مجله تحقیقات مهندسی کشاورزی/جلد ۱۳/ شماره ۳/سال ۱۳۹۱/ص ۶۲-۵۱

شناسایی مولکولی باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی آذربایجان بر اساس ژن 16S rDNA

محمدامین حجازی*، پریا مختاری‌زنوزی، محمود خسروشاهلی، ابوالفضل برزگری، حاجیه لطفی، صولت اسلامی و سیامک علیزاده**

* نگارنده مسئول، نشانی: تبریز، بلوار ۲۹ بهمن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور، تلفن:۰۴۱۱۳۳۲۲۶۲۵، پیام نگار: aminhejazi@abrii.ac.ir

** به ترتیب استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور؛ دانشجوی گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ استاد گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ و کارشناسان پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور، تبریز

تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۶

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی دقیق ۲۲ ایزوله *لاکتوباسیلوس* جدا شده از محصولات لبنی سنتی منطقهٔ آذربایجان است. بدین‌منظور، ژن 16S rRNA با جفت آغازگرهای عمومی طی واکنش زنجیره پلی‌مراز (PCR) تکثیر شد. قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز مشابه با اندازه مورد انتظار تکثیر شد. استفاده از ۵ آنزیم برشی *Bsp*143I، *Bsu*RI، *Taq*I، *Msp*I و *Hin*dIII و مقایسه الگوی برشی حاصل از نرم‌افزار GeneDoc، تنوع گونه‌ای در بین باکتری‌ها را نشان داد. بر اساس الگوهای برشی، ایزوله‌ها به گونه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس آژیلیس*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *لاکتوباسیلوس ساکی* شباهت نشان دادند. از بین ایزوله‌ها، ۸ ایزوله جهت همسانه‌سازی انتخاب و برای توالی‌یابی ارسال شد. در مجموع، ۵ ایزوله به عنوان *پلانتاروم*، ۲ ایزوله به عنوان *برویس* و یک ایزوله به عنوان *Lactobacillus* sp. شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی

باکتری‌های پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس*، 16s rRNA.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا شوند (Klaenhammer, 2000). از تاثیرات مفید مصرف پروبیوتیک‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: بالا بردن توان سیستم ایمنی افراد مسن، پیشگیری از عفونت‌های زمستانی، پیشگیری از اسهال ناشی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها، کاهش تحمل‌ناپذیری در برابر لاکتوز، درمان اسهال روتارو ویروسی، درمان حساسیت (آلرژی)، پیشگیری از سرطان، درمان زخم معده و درمان التهاب روده (Goktepe *et al*., 2006).

اولین قدم در معرفی سویه‌های پروبیوتیک، جداسازی و انتخاب سویه‌های مناسب از جمعیت میکروبی متنوع است که با جستجو در مجموعه بانک‌های سلولی، محصولات لبنی سنتی، یا انسان و حیوانات سالم انجام می‌گیرد. جداسازی سویه‌ها با کشت آن‌ها در

Archive of SID
www.SID.ir

شـــرایط آزمایشـــگاهی آغـــاز و پـــس از آن بهتـــرین سویه‌های پروبیوتیکی با روش‌هـای سـادهٔ درون شیشـه‌ای بـا ایجـاد شـرایطی هماننـد شـرایط دسـتگاه گوارشـی و اپی‌تلیـوم روده‌ای شناسـایی مـی‌شـود. محصـولات لبنـی سنتی یکی از منابع اصلی پروبیوتیک‌ها شـناخته شـده‌انـد کـه در بـین بـاکتری‌هـای اسـید لاکتیـک موجـود در محصولات لبنی جنس *لاکتوباسیلوس* بیشـتر مـورد توجـه است (Fooks *et al*., 1999).

اسـاس بیشـتر روش‌هـای شناسـایی بیوشـیمیایی باکتری‌های اسـید لاکتیـک شـامل: تشـخیص مورفولـوژی سلولی، تجزیهٔ تولیدات تخمیری، فعالیت آنزیمی مجتمـع، توانایی استفاده از سوبستراهای مختلف کربوهیدرات اسـت. اما به کارگیری ایـن روش‌هـا در طبقـه‌بنـدی و شناسـایی باکتری‌های اسید لاکتیک، با توجـه بـه تکرارپـذیر نبـودن شرایط کشت مرتبط با آزمایشگاه‌های مختلف و تنوع رگـه و بیوتیپ‌های مقایسه شده با گونـه‌هـای مشـخص، روشـی کامـل و جـامع نیسـت (Tannock, 1999). از ایـن رو شناسایی دقیق‌تر سویه‌های باکتری با روش‌هـای مولکـولی اهمیت فـراوان دارد، زیـرا ایـن روش‌هـا بـر مبنـای آنـالیز اسـیدهای نوکلئیـک اجـرا مـی‌شـوند کـه قابـل تکـرار در آزمایشگاه‌های دیگر نیز هستند. همچنین با پیشرفت‌هـای مولکولی، ایجاد تغییرات اساسی در طبقه‌بنـدی بـاکتری‌هـا نیز امکان‌پذیر شده است. اساس این تغییـرات بـا بررسـی یک توالی خاص از ژنـوم موجـودات بـا عنـوان بارکـدینگ DNA قابل توجیه است. در بیشتر تحقیقات مولکولی روی پروکاریوت‌ها، از توالی ژن 16s rRNA[1] استفاده شـده اسـت زیرا این ژن به عنوان یک زمان‌سنج دقیق علمـی در طـول تکامل مورد استفاده محققان بوده است. یکی از روش‌هایی که می‌تواند تنـوع موجـود در ژن 16s rRNA را تشـخیص دهـد و بـا آنـزیم‌هـای برشـی انجـام مـی‌شـود، روش PCR-ARDRA[2] نامیـده مـی‌شـود کـه از ریبوتایپینـگ مشتق شده اسـت. همچنـین طبـق تعریـف دیگـری ایـن روش بـه عنـوان اجـرای روش RFLP بـر اسـاس ژن‌هـای ریبـوزومی معرفـی شـده اسـت (Jansson, *et al*., 2009). تحقیقات متعددی در زمینهٔ شناسایی لاکتوباسیلوس‌هـا بـا تکنیـک ARDRA اجـرا شـده اسـت. گیرافـا و همکـاران (Giraffa, *et al*., 1998) بـرای شناسـایی زیرگونـه‌هـای *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[3] از تکثیر و آنالیز برش آنزیمی ژن 16s rRNA و ARDRA استفاده کردند. ایـن محققـان بـا این روش توانستند بـا سـرعت و دقـت بـالایی سـویه‌هـای جداسازی شده از محصولات لبنی را شناسـایی کننـد. بـه این ترتیب که الگوی باندی ایجاد شده با آنزیم‌هـای برشـی عـلاوه بـر نشـان دادن اخـتلاف سـه زیرگونـه *دلبروکـی*، *لاکتیس* و *بولگاریکوس*، توانست اختلافـات *لاکتوباسـیلوس هلونتیکـــوس*[4] و *لاکتوباســـیلوس دلبروکـــی* را نیـــز نشـــان دهـــد (Giraffa *et al*., 1996). دلفـدریکو و همکـاران (Delfederico, *et al*., 2005) در آرژانتـین از نوشـیدنی کفیـر ۱۷ *لاکتوباسـیلوس را* جداسـازی کردنـد. در این تحقیق روش ARDRA با بـه‌کـارگیری آنـزیم‌هـای برشی *Hind*f I ,*Dde* I و *Hae*III بـرای بررسـی تنـوع ژن 16s rRNA اجـــرا شـــد. آنالیزهـــا نشـــان داد کـــه *لاکتوباسیلوس‌های* ناجور تخمیر جداسازی شـده، الگوهـای برشی مشـابهی بـا *لاکتوباسـیلوس کفیـر* زیرگونـه JCM و زیرگونـه ATCC داشـتند (Delfedrico *et al*., 2005). همچنـین زونـگ و همکـاران (Zhong *et al*., 1998) بـا استفاده از دو آنزیم برشی *Bc*lI و *Dra*I موفق به جداسازی ۶۴ سویه *لاکتوباسیلوس* شدند. ایـن روش تشـخیص بـین سویه‌های *اسیدوفیلوس* را امکان‌پذیر ساخت.

محصولات لبنی سنتی ایران نیـز منبـع مهمـی بـرای جداسازی و شناسایی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* محسـوب می‌شوند. ابراهیمی و همکـاران (Ebrahimi *et al*., 2011) از محصولات لبنی مانند ماست و پنیر موفق به جداسازی و

1- 16s ribosomal RNA
2- Amplified ribosomal DNA and restriction analysis
3- *Lactobacillus delbrueckii*
4- *L.helvetieus*
5-.*L.cazei*

Archive of SID
www.SID.ir

شناسایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس* کازئی[1] و *لاکتوباسیلوس* بـرویس[2] شـدند کـه کاندیـداهای خـوبی بـرای پروبیوتیـک بـودن هسـتند. لطفـی و همکـاران (Lotfi *et* al., 2010) به بررسی ۱۶ جدایـه *لاکتوباسـیلوس* از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب پرداختند. تنوع موجود در بین *لاکتوباسـیلوس*هـای ایزولـه شـده بـر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA و مـارکر RAPD بررسـی شد که تعلق سـویه‌هـای *لاکتوباسـیلوس* را بـه گونـه‌هـای *پلانتاروم*، *دلبروکی*، *کازئی*، *سالیواریوس*[3] و *بـرویس* نشـان داد. قطبی و همکـاران (Ghotbi *et* al., 2010) بـر اسـاس آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موفق به شناسـایی *لاکتوباسـیلوس کـازئی*، *لاکتوباسـیلوس* پلانتـاروم، *لاکتوباسـیلوس* پاراکـازئی، *لاکتوباسـیلوس* پنتوسـوس[4] از پنیـر لیقـوان شـدند. بـا توجـه بـه مطالـب ذکـر شـده، می‌توان به این نتیجه رسید کـه محصـولات لبنـی سـنتی منـاطق مختلـف ایـران بـه خصـوص آذربایجـان منبـع مهمـی بـرای بـاکتری‌هـای *لاکتوباسـیلوس* بـه عنـوان باکتری‌هـای پروبیوتیـک هسـتند. هـدف از ایـن تحقیـق، شناسـایی دقیـق *لاکتوباسـیلوس‌هـای* جداسـازی شـده از محصولات لبنی سنتی بر اساس روش‌های مولکولی (روش ARDRA و توالی‌یابی ژن 16S rRNA) است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق روی نمونه‌های ماست، پنیر، کشک سنتی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف شهرستان‌های کلیبر، ماکو و اهر اجرا شد. شناسایی اولیهٔ جدایه‌ها در سطح جنس بـر اساس ویژگی‌های مورفولوژی سلولی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، رنگ‌آمیـزی گـرم، الگـوی تخمیـر قنـدی، رشـد در دمـا و pHهـای متفـاوت در پژوهشـکدهٔ بیوتکنولـوژی کشـاورزی شـمال‌غـرب و غـرب کشور اجرا شده بود. پتانسیل پروبیـوتیکی جدایـه‌هـا نیـز توسـط تسـت‌هـای مقاومـت بـه اسـید و نمـک‌هـای صـفراویآن‌هـا مـورد ارزیـابی قـرار گرفتـه بـود (Alizadeh, 2008; Eslami,2007).

کشت باکتری‌ها جهت استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های *لاکتوباسیلوس* موجـود در بانـک میکروبـی پژوهشـکدهٔ بیوتکنولـوژی کشـاورزی شـمال‌غـرب و غـرب کشور ابتدا در محیط کشت MRS مایع به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند تـا رسـوب لازم بـرای اسـتخراج DNA آمـاده شـود. DNA ژنـومی باکتری‌هـا، طبـق روش پیشـنهادی کاردینـال و همکـاران (Cardinal *et al.*, 1997) استخراج شد؛ با ایـن تغییـر کـه برای شکستن دیوارهٔ سلولی باکتری از انجماد و ذوب مکرر استفاده گردید. ترکیبات لیز بافر شامل تریس ۱ مـولار بـا pH برابر با ۷/۵، کلریدسدیم ۵ مـولار، EDTA ۰/۵ مـولار، SDS ۲ درصـد و آب مقطـر بـود. بـرای بررسـی کیفیـت DNA اسـتخراج شـده از ژل آگـارز یـک درصـد بـرای الکترفورز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی ژن 16S rRNA

ژن 16S rRNA، بـا اسـتفاده از دو پرایمـر HalF (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و HalR (5'TACCTTGTTAGGACTTCACC 3') تکثیـر شـد (Drake *et al.*, 1996). شرایط اعمال شده در این واکـنش مشتمل بود بر: چرخـه‌هـای واسرشـته‌سـازی اولیـه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقـه، ۳۵ چرخـه بـا مرحلـه واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مـدت ۱ دقیقـه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقـه و سرانجام یک چرخه بسط نهـایی در ۷۲ درجـه سلسـیوس بـه مـدت ۱۰ دقیقـه. واکـنش زنجیـره‌ای پلـی‌مـراز

1-*L.cazei*
2- *L.brevis*
3- *L.salivarius*
4- *L.pentosus*

Archive of SID
www.SID.ir

با ۱۲/۵میکرولیتر مسترمیکس ساخت شرکت سیناژن، ده میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۴ میکرومولار از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵۰ نانوگرم DNA انجام شد.

برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر شده با PCR (ARDRA)

پس از تکثیر قطعه ژن 16S rRNA با پرایمرهای عمومی، الگوهای برشی حاصل از آنزیم‌های برشی گونه‌های شناسایی شده در تست‌های بیوشیمیایی با گونه‌های موجود در سایت بانک ژنی (NCBI) مقایسه شدند. در این تحقیق از پنج آنزیم برشی *BsP*143I، *Hind*III، *Taq*I، *Bsu*RI و *Msp*I استفاده شد.

برای هر محصول PCR، واکنش‌های هضم به‌طور جداگانه با آنزیم‌های مذکور انجام گردید. واکنش‌های هضم آنزیمی به مدت ۱۲ ساعت طبق دمای فعالیت آنزیم در بن‌ماری انجام شد. در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و از آن‌ها و عکس‌برداری شد. بعد از عکس‌برداری، الگوی نواری به‌دست آمده با الگوی نواری تهیه شده با نرم‌افزار Genedoc (version 2.7.0.0) از توالی‌های 16S rRNA گونه‌های *لاکتوباسیلوس* ثبت شده در NCBI، مقایسه شدند (Arenas *et al.*, 2009).

کلونینگ ژن 16S rRNA و توالی‌یابی آن

جهت توالی‌یابی دقیق و بررسی نوکلئوتیدهای جهش یافته، ژن موردنظر برای توالی‌یابی ارسال گردید. بدین‌منظور محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی با روش T/A کلونینگ به وکتور pGEM-T (شرکت پرومگا) الحاق شد. سپس وکتور نوترکیب به درون باکتری *Escherichia coli* DH5α جهت تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب انتقال یافت.

بر اساس روش غربالگری آبی/ سفید، باکتری‌های دریافت‌کننده وکتور نوترکیب از طریق کشت سطحی روی محیط LB Agar محتوی آمپی‌سیلین و آغشته به X-Gal و IPTG، غربال شدند (Malik *et al.*, 2003). پس از استخراج پلاسمید نوترکیب و تایید ورود قطعهٔ موردنظر به درون آن، پلاسمید نوترکیب به شرکت MWG آلمان جهت توالی‌یابی ارسال و پس از آن توالی موردنظر با استفاده از نرم‌افزار Chromas و BLAST آنالیز شد.

نتایج و بحث

این تحقیق روی ۲۲ ایزوله موجود در کلکسیون میکروبی پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی شمال‌غرب و غرب کشور اجرا شد. این ایزوله‌ها قبلاً با روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شده بودند. اسامی ایزوله‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- اسامی ایزوله‌های مورد بررسی

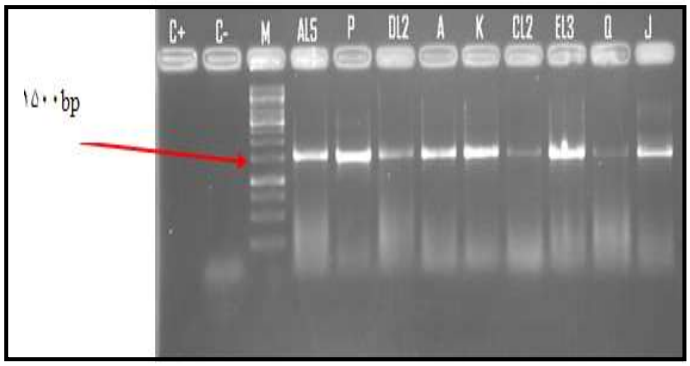
ایزوله	منطقه جداسازی شده	شناسایی بیوشیمیایی در حد گونه
AL1	ماکو	*کازئی - پلانتاروم*
BL3	اهر	*پلانتاروم - آژیلیس*
BL4	اهر	*پلانتاروم - آژیلیس*
DL3	اهر	*پلانتاروم*
I	کلیبر	*روتری – برویس -فرمنتوم*
BL8	اهر	*آژیلیس- پلانتاروم- فرمنتوم*
EL3	اهر	*ساکی*
C	کلیبر	*روتری – برویس- فرمنتوم*
AL5	ماکو	*پلانتاروم-دلبروکی*
DL2	اهر	*پلانتاروم*
DL4	اهر	*پلانتاروم*
P	کلیبر	*دلبروکی*
EL2	اهر	*ساکی*
A	کلیبر	*دلبروکی- برویس*
AL4	ماکو	*آژیلیس- پلانتاروم*
AL7	ماکو	*فرمنتوم- آژیلیس - پلانتاروم*
K	کلیبر	*روتری – برویس -فرمنتوم*
CL2	اهر	*آژیلیس- پلانتاروم*
J	کلیبر	*روتری – برویس -فرمنتوم*
H	کلیبر	*روتری – برویس -فرمنتوم*
O	کلیبر	*روتری – برویس -فرمنتوم*
AL2	ماکو	*پلانتاروم- آژیلیس-د لبروکی*

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی

نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده از لاکتوباسیلوس‌ها روی ژل ۱ درصد آگارز، وجود کیفیت خوب DNAها را جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی(PCR) تایید کرد. پس از PCR جهت تکثیر ژن 16S rRNA، محصولات PCR روی ژل الکتروفورز آشکارسازی شد. نتایج حاصل از PCR در شکل ۱ مشاهده می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) مربوط به تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید ژن 16S rRNA با جفت آغازگر Hal 6F و Hal 6R. +C: کنترل مثبت (واکنش بدون پرایمر)، -C: کنترل منفی (واکنش بدون DNA) سایز مارکر: 1Kb DNA Ladder (M).

به‌طوری‌که در شکل ۱ مشهود است، در مقایسه با اندازهٔ قطعات مختلف لدر یک کیلوبازی، اندازه قطعه تکثیر شده در حدود ۱۵۰۰ جفت باز است. بررسی ساختار ژن **16S rRNA** نشان می‌دهد که این ژن حاوی ۱۵۰۰ نوکلئوتید است و در چند نسخه در ژنوم کل باکتری وجود دارد. این ژن به عنوان یک نشانگر عمومی دارای توالی حفاظت شده و از نظر عملکرد پایداری بالایی دارد (Durm *et al*., 2001).

برش آنزیمی ژن 16S rRNA تکثیر شده با PCR (ARDRA)

جهت بررسی بیشتر و دقیق‌تر تنوع ژن 16S rRNA موجود در بین ایزوله‌های مختلف *لاکتوباسیلوس*، از روش برش آنزیمی بر مبنای ژن 16S rRNA استفاده شد. مقایسهٔ بیوانفورماتیکی برش‌های حاصل با الگوهای برشی توالی‌های 16S rRNA گونه‌های لاکتوباسیل ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) با استفاده از برنامه Gene Doc از نظر بیوانفورماتیک مقایسه شدند؛ الگوی برشی حاصل با آنزیم‌های برشی مختلف در شکل ۲ به طور جداگانه آورده شده است.

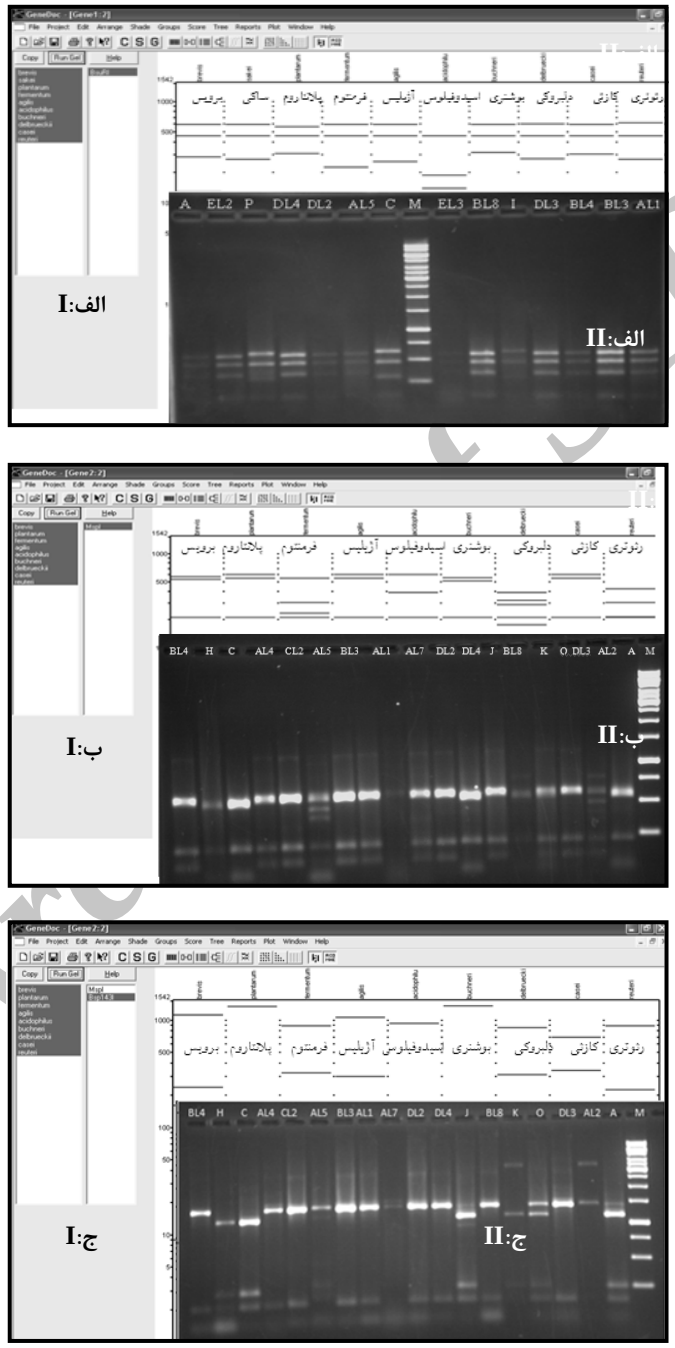
با توجه به الگوی برشی حاصل از تمام آنزیم‌های مورد استفاده، الگوی برشی ایزوله‌های DL3, AL5, DL2, DL4 و AL2 مشابه گونه *پلانتاروم*، ایزولهٔ AL1 مشابه الگوی برشی *کازئی* و *پلانتاروم*، ایزوله EL2 وEL3 مشابه الگوی برشی ساکی و ایزوله P مشابه الگوی برشی *دلبروکی* بودند که این مقایسه شباهت تست‌های بیوشیمیایی اجرا شده را با برش‌های حاصل نشان می‌دهد. بر اساس تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های BL3, BL8, AL4, CL2 و BL4 به گونه‌های *آژیلیس* و *پلانتاروم* شباهت بیشتری نشان می‌دهد (Alizadeh, 2008; Eslami, 2007).

با توجه به این‌که آنزیم *BsuR*I قادر به تفکیک این دو گونه نبود، برای تشخیص آن‌ها از دو آنزیم دیگر *Bsp*143I و *Msp*I استفاده شد. در برش‌های حاصل از این دو آنزیم، سویه‌های BL3, BL8, AL4, CL2 و BL4 مشابه الگوی برشی *پلانتاروم* بودند. همچنین در مورد ایزوله‌هایی که با تست‌های بیوشیمیایی به عنوان گونه‌های *رئوتری*، *برویس* و *فرمنتوم* شناخته شده بودند، دو آنزیم *Msp*I و*Bsp*143I قادر به تفکیک این سه گونه از هم بود به‌طوری‌که ایزوله‌های I, J, C, Q, H و K مشابه الگوی برشی *برویس* بودند. اما با استفاده از آنزیم *BsuR*I، الگوی برشی *رئوتری* و *برویس* مشابه هم بودند.

بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، دو ایزولهٔ AL7 وBL8 مشابه سه گونه *پلانتاروم*، *آژیلیس* و *فرمنتوم*

Archive of SID
www.SID.ir

تشخیص داده شدند که جهت بررسی تفاوت این سه گونه از آنزیم‌های برشی *Bsp143*I و *Msp*I استفاده شد. اما نتایج نشان داد که این دو ایزوله الگویی مشابه با *پلانتاروم* دارند. یادآوری می‌شود که دو آنزیم *Taq*I و *Hind*III قادر به تفکیک و ایجاد تنوع در ژن 16S rRNA نشدند.



شکل ۲- برش محصولات PCR الف: با آنزیم *Bsu*RI ب: با آنزیم *MspI* و ج: با آنزیم *Bsp*143I و مقایسهٔ بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی‌های 16S rRNA گونه‌های لاکتوباسیلوس ثبت شده در بانک ژنی
I: الگوی برشی حاصل از ایزوله‌ها روی ژل آگارز II: الگوی برشی حاصل با برنامه GeneDoc.

www.SID.ir

همسانه‌سازی ژن 16S rRNA و توالی‌یابی آن

قطعه تکثیر یافتهٔ هشت ایزوله در مرحلهٔ PCR (۱۵۰۰جفت باز) درون ناقل pGEM با روش T/A Cloning همسانه شدند. همسانه‌های سفید با روش غربالگری آبی- سفید انتخاب و بعد از استخراج این قطعات از پلاسمید برای توالی‌یابی ارسال شدند.

در جدول ۲ نتایج نمونه‌های توالی‌یابی شده با نتایج بیوشیمیایی و نتایج شناسایی بر اساس الگوی برش آنزیمی مقایسه شدند.

بررسی نهایی نشان می‌دهد که ایزوله‌هایی که برای توالی‌یابی ارسال شده بودند، یا شباهت به نتایج تست‌های بیوشیمیایی داشتند یا با آن‌ها متفاوت بودند. تفاوت بین نتایج شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی، دو دلیل دارد: اول وجود جهش در توالی، که حتی به اندازهٔ یک نوکلئوتید الگوی برشی متفاوتی را ایجاد خواهد کرد و این مورد در ایزولهٔ J تایید شد. دوم ضعف تست‌های بیوشیمیایی در شناسایی دقیق و مورد اطمینان که این دلیل نیز در مورد ایزوله‌های A و AL1 صادق بود.

جدول ۲- بررسی نهایی ایزوله‌ها و مقایسهٔ نتایج روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و برش آنزیمی و شناسایی مولکولی

نمونه	شناسایی بیوشیمیایی	شناسایی بر اساس ARDRA	شناسایی بر اساس توالی‌یابی (Accession number)	درصد شباهت با ایزوله-های ثبت شده در NCBA
H	*برویس- روتری- فرمنتوم*	*برویس*	*برویس HM8547*	۹۹ درصد
o	*برویس- روتری- فرمنتوم*	*برویس*	*برویس JN368472*	۹۹ درصد
DL3	*پلانتاروم*	*پلانتاروم*	*پلانتاروم HQ406829*	۹۹ درصد
CL2	*پلانتاروم- آژیلیس*	*پلانتاروم*	*پلانتاروم HQ610929.1*	۹۹ درصد
J	*برویس- روتری- فرمنتوم*	متفاوت از بقیه سویه‌ها	*HQ406830 L. sp*	۹۷ درصد
A	*دلبروکی- برویس*	*پلانتاروم- متفاوت از دلبروکی*	*پلانتاروم JN368470*	۹۹ درصد
AL1	*کازئی- دلبروکی*	*کازئی- پلانتاروم*	*پلانتاروم*	۱۰۰ درصد
BL3	*پلانتاروم- آژیلیس*	*پلانتاروم- آژیلیس*	*پلانتاروم JN368469*	۹۹ درصد

ARDRA روشی سریع و ساده جهت بررسی تنوع بین گونه‌های *لاکتوباسیلوس* است. در تحقیقات جوهانسون، از آنزیم‌های برشی *Eco*RI و *Hind*III برای شناسایی اکثر سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* استفاده شده است که وجود *لاکتوباسیلوس دلبروکی* از پنیر کومت با استفاده از روش PCR-ARDRA تایید شد. برای شش سویه از *هلونتیکوس* هیچ برشی با *Eco*RI دیده نشد با وجود این‌که الگوی تخمیر قندی یکسانی داشتند (Johansson *et al.*, 1995). ونتورا و همکاران (Ventura *et al.*, 2000) این روش را بعد از تکثیر ژن 16S rRNA با سه آنزیم برشی *Sau3*AI, *Hinf*I, *Dra*I برای شناسایی گروه‌بندی گونه‌های پاراکازئی، *سالیواریوس*، *روتری*، *فرمنتوم* استفاده کردند. آنزیم *Hinf*I تمایز بین گونه‌های

Archive of SID
www.SID.ir

اسیدوفیلوس و *گالیناروم* و *DraI* تمایز بین گونه‌های *کریسپاتوس* و *آمیلووروس* را امکان‌پذیر ساخت.

نتیجه‌گیری

تشخیص گونه‌های میکروبی با روش‌های فنوتیپی پیچیده و زمان‌بر است. با پیشرفت روش‌های مولکولی، گونه‌های میکروبی با سرعت و دقت بالایی تشخیص داده می‌شوند. در این تحقیق به منظور شناسایی ایزوله‌های لاکتوباسیلوس و بررسی تنوع در ژن 16S rRNA، دو روش ARDRA و توالی‌یابی به کار گرفته شد. در روش ARDRA از آنزیم‌های برشی *Taq*I, *Msp*I, *Hin*dIII, *Bsu*RI و *Bsp*143I استفاده شد. با الگوی به دست آمده از این آنزیم‌ها، تفکیک گونه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *برویس*، *دلبروکی*، *کازئی*، *روتری*، *فرمنتوم* و *ساکی* تفکیک شدند. یادآوری می‌شود که آنزیم‌های *Hin*dIII و *Taq*I قادر به ایجاد تفکیک نشدند. از مزیت‌های روش ARDRA می‌توان به سرعت بالا، قابلیت تکرارپذیری، گروه‌بندی و تشخیص گونه‌های میکروبی از هر جمعیت اشاره کرد. بعد از تفکیک ایزوله‌ها با روش ARDRA، بر اساس نتایج حاصله هشت ایزوله از ۲۲ ایزوله توالی‌یابی شدند. در نهایت پنج گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و دو گونه *لاکتوباسیلوس برویس* و یک گونه *Lactobacillus* sp از محصولات لبنی به طور دقیق با دو روش ARDRA و توالی‌یابی شناسایی شدند.

قدردانی

از پژوهشکدهٔ بیوتکنولوژی کشاورزی شمال‌غرب و غرب کشور به دلیل حمایت‌های مالی و علمی این پروژه سپاسگزاری می‌شود.

مراجع

Alizadeh, S. 2008. Isolation and biochemical identification of potentionally probiotic bacterria from traditional dairy product of Maku and Ahar. M.Sc. Thesis. Azad University. Zanjan. Iran (in Farsi).

Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L. and Giraffa, G. 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. Res. Microbiol. 149(9): 631-643.

Arenas, N. E., Polanco, J. C., Coronado, S. M., Durango, C. J. and Góme, A. 2009. Design of a molecular method for subspecies specific identification of *Klebsiella pneumoniae* by using the 16S ribosomal subunit gene. Colombia Médica. 40(3): 307-315.

Cardinal, M. J., Meghrous, J., Lacroix, C. and Simard, R. E. 1997. Isolation of lactococcus lactis strain producing inhibitory activity against listeria. Food Biotech.11(2): 129-146.

Delfederico, L., Hollmann, A., Martı´nez1, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G. and Semorile, L. 2005. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. J. Dairy Res. 73(1): 20-27.

Archive of SID
www.SID.ir

Drake, M., Small, C. L., Spence, K. D. and Swanson, B. G. 1996. Rapid detection and identification of Lactobacillus spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. J. Food Protec. 59(10): 1031-1036.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Holloran, S., Feeny, M., Flynn, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Clinical Nutri. 73(2): 386-392.

Ebrahimi, T. M., Ouwehand, A. C., Hejazi, M. A. and Jafari, P. 2011. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. African. J. Microbiol. Res. 5(1): 20-27.

Eslami, S. 2007. Investigation of potentionally probiotic bacteria from traditional dairy product of Kaleybar. M. Sc. Thesis. Shahid Beheshti University. Tehran. Iran. (in Farsi)

Fooks, L. J., Fuller, R. Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. Int. Dairy. J. 9(1): 53-61.

Ghotbi, M., Soleymaniyan Zad, S. and Sheikh Zeinoddin, M. 2010. Identification of facultative Hetrofermentive in Lighvan cheese. Iranian Food Sci. Tachnol. 6(2): 145-148. (in Farsi)

Giraffa, G., De Vecchi, P. and Rossetti, L. 1998. Note:Identification of Lactobacillus delbrueckii subspecies bulgaricus and subspecies lactis dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. J. Appl. Microbiol. 85(5): 918-92.

Goktepe, I. Vijay, K. J. and Ahmedna, M. 2006. Probiotics in Food Safety and Human Health. Taylor & Francis Group. LLC.

Jansson, J., Willing, B., Lucio, M., Fekete, A., Dicksved, J., Halfvarson, J., Tysk, C. and Schmitt-Kopplin, P. 2009. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. J. Pone. PLoS One 4(7), e6386. Doi: 10.1371.

Klaenhammer T. R. 2000. Probiotic bacteria: Today and Tomorrow. J. Nutr. 130(2): 415-416.

Lotfi, H., Hejazi, M. A., Maleki Zanjani, B. and Barzgari, A. 2010. Isolation and Molecular Identification of Potentionally Probiotic Bactreia from Traditional Dairy Product of Heris and Sarab. J. Food Sci. Tech. Res. 20(1): 1-17. (in Farsi)

Malik, A. Wenuganen, S. Suwanto, A. and Tjahjono, B. 2003. Cloning, DNA sequence, and expression of Aeromonas caviae WS7b Chitinase Gene. J. Mol. Biotechnol. 23(1): 1–10.

Tannock, G. W. 1999. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria . Current Issue Molec. 1(1): 53-64.

Archive of SID

www.SID.ir

Ventura, M. Casas, I. A. Morelli, L. and Callegari, M. L. 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. Syst. Appl. Microbiol. 23(4): 504–509.

Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H. and Reid, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. Appl. Environ. Microbiol. 64(7): 2418–2423.

Archive of SID

www.SID.ir

AERI JAER *Journal of Agricultural Engineering Research/Vol.13/No.3/2012/P:51-62*

Factors Affecting the Performance of an Apple and Kiwi-Fruit Electronic Grading System

M. A .Hejazi*, P. Mokhtari Zunuzi, M. Khosroshahli, A. Barzegari, H. Lotfi, S. Eslami and S. Alizadeh

* Corresponding Author: Assistant professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North-West and West region, Tabriz, Iran. E-Mail: aminhejazi@abri.ac.ir
Received: 26 July 2011, Accepted: 25 February 2012

An electronically automated system for grading fruits was designed and its performance was evaluated. The machine comprised two electronic and mechanical sections; the fruit passed through them and was graded by weight using a 30 N load cell and a supported control. The effect of four independent variables on machine performance was then investigated. The independent variables in the first test were fruit type (two types), input slope (30°, 40°, 50°), and sensing time (1, 1.5, 2, 2.5, 3 sec). In the second test, they were fruit shape (two) and output slope (10°, 30°, 50°). Three main factors were statistically significant for machine performance (fruits/sec). It was found that the most important factor was the timing of the load cell. Optimum correction of the timers by calculating the timing of fruit passing the sections and gates increased the performance of the machine. Results showed that maximum capacity was achieved for kiwi fruit with an input slope of 50° and 1 sec of time for the load cell, totaling 872.4 fruits/hr.

Keywords: Apple, Electronic system, Grading, Kiwi fruit, Weight

Archive of SID

www.SID.ir