Archive of SID

جداسازی و شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتری‌های جنس انتروکوکوس دوغ شتر از ناحیه گنبد کاووس

نفیسه دعوتی[۱]، سعید زیبایی*[۲]، فریده طباطبایی یزدی[۳]، فخری شهیدی[۴]، محمدرضا عدالتیان[۵]

۱. دانشجوی دکترای میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۲. استادیار ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شعبه شمال شرق، ۳. دانشیار، ۴. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی و ۵. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه دانشگاه فردوسی مشهد

* Corresponding author: s.zibaee @ mrazi.ac.ir

چکیده

دوغ شتر از ناحیه گنبد کاووس جمع آوری و باکتری‌های انتروکوکوس آن جداسازی شدند. تست‌های بیوشیمیایی و مشاهدات میکروسکوپیکی حضور انتروکوکوس‌ها را در دوغ شتر تایید کرد. DNA استخراج شده ایزوله‌ها با کمک پرایمرهای یونیورسال B27F و U1492R تکثیر گردید. ایزوله ها به وسیله تکثیر ناحیه 16S rDNA شناسایی شدند و سپس توسط روش ARDRA غربال گری و گروه بندی شدند. بر اساس آنالیز هضم آنزیمی (Hae111, Hha1) ناحیه 16S rDNA ایزوله‌ها به سه الگوی مختلف ARDRA تقسیم بندی شدند که توسط توالی‌یابی DNA ریبوزومی از هر گروه حضور سه باکتری *Enterococcus durans* *Enterococcus lactis , Enterococcus faecium,* با اثبات رسید. این سه باکتری به عنوان باکتری‌های پروبایوتیک در دنیا شناسایی شده اند.

کلمات کلیدی: دوغ، شتر، باکتری‌های اسید لاکتیک، انتروکوکوس، ARDRA.

مقدمه

فراورده های شناخته شده حاصل از شیر شتر در دنیا شامل پنیر(Kurth)، KhoaT، کره، Ghee، Shubat (شیر تخمیر شده شتر یکی از غذاهای سنتی مردم آسیای مرکزی)، Susa (غذای مردم روستائی کنیا و سومالی) ، Garris، کفیر تهیه

www.SID.ir

Archive of SID

شده از شیر شتر با کشت کفیر، Oggtt (محصول عربستان صعودی)، دیه چال یا دوغ شتر، قالما و سوزمه (محصول ترکمنها) می باشد. امروزه به خاطر تقاضای بالا در آفریقا و آسیا شیر شتر به صورت پاستوریزه (ساده، طعم دار)، شکلاتی، پنیر و سایر فراورده های لبنی تولید و در سوپرمارکتها ارائه می شود. از نظر خواص درمانی دارای فعالیت‌های ضد ویروسی، ضد باکتریایی، دارای مقادیر بالای انسولین جهت درمان دیابت، سرشار از پادتن هایی با قابلیت نفوذپذیری عمیق تر از پادتن های شیر انسان بر علیه ویروس ایدز و عامل هپاتیت C می باشد. همچنین در درمان بیماریهایی نظیر آلزایمر، دیابت، سرطان، بیماری قلبی، پارکینسون، آلرژی های غذایی، التهاب مفاصل، یرقان، بیماری های طحال، تنگی نفس یا آسم، کم خونی، بواسیر و در ترمیم زخم ها موثر می باشد. شیر شتر سرشار از فاکتورهای رشد، مواد پائین آورنده فشار خون، مواد کاهش دهنده کلسترول وآنتی اکسیدانها است، پروتئین های شیر شتر پیش ساز بسیاری از پپتیدهای زیست فعال می باشند. شیر تخمیر شده شتر در درمان سل و بیماریهای انگلی تاثیر دارد و قابلیت هضم بهتر و اسیدیته بیشتری نسبت به کفیر وشیر دارا می باشد. فلور میکروبی آن حضور پایداری در دستگاه گوارش داشته و فرایندهای هضم دستگاه گوارش را تنظیم و تحریک می کند. لیپیدهای شیر شتر نسبت به شیر سایر حیوانات میزان ترکیبات ضد میکروبی بیشتر و آنتی اکسیدان قوی تری دارند. در ایران تنها گوشت شتر به صورت صنعتی تولید می گردد. تنوع فراورده های حاصل از شیر شتر نیز بسیار کم می باشد و بیشتر به‌صورت تازه یا به‌صورت دوغ (استان های گلستان و هرمزگان) مصرف می شود. البته با توجه به اینکه امروزه شیر شتر به واسطه ویژگیهای منحصر بفرد آن توجه جهانی را بخود معطوف ساخته است چندی است در کشور ما نیز درارتباط با شیر شتر بومی ایران فعالیت‌هایی جهت صنعتی شدن تولید آن و تحقیقات پژوهشی در زمینه شناسایی ترکیبات شیمیایی با خواص منحصر به فرد آن انجام شده است (۱و ۲).

مواد و روش‌ها:

جداسازی باکتری‌های انتروکوکوس از دوغ شتر

ابتدا از دوغ حاصل از شیر شتر تک کوهانه استان گلستان تحت شرایط استریل نمونه برداری شد. سپس رقت های سریالی 10^{-3} تا 10^{-7} از نمونه تهیه گردید و تحت شرایط هوازی و بی هوازی (جار بی هوازی وگاز پک نوع A) در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. جهت شمارش و جداسازی باکتری‌های انتروکوکوس از خانواده اسید لاکتیک باکتری‌ها از رقت های تهیه شده بر روی محیط KAA آگار کشت انجام شد و تحت شرایط بی هوازی (جار بی هوازی وگاز پک نوع A) در دمای ۳۷ °C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری گردید. سپس کلنی-هایی که از نظر شکل ظاهری و تحدب با هم اختلاف داشتند به طور تصادفی انتخاب گردیدند و به طور خطی بر روی محیط KAA آگار کشت شدند و مجددا تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری گردیدند. کلنی‌های خالص سازی شده از نظر مشاهده میکروسکوپی، آزمون کاتالاز و رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه هایی که از نظر تست کاتالاز منفی و و رنگ آمیزی گرم مثبت بودند جهت شناسایی تا سطح جنس مورد بررسی قرار گرفتند و از نظر رشد در دو دمای ۱۵ °C و ۴۵ °C، رشد در دو غلظت ۶.۵ و ۱۸ درصد کلرید سدیم، رشد در pH های ۴.۴ و ۹.۶ و قابلیت تولید گاز CO_2 از گلوکز مورد ارزیابی قرار گرفتند. شناسایی تا سطح جنس با مقایسه نتایج حاصل از مشاهدات میکروسکوپیکی، تست های بیوشیمیایی انجام گردید (۳). باکتری‌های با شرایط زیر به عنوان جنس انتروکوکسی انتخاب گردیدند:

کوکسی شکل، عدم تولید گاز CO_2 از گلوکز، عدم رشد در ۱۸ ٪ کلرید سدیم، قابلیت رشد در دو دمای ۱۰ و ۴۵ درجه سانتی‌گراد ، ۶.۵٪ کلرید سدیم، pH =۴.۴ و pH =۹.۶ .

استخراج DNA و تکثیر ناحیه هدف با PCR

هر تک کلنی کشت یافته از هر ایزوله به یک میکروتیوب حاوی۱۰۰ میکرولیتر آب دیونایز استریل اضافه شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر کلروفرم الکل ایزوآمیل با نسبت ۲۴ به ۱ اضافه گردید و بعد از ۵ ثانیه ورتکس در ۱۶۰۰۰g، از DNA استخراج شده حاصل جهت انجام PCR استفاده گردید (۴). سپس با پرایمرهای یونیورسال زیر واکنش PCR انجام شد و ژل الکتروفورسیز برای بررسی تشکیل باند در 1500bp انجام گردید.

B27F (5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و U1492R (5′- ACGTGGTTTGAAGAGATTTTCG-3′)

هضم آنزیمی ناحیه تکثیر یافته جهت آنالیز ARDRA

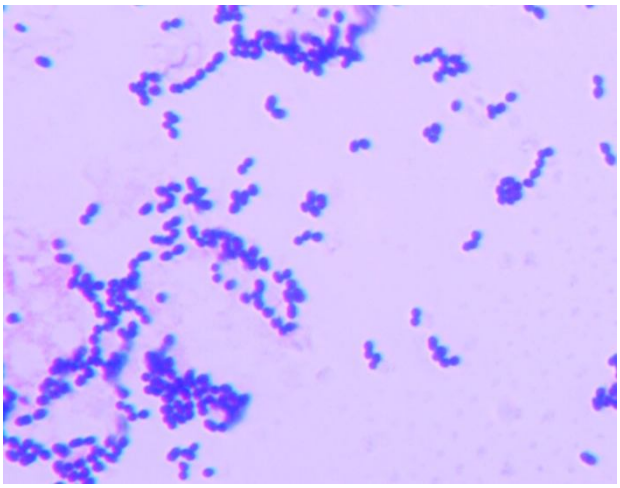
www.SID.ir

Archive of SID

ناحیه تکثیر یافته با دو آنزیم Hha1 و Hae111 هضم گردید و سپس بر روی ژل آگارز با غلظت ۱.۵٪ الکتروفورسیز جهت تفکیک باندهای حاصل صورت گرفت. بر اساس هضم آنزیمی ناحیه تکثیر شده و پروفایل های باندی گروه بندی شده، یک نماینده از هر گروه برای توالی یابی به شرکت ماکروژن کره ارسال شد.

نتایج و بحث

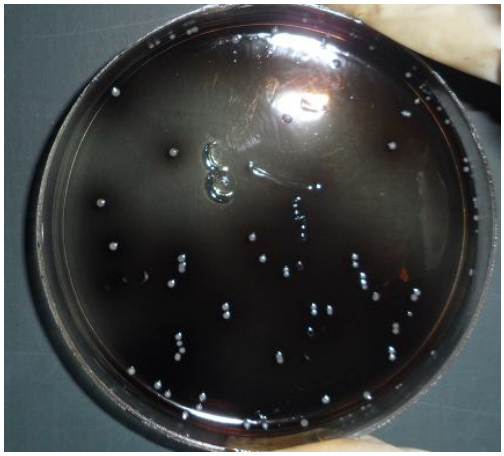
مشاهدات میکروسکوپیکی حضور باکتری‌های کوکسی شکل را در دوغ شتر تایید کرد (شکل۱). با توجه به هیدرولیز اسکولین توسط باکتری‌های انتروکوکوس و تغییر رنگ محیط کشت KAA (شکل۲) به رنگ سیاه و بر اساس تست های بیوشیمیایی حضور جنس انتروکوکوس در دوغ شتر تایید گردید.



شکل۱. نمونه‌ای از تصویر میکروسکوپیکی باکتری کوکسی جداسازی شده از دوغ شتر

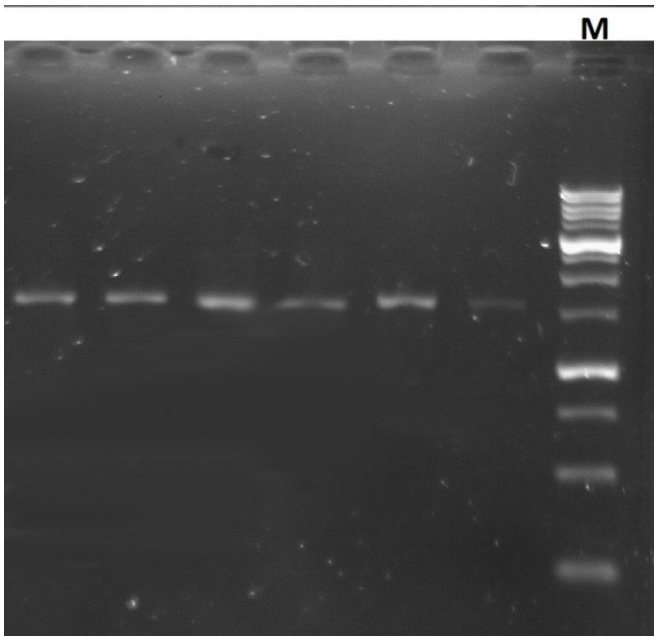
www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲. نمونه‌ای از کشت باکتری کوکسی جداسازی شده از دوغ شتر بر روی محیط KAA و هیدرولیز اسکولین توسط این باکتری

تشکیل باند حاصل از محصولات PCR در 1500 bp حضور باکتری‌های اسید لاکتیک را تایید کرد (شکل ۳).

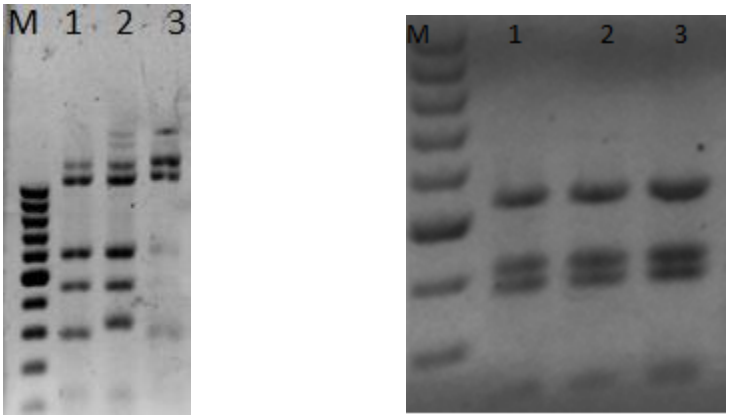


شکل۳. نتایج تکثیر ناحیه هدف با پرایمر یونیورسال به وسیله ژل الکتروفورز

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج هضم آنزیمی نواحی تکثیر شده بر اساس روش ARDRA در شکل ۴ و بر اساس توالی‌یابی نشان می‌دهد که باکتری‌های انتروکوکوسی در دوغ شتر به سه گروه *Enterococcus faecium, Enterococcus durans* و *Enterococcus lactis* که بر اساس شکل ۴ به ترتیب شامل پروفایل باندی ۱ ، ۲ و ۳ می باشند تقسیم می شوند. همچنین شکل ۴ نشان می‌دهد که آنزیم Hha1 قادر به تفکیک ژنتیکی این گونه‌ها از هم نبوده است. با توجه به نتایج این ارزیابی مولکولی و همچنین تحقیقات انجام شده در دنیا ۳ گونه شناخته شده دارای خواص پروبیوتیکی می‌باشند. که این یافته ارزش غذایی دوغ شتر را بیشتر می‌کند.



A **B**

شکل۴: نتایج هضم آنزیمی انتروکوکوس‌ها با کمک تکنیک ARDRA

A: هضم با آنزیم Hae111

B: هضم با آنزیم Hha1

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

1. Zagorski O., Maman A., Yafee A., Meisles A., Creveld C.V. and Yagil R. 1998, Insulin in Milk - a Comparative Study. *International Journal of Animal Science*, **13:** 241-244.

2. Serikbayeva A., Konuspayeva G., Faye B., Loiseau G., Narmuratova M. 2005. Probiotic properties of a sour-milk product : shubat from the camel milk. Desertification combat and food safety : the added value of camel producers. *Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop,* 19-21 April 2004, Ashgabad, Turkmenistan. Amsterdam : IOS Press, 187-191. (NATO sciences series, 362).

3. *Salminen S, Von Wright A, Ouwehand A. Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects: Marcel Dekker; 2004*

4. José Luis Ruiz-Barba, Antonio Maldonado, RuWno Jiménez-Díaz.. 2005. Small-scale total DNA extraction from bacteria and yeast for PCR applications. Analytical Biochemistry 347 (2005) 333–335.

www.SID.ir

Archive of SID

Isolation, Biochemical and molecular Identification of *Enterococcus Genus* Bacteria of Camel Drinking Yoghurt from Gonbad-e Qabus Region

N. Davati[1], , S. Zibaee[2], F. Tabatabaee yazdi[3],F. Shahidi[4], M.R. Edalatian[5]

1. Student Of Food Microbiology. Ferdowsi University
2. Assistant Professor ,Department of Veterinary Research and Biotechnology, Razi vaccine and Serum Research Institute ,North East Branch, Mashhad , Iran
3. Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad
4. Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad
5. Professor, Department of Food Science Industry. Ferdowsi University of Mashhad

* Corresponding author: s.zibaee @ mrazi.ac.ir

Abstract

Enterococcus bacteria are a important genus of lactic acid bacteria with probiotic potential. Camel drinking yoghurt from golestan province (Gonbad-e Qabus region) was collected and *Enterococcus genus* bacteria of this product were isolated. Biochemical tests and microscopic observation confirm the *Enterococcus genus* bacteria presence in camel drinking yoghurt. Amplification of 16S rRNA gene was carried out by universal primer (B27F, 1492R). Isolates were identified by amplification of 16S rDNA region then they were screened and grouped by ARDRA method. Based on restriction enzyme digestion analysis (Hae111, Hha1) of the 16S rDNA region, the isolates were grouped into 3 different ARDRA patterns that were identified by ribosomal DNA sequencing *as Enterococcus lactis, Enterococcus faecium, Enterococcus durans.*These bacteria were known as probiotic bacteria in the world.

Key words: camel, drinking yoghurt, lactic acid bacteria, *Enterococcus,* ARDRA.

www.SID.ir