعال شدن ایزوله ها ضروری است.

**استخراج DNA**: استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Cinnagen) انجام شد. آزمون کیفی روی همه DNA های استخراجی با استفاده از دستگاه بیوفتومتر انجام شد.

**High Resolution Melting-Real Time PCR**:
نمونه های DNA همه ۶۴ ایزوله برای انجام HRM-Real Time PCR آماده شدند. ۱۰۰ng از هر نمونه DNA با ۵ میکرولیتر 10Xbuffer، ۱/۵ میلی مولار MgCl2 ، ۰/۲ میلی مولار dNTPs ، ۱۰ پیکومول هر یک از Primers، ۲/۵ واحد آنزیم Taq، و ۱۰ میکرومول SYTO-9 در حجم کلی ۵۰ میکرولیتر با استفاده از دستگاه Real Time PCR ( Corbett 6000) مورد HRM-Real Time PCR قرار گرفت. پرایمرهای مورد استفاده پرایمرهای یونیورسال 16S rDNA بودند(۱۷).

Forward universal primer:
AACTGGAGGAAGGTGGGGAT
Reverse universal primer:
AGGAGGTGATCCAACCGCA

پس از آنالیز HRM نمونه های منتخب هر گروه برای انجام PCR برگزیده شدند. نمونه S1 از گروه A، نمونه S4 از گروه B، نمونه S8 از گروه C، نمونه S11 از گروه D، نمونه S19 از گروه E، نمونه S20 از گروه F، نمونه S29 از گروه G، نمونه S51 از گروه H و نمونه S40 از گروه I با انجام PCR مجدد برای توالی یابی ارسال شدند.

شرایط واکنش PCR شامل دناتوراسیون اولیه °C ۹۵ به مدت ۴ دقیقه و سپس ۳۵ دور شامل °C ۹۵ به مدت ۴۰ ثانیه، °C۵۶ به مدت ۳۰ ثانیه و °C ۷۲ به مدت ۴۰ ثانیه همراه با جذب در کانال Green و گسترش نهایی در °C ۷۲ به مدت ۵ دقیقه انجام شد. HRM از°C ۹۰-۷۲ با شیفت حرارتی °C ۰/۱ در هر ثانیه انجام گرفت. همچنین ۵ میکرولیتر از محصول PCR به ژل آگارز ٪۲ منتقل شده و با انجام الکتروفورز و مشاهده باندهای bp ۳۷۰ صحت PCR تایید گردید.

**PCR-sequencing**: برای بدست آوردن محصول PCR دارای قابلیت انجام sequencing ، ۹ نمونه منتخب به عنوان شاخص گروه ها مورد PCR قرار گرفتند. صحت انجام PCR و عدم وجود آلودگی نیز با انجام الکتروفورز تایید شده و محصولات برای توالی یابی (Macrogen) ارسال شدند.


www.SID.ir

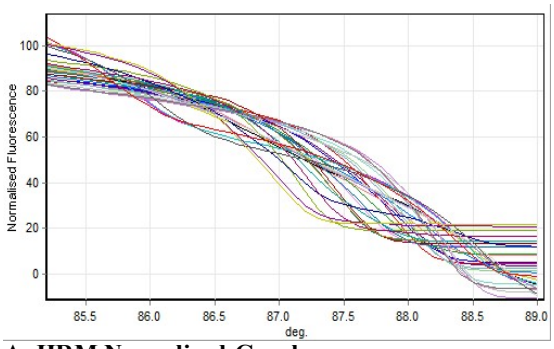
Archive of SID



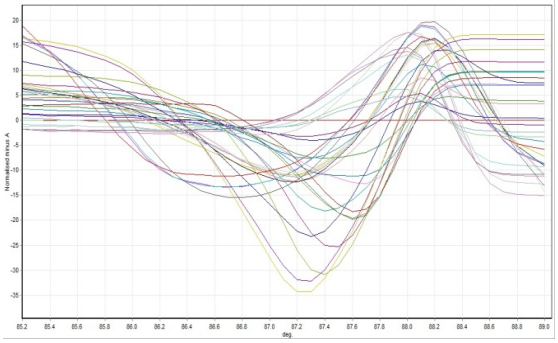
**Alignment توالیها:** با دریافت توالی های مورد نظر پس از انجام sequencing ، این توالی ها با استفاده از نرم افزار Blast در سایت www.ncbi.nlm.nih.gov مورد بررسی قرار گرفته و بر اساس اطلاعات موجود در بانک ژنی و نتایج بررسی های مورفولوژیک شناسایی ایزوله های باکتریایی موجود، در سطح جنس و گونه انجام شد.

## یافته ها

پس از بدست آمدن نمودار نرمال سازی شده (شکل ۱ – A) ، نمودار مورد بررسی قرار گرفته و با رسم نمودار افتراقی (شکل ۱ – B) و تفسیر آن با استفاده از هر یک از ایزوله ها به عنوان ژنوتیپ شاخص، ایزوله ها در گروه های مناسب قرار گرفتند(جدول ۱).



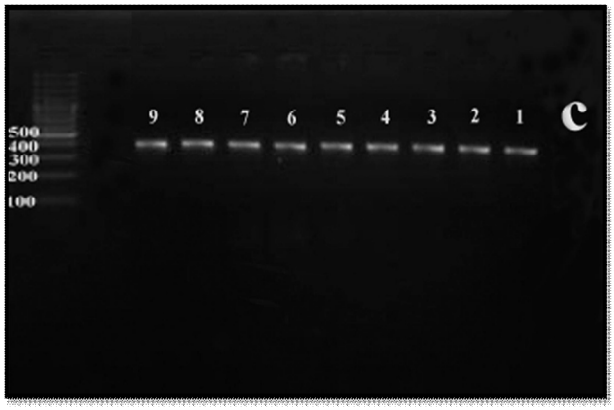

**A: HRM Normalized Graph**



**B: HRM Difference Graph**

**شکل ۱ . نمودارهای HRM برای گروه بندی نمونه ها**

بررسی پلی فازیک نمونه ها براساس مطالعات میکروسکوپی و انجام HRM-Real Time PCR ، ۹ گروه نهایی ایجاد کرد. صحت انجام گروهبندی و محصولات نهایی PCR در هر مرحله با استفاده از الکتروفورز نمونه ها تایید شد (شکل ۲).




**شکل ۲. تایید تکمیلی ۹ محصول نهایی PCR ، با مشاهده باندهای ۳۷۰bpروی ژل آگارز ۲٪**

توزیع جغرافیایی نمونه ها متنوع بوده و به جز یک نمونه سایر ایزوله ها در بیش از یک ناحیه جغرافیایی وجود داشتند (جدول ۱).

نمونه های گروه های B، C، D، E، F، G، و I با داشتن همولوژی ۹۷٪ تا ۱۰۰٪ با توالی های ثبت شده در بانک ژنی در حد گونه به شرح زیر شناسایی شدند:

گروه B: *Streptococcus vestibularis*
گروه C: *Enterococcus faecalis*
گروه D: *Lactococcus lactis*
گروه E: *Streptococcus Infantarius*
گروه F: $F^1$: *Leuconostoc argentinum*
$F^2$: *Lactobacillus brevis*
گروه G: $G^1$: *Pediococcus pentosaceus*
$G^2$: *Lactobacillus rhamnosus*
گروه I: *Lactobacillus plantarum*

نمونه S1A4 که به تنهایی در گروه A قرار داشت با داشتن همولوژی ۷۸٪ با *Pediococcus acidilactici* به عنوان جنس *Pediococcus* شناخته شد. همچنین نمونه های گروه I با داشتن ۸۱٪ همولوژی با *Enterococcus faecium* به عنوان جنس *Enterococcus* شناخته شدند.


www.SID.ir

Archive of SID



جدول ۱ - توزیع جغرافیایی و فراوانی نمونه های گروه بندی شده توسط HRM-Real Time PCR

S :نمونه ، A : منطقه جغرافیایی

| HRMگروه ها بر اساس آنالیز | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A | B | C | D | E | F | | G | | H | I |
| | | | | | $F^1$ | $F^2$ | $G^1$ | $G^2$ | | |
| S1A4 | S4A4<br>S3A4<br>S6A10<br>S9A12<br>S37A2<br>S13A8 | S8A12<br>S12A13 | S11A1<br>S61A12<br>S28A8<br>S16A6<br>S60A8 | S19A5<br>S21A5<br>S48A4<br>S59A4 | S20A5<br>S23A4<br>S24A4<br>S49A4 | S53A2<br>S57A4<br>S58A4<br>S25A4<br>S26A4 | S29A7<br>S5A11<br>S7A9<br>S10A1<br>S27A8<br>S30A7<br>S44A5<br>S43A5<br>S14A10<br>S32A6<br>S33A6<br>S35A1<br>S38A1<br>S31A6<br>S45A5<br>S46A5 | S36A1<br>S39A14<br>S63A9<br>S52A1<br>S64A10<br>S42A13<br>S54A1 | S51A4<br>S2A4<br>S15A5<br>S17A5<br>S22A5<br>S18A6<br>S47A4<br>S56A4<br>S55A3<br>S62A2<br>S66A11 | S40A14<br>S41A13<br>S65A10 |

## بحث

اهمیت باکتری های اسید لاکتیک در بحث صنعت و سلامت هر روز بیشتر می شود(۱۸). در این بین کشور ما یکی از وارد کننده های سویه های مختلف LAB و فرآورده های آنها طی سال های گذشته بوده است. هدف ما در این تحقیق شناسایی LAB شیرهای خام مناطق بکر ارتفاعات البرز بوده است تا بتوان با تهیه بانک میکروبی مناسبی از یافته ها، امکان بررسی های بیشتر و سرانجام دستیابی به باکتری های دارای قابلیت صنعتی مناسب در زمینه های مختلف را ایجاد کرد. در عین حال یافتن باکتری های جدید در سطح سویه و حتی گونه با توجه به اقلیم و پوشش گیاهی خاص مناطق نمونه گیری و همچنین عدم وجود سابقه تحقیقات دقیق و جامع از اهداف پژوهش بود.

سابقه ای از استفاده از روش پلی فازیک با استفاده از ترکیب روش های کلاسیک میکروبیولوژی و High Resolution Melting Real Time PCR برای شناسایی LAB به صورتی که در این تحقیق انجام گرفت یافت نشد.

انجام گروه بندی به وسیله HRM-Real Time PCR این امکان را ایجاد کرد تا هزینه انجام پژوهش و همچنین زمان مورد نیاز تا حد زیادی کاهش پیدا کند. در زمان انجام گروه بندی با تنظیم ضریب اطمینان(Confidence) نرم افزار Rotor-Gene روی ۹۰٪ درصد سعی شد دقت گروه بندی تا حد بسیار بالایی افزایش پیدا کند. استفاده از این روش می تواند برای دستیابی سریع به گروهی خاص از LAB در میان تعداد بسیار بالای ایزوله ها به کار رود. با این روش می توان با سرعت جنس یا گونه مورد نظر را یافته و شروع به بررسی های بیشتر آزمایشگاهی جهت رسیدن به اهداف صنعتی خاص نمود.

استفاده از 16SrDNA PCR sequencing به عنوان روشی مطمئن در شناسایی باکتری ها از جمله LAB سال ها است که مورد استفاده دانشمندان قرار می گیرد. گرچه روش های مولکولی مختلف دیگری همچون RFLP ، BOX-PCR ، انگشت نگاری مولکولی و... نیز برای شناسایی LAB به کار می روند(۱) اما با توجه به اهداف طرح و در نظر گرفتن شرایط



www.SID.ir

Archive of SID



پـژوهش، اسـتفاده ترکیبـی از HRM-Real Time PCR و 16SrDNA PCR sequencing بـه عنـوان روشـی نوآورانـه انتخاب شد.

چنان که انتظار می رفت مشخص شد شیر های خام ارتفاعـات البـرز از نظـر تنـوع LAB بسـیار غنـی هسـتند. بسـیاری از باکتری های بدست آمده کاربردهای بسیار مهم صنعتی داشـته و علاوه بر آن دستیابی به باکتری های جدید، نه تنها در سطح سویه بلکه حتی در سطح گونه بسیار محتمل به نظر می رسـد. همه این ها به این معنی اسـت کـه هنـوز هـم بایـد تحقیقـات بسیاری در این زمینه انجام شود.

بـاکتری *Enterococcus faecalis* (گـروه C) دارای کـاربرد روز افـزون در تولیـد صـنعتی پروبیوتیـک هـای دامـی اسـت. همچنین نقش آن در تولید برخی انواع پرطرفدار پنیـر اروپـایی بـه اثبـات رسـیده اسـت(۱). البتـه بـه دلیـل احتمـال انتقـال پلازمیدهای مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری به فلور پـاتوژن روده دانشـمندان در حـال انجـام مطالعـات بیشـتر بـر روی سویه هـای موجـود و تـلاش بـرای یـافتن سـویه هـای جدیـد هستند(۱۹). نمونه شاخص ارسالی به NCBI با توجه به محـل بدست آمدن باکتری (کوه های شهرسـتان رودسـر) بـا عنـوان سویه جدیـد *rudsar* (Accession Number: HQ646363) به ثبت رسید.

باکتری *lactococcus lactis* (گروه D) به عنوان اصلی تـرین استارتر در تولید صنعتی ماسـت نقـش داشـته(۱) و واحـدهای صنعت لبنیات کشورمان وارد کننده عمده سـویه هـای تجـاری آن هسـتند. در عـین حـال بـه کـارگیری ایزولـه هـای بـومی بدست آمده با توجه به علاقه مندی عمومی به طعم محصولات لبنی سنتی می تواند علاوه بر کـاهش هزینـه تولیـد، اسـتقبال عمومی از محصولات تولیدی را نیز افزایش دهد.

باکتری *Streptococcus infantarius* (گروه E) به عنوان یک پروبیوتیـک مفیـد، خصوصـا جهـت بـه کـارگیری در تولیـد محصولات غذایی ویژه نوزادان مورد توجه است. این باکتری هم هنـوز در ابتـدای راه مـورد اسـتفاده قـرار گـرفتن بـه عنـوان پروبیوتیک انسانی است.

در شناسایی باکتری های گـروه F ($F^1$ و $F^2$) و گـروه G ($G^1$ و $G^2$) نکات جالبی مشـاهده شـد. مقایسـه نتـایج HRM-Real Time PCR بـا بررسـی هـای مورفولوژیـک میکروسـکوپی نشان داد که در هر یک از این گروه ها هم باکتری کروی و هم میلـه ای قـرار گرفتـه انـد. در اینجـا نیـز اسـتفاده از روش پلی فازیک برای شناسایی بسیار کار آمد بود.

در گروه F باکتری های زیرگروه $F^1$ به عنـوان *Leuconostoc argentinum* و بـاکتری هـای زیرگـروه $F^2$ بـه عنـوان *Lactobacillus brevis* شناسایی شدند. این به علت قرابت ژنتیکی بسیار بالای باکتری های فـوق در ناحیـه 16S rDNA بوده و نیازمند توجه کافی است. مقایسه تـوالی ارسـالی نمونـه S20 به عنوان شـاخص گـروه بـا بانـک ژنـی NCBI نشـان از همولوژی ٪۹۹ با هر دو جنس فوق الذکر داشت. هر دو باکتری فوق کاربردهای فراوانی در تولید صـنعتی و سـنتی محصـولات گیـاهی تخمیـری خصوصـا در کشـورهای اروپـایی دارنـد(۱۹). محصولاتی که تولید آنها به عنوان فرآورده ای جدید می توانـد سودآوری بالایی در بازار کشورمان نیز داشته باشد.

در گروه G نیز شرایطی مشابه گـروه F وجـود داشـت. در ایـن گروه توالی به دست آمده از نمونه S29 مورد آنالیز قرار گرفـت که همولوژی ٪۹۹ با *Pediococcus pentosaceus* و ٪۹۸ بـا *Lactobacillus rhamnosus* را نشـان مـی داد (بـاکتری شـاخص در مرحلـه بررسـی بـرای ثبـت سـویه در NCBI قرار دارد. Accession Number: HQ705607).

بـه ایـن ترتیـب بـاکتری هـای زیرگـروه $F^1$ بـه عنـوان *Pediococcus pentosaceus* و بـاکتری هـای زیرگـروه $F^2$ بـه عنـوان *Lactobacillus rhamnosus* شـناخته شـدند. بـاکتری *Pediococcus pentosaceus* کاربردهـای صـنعتی فراوانی در تولید فرآورده های گوشتی، گیاهی و انواعی از پنیـر دارد. همچنـین ایـن بـاکتری بـه عنـوان یکـی از کاندیـداهای جایگزینی نگهداری زیستی به جای روش های مصـنوعی مـورد مطالعه است(۶). *Lactobacillus rhamnosus* نیز به عنـوان یکی از باکتری های پروبیوتیک بسیار مهم همواره مـورد توجـه بوده و سویه هایی از آن سال ها است در محصولات پروبیوتیک شرکت های بین المللی معتبر مورد استفاده قرار می گیرند.

برای اطمینان از درست بودن تئوری مورد اسـتفاده در تفکیـک زیرگـروه هـای $F^1$ از $F^2$ و $G^1$ از $G^2$، یـک نمونـه باسـیل از هر گروه، مورد PCR مجدد قرار گرفته و پـس از sequencing با بانک ژنی NCBI مقایسه شـد. نمونـه S53 از زیرگـروه $F^2$، *Lactobacillus brevis* و نمونـه S36 از زیرگـروه $G^2$، *Lactobacillus rhamnosus* شـناخته شـدند. ایـن نتیجـه نشان داد که در تحقیقات بعدی امکان استفاده از روش مطـرح شده برای گروه بندی LAB وجود داشته و می تواند به راحتـی شناسایی در سطح جنس و گونه را ممکن سازد. در عـین حـال در صورت انجام تحلیل درست نیازی به انجام PCR مجـدد در موارد مشابه با گروه های G و F وجود نخواهد داشت.



www.SID.ir

Archive of SID



نتیجه قابل توجه دیگری که بدست آمد، همولوژی ٪۷۸ نمونه S1 (گروه A) با توالی ژنی *Pediococcus acidilactici* در بانک ژنی بود. این باکتری در صنعت غذایی برای تولید محصولات تخمیری گیاهی مورد استفاده قرار می گیرد. درصد همولوژی بیانگر این مساله است که این باکتری می تواند یک گونه جدید باشد. مورد مشابه دیگر در نمونه S51 ( گروه H) دیده شد. آنالیز این نمونه نشانگر وجود همولوژی ٪۸۱ با *Enterococcus faecium* در بانک ژنی بود. انجام بررسی های بیشتر روی این گونه و شناسایی قطعی آن می تواند بسیار ارزشمند باشد. از آنجا که استفاده از انتروکوکوس ها به عنوان پروبیوتیک چندی است مورد توجه دانشمندان قرار گرفته، یافتن گونه های جدید انتروکوکی که فاقد برخی ویژگی های ناخواسته این باکتری ها باشند از اهمیت بالایی برخوردار است.

برخی از گونه های یافت شده بر اساس ویژگی های ثبت شده تاگزونومیک می توانند ویژگی های ارزشمند دیگری همچون تولید اگزوپلی ساکارید، تولید اسید لاکتیک در حجم زیاد، تولید پلی لاکتیک اسید، باکتریوسین را نیز داشته باشند که بررسی هر یک از این ویژگی ها می تواند موضوع یک تحقیق ارزشمند جهت استفاده صنعتی از یافته های بومی البرز در کشور باشد.

## نتیجه گیری

چنان که انتظار می رفت مشخص شد شیر های خام ارتفاعات البرز از نظر تنوع LAB بسیار غنی هستند. در تحقیق حاضر بر اساس اطلاعات مبتنی بر اکولوژی میکروارگانیزم ها شیر خام به عنوان منبع نمونه گیری انتخاب شد. دستیابی به سویه های بومی، شناسایی آنها و به کارگیری صنعتی یافته ها می تواند بخش بسیار بزرگی از هزینه های صنایع داخلی را کاهش دهد. در عین حال به کارگیری ایزوله های بومی بدست آمده با توجه به علاقه مندی عمومی به طعم محصولات لبنی سنتی می تواند علاوه بر کاهش هزینه تولید، استقبال عمومی از محصولات تولیدی را نیز افزایش دهد. برخی از گونه های یافت شده بر اساس ویژگی های ثبت شده تاگزونومیک می توانند ویژگی های ارزشمند دیگری همچون تولید اگزوپلی ساکارید، تولید اسید لاکتیک در حجم زیاد، تولید پلی لاکتیک اسید، باکتریوسین را نیز داشته باشند که بررسی هر یک از این ویژگی ها می تواند موضوع یک تحقیق ارزشمند جهت استفاده صنعتی از یافته های بومی البرز در کشور باشد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان لازم می دانند از زحمات بی شائبه و حسن همکاری کارکنان محترم آزمایشگاه های دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن نهایت سپاسگزاری را بنمایند.

## References


1- Salminen S, Von Wright A, Ouwenhand A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.2004;pp:225-230.

2- Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E,et al.*Comparative genomics of lactic acid bacteria. Evolutionary genomics.*2006; 103(42): 15611-15616.

3- Siezen RJ, Kok J, Abee T, Schaafsma G. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications*. Antonie van Leeuwenhoek. 2002; 82(1): 1-4.

4- De Vuyst L, Leory. *Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications.* Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology.2007; 13: 194-199.

5- Delcour J, Ferain T, Deghorain M, Palumbo E, Hols P.*The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria.* Kluwer Academic Publishers. 1999; 76: 159-184.

6- Zhu Y, Zhang Y, Li Y. *Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics.* Applied Microbiology and Biotechnology. 2009; 83: 597-610.

7- Kathiresan K, Thiruneelakandan G. *Prospects of lactic acid bacteria of marine origin.* Indian Journal of Biotechnology. 2009; 7: 170-177.

8- Cisem B. *Isolation and Molecular Characterization of Lactic Acid Bacteria from Cheese* [dissertation]. Izmir: Izmir Institute of Technology; 2003.

9- Afsharmazandaran N, Rajab. *Probiotics and their application in Cavies and Poultry feeding.* Noorbakhsh Publications; 2008, 14-30.

10- Savadogo A, Quattara CAT, Savadogo PW, Barro N, Quattara AS, Traore AS. *Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples.* African Journal of Biotechnology. 2003; 3(3): 189-194.

11- Singh P, Prakash A. *Screening of Lactic Acid Bacteria for Antimicrobial Properties Against Listeria monocytogenes Isolated from Milk Products at Agra Region.* Internet Journal of Food Safety. 2009; 11: 81-87.

12- Sujaya I.N, Amachi S, Saito K, Yokota A, Asano K, Tomita F. *Specific enumeration of lactic acid bacteria in ragi tape by colony hybridization with specific oligonucleotide probes.* World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2002; 8: 458-463.




www.SID.ir

Archive of SID



13- Madoroba E, Steenkamp ET, Theron J, Huys G, Scheirlinck I, Cloete TE. *Polyphasic taxanomic characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous sorghum fermentations used to produce ting, a traditional South African food.* African Journal of biotechnology. 2009; 8: 458-463.

14- Azadnia P, Khan Nazer A. *Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province.* Iranian Journal of Veterinary Research. 2009; 10(3): 28-32.

15- Tajabadi M, Hejazi M A, Noori A. *Studying the Probiotic Characteristics of Lactobacillus spp. Isolated from Lighvan fermented dairy products.* Tarbiat Moallem University Journal of Sciences. 2009; 7: 4-9.

16- Tajabadi M, Heidari Nasrabadi M, Jafari P. *Health and Iran traditional dairy products.* Proceedings of 1st National Conference on Probiotics and Functional foods. 2010; 30-39.

17- Jordan JA, Butchko AR, Durso MB. *Use of Pyrosequencing of 16SrRNA Fragments to differentiate between Bacteria Responsible for Neonatal Sepsis.* Journal of Molecular Diagnostics. 2005; 7(1).

18- Hejazi M. *Lactic Acid Bacteria and Functional Foods.* Proceedings of 1st National Conference on Probiotics and Functional foods; 2010: 173-175.



www.SID.ir