

جداسازی و شناسایی مولکولی لاکتوباسیل های موجود در برخی از فرآورده های لبنی بومی

مریم قبادی دانا^۱، علی هائف سلمانیان^{۲*}، باقر یخچالی^۳

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، پژوهشگاه استاندارد

۲- دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

* نویسنده مسئول (salman@nigeb.ac.ir)

۳- دانشیار گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

یکصد و دوازده نمونه فرآورده های لبنی از قبیل ماست، دوغ و شیرخام از مناطق بکر استان های کرمانشاه، کردستان، لرستان، ایلام و مرکزی جمع آوری شد. جداسازی باکتری ها بر مبنای روش های استاندارد بین المللی انجام شد. پس از انجام کشت های متوالی بر روی محیط های اختصاصی با کسب کلنی های تیپیک و مشاهده میکروسکوپی، نود و سه باکتری برای آنالیزهای بعدی انتخاب شدند. به منظور شناسایی بیوشیمیایی سویه ها تخمیر ۱۹ قند، همچنین رشد در دمای ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس، احیا نیترات، ذوب ژلاتین و واکنش در برابر اسکولین بررسی شد. به منظور تایید نتایج بیوشیمیایی، آنالیزهای مولکولی مانند تکثیر قطعاتی از DNA با آغازگرهای مخصوص جنس انجام و تعلق این باکتری ها به جنس لاکتوباسیل تایید شد. همچنین ژن 16S rDNA کامل چهار باکتری با ویژگی های خاص تکثیر و پس از توالی یابی در بانک ژن NCBI ثبت گردید. پس از مقایسه توالی های مذکور با توالی دیگر باکتری های ثبت شده در این بانک، درخت فیلوژنی رسم گردید. نتایج نشان داد که دو باکتری مورد بررسی متعلق به گونه جدید *L. crustorum* است که در سال های اخیر گزارش شده است.

تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۰/۸/۳۰

واژه های کلیدی

ایران

زیست شناسی مولکولی

فرآورده لبنی

لاکتوباسیلوس

مقدمه

اندول نمی باشند. همه باکتری های اسید لاکتیک متابولیسمی تخمیری داشته و به شدت ساکارولیتیک هستند که محصول نهایی عمده حاصل از مصرف کربوهیدرات، اسید لاکتیک می باشد. باکتری های اسید لاکتیک مهم در صنعت لبنیات، متعلق به جنس های *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* و *Pediococcus*, *Streptococcus* هستند (IDF149, 2008).

مطابق تعریفی که فدراسیون بین المللی محصولات لبنی^۱ (IDF) و سازمان جهانی استاندارد^۲ (ISO) در سال ۲۰۰۸ ارائه نموده است، باکتری های اسید لاکتیک، باکتری های گرم مثبت، بی حرکت، بدون اسپور، کاتالاز منفی، احیا نیترات منفی، سیتوکروم اکسیداز منفی هستند که قادر به ذوب ژلاتین و تولید

1- International Dairy Federation

2- International Standard Organization

شناسایی نمایند (Schillinger, 2005). Kostinek و همکاران در سال ۲۰۰۷ در کشور افریقای جنوبی از نمونه های محصولات لبنی سنتی به نام Cassava سه گونه از لاکتوباسیلوس ها (*L.pentosus*, *L.fermentum* و *L.plantarum*) را جدا نمودند (Kostinek, 2007). Jokovic و همکاران در سال ۲۰۰۸ در کشور صربستان از نمونه های محصولات لبنی سنتی که به صورت صنعتی نیز تهیه می شود (به نام Kajmak) توانستند سه گونه *L.plantarum*, *L.paracasei*, *L.kefiri* را جداسازی و شناسایی نمودند. Rossetti و همکاران در سال ۲۰۰۸ در شمال ایتالیا از نمونه های پنیر سنتی به نام Grana padano دو گونه از لاکتوباسیل ها و یک گونه استرپتوکوک را به صورت غالب جدا نمودند. این باکتری ها شامل *L.delbrukii lactis*, *L.helveticus* و *Streptococcus thermophilus* بودند.

مطالعاتی که در ایران در زمینه لاکتوباسیل ها صورت گرفته بیشتر با هدف کاربرد در صنایع غذایی و بهینه سازی کیفیت فرآورده های لبنی بوده و انجام آنالیزهای مولکولی به منظور شناسایی یا تعیین ویژگی های خاص بیوشیمیایی کمتر مورد توجه بوده است. در همین زمینه تحقیقاتی با استفاده از باکتری های اسیدلاکتیک در رابطه با کنترل بیماری های گوارشی انجام شده و نتایج تحقیق نشان داده است که این باکتری ها توانایی کنترل بیماری های گوارشی از قبیل اسهال را دارا می باشند (محمدی، ۱۳۸۳؛ فاضلی، ۱۳۸۲؛ بارویی، ۱۳۷۹) همچنین تحقیقاتی با استفاده از بررسی قابلیت زیست بیفیدویاکتر در دوغ صورت گرفته است و نتایج تحقیق نشان می دهد که بیفیدویاکتر در دوغ زنده مانده پس می توان از این فرآورده غذایی به عنوان پایه برای این پروبیوتیک استفاده نمود. (بارویی، ۱۳۷۹). کارهای مشابهی در زمینه استفاده از باکتری های اسیدلاکتیک بومی در زمینه فرآوری پنیر انجام شده است (جان جانی، ۱۳۸۱؛ کازرونی، ۱۳۸۲). اجدانی به شناسایی استارتر های بومی مولد ماست و همچنین به بررسی نقش آنها در تولید ماست پرداخته است. نتایج این تحقیق نشان می دهد باکتری های جداسازی شده بومی توانایی تولید ماست با کیفیت مناسب را در آزمایشگاه دارا می باشند (اجدانی، ۱۳۸۰). احسانی و همکاران طی پایان نامه کارشناسی ارشد به بررسی اثر باکتری های

جنس لاکتوباسیلوس شامل گونه های متنوعی می باشد. لاکتوباسیل ها باکتری های میله ای شکل به طول ۱-۱۰ و عرض ۱/۲-۰/۵ میکرون می باشند. این باکتری ها همین^۱ (سیتوکروم، کاتالاز) ندارند ولی در مجاورت اکسیژن هوا رشد می کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود ۵٪ دی اکسیدکربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می شود. دمای بهینه رشد آنها بین ۳۰-۴۰ درجه سلسیوس می باشد اما توانایی رشد تا دمای ۵۳-۵۰ درجه سلسیوس را نیز دارند. لاکتوباسیل ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و گرچه pH بهینه برای رشد آنها ۵/۵-۸/۵ می باشد اما بطور کلی در pH کمتر از ۵ نیز قادر به رشد هستند (Carl, 1999; Klaenhammer et al., 2002; Hammes, 1995; Krieg, 1984). برای تامین انرژی، هیدرات های کربن را مورد استفاده قرار داده، اسید لاکتیک تولید می کنند. برخلاف آتروباکتریاسه که آنها هم اسیدلاکتیک تولید می کنند، لاکتوباسیل ها تخمیر کننده اجباری هستند (نوحی، ۱۳۶۷).

در سال های اخیر دانشمندان زیادی باکتری های اسید لاکتیک و لاکتوباسیل ها را از محصولات سنتی در سراسر دنیا به خصوص مناطق بکر جداسازی و شناسایی نموده اند. به طور مثال Beukes و همکاران در سال ۲۰۰۱ در افریقای جنوبی و نامیبیا از نمونه های محصولات لبنی سنتی به نام *L.delbrukii lactis* *amasi* و *L.plantarum* را جداسازی و شناسایی نمودند. Mathara و همکاران در سال ۲۰۰۴ در کشور کنیا از نمونه های محصولات لبنی سنتی به نام Kule naoto که pH آن کمتر از ۴/۵ است توانستند باکتری های *L. Plantarum*, *L. fermentum*, *L. paracasei*, و *L.acidophilus* را شناسایی نمایند. Ayhan و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵ توانستند از نمونه های ماست سنتی باکتری *L. delbrukii ssp bulgaricus* با ویژگی های خاص تجاری را جداسازی نمایند (Ayhan et al., 2005). Schillinger و همکاران در سال ۲۰۰۵ در کشور هندوستان از نمونه های محصولات تخمیری حاصل از سبزیجات سنتی که به طور گسترده ای مورد استفاده قرار می گیرد به نام های *khalpi* و *sinki*، *gundruk* و *L.plantarum* و *L.brevis* را جداسازی و

1- Hemmin

بکر و دور از شهر استان های غرب و جنوب غربی مانند: ایلام، کردستان، کرمانشاه، لرستان و مرکزی در شرایط استریل و در ظروف استریل جمع آوری و در مجاورت یخ و در کمتر از چهار ساعت به آزمایشگاه منتقل شد. جداسازی باکتری های اسید لاکتیک بر اساس روش های استاندارد بین المللی (STANDARD, 2003;) (STANDARD, 2006) میکروب شناسی انجام گرفت. با استفاده از محلول رینگر رقیق سازی به صورت رقت اعشاری از نمونه تهیه شد. سپس کشت آمیخته^۱ در محیط کشت MRS برای جداسازی سویه های باکتریایی بومی مولد ماست انجام شد. پس از گرمخانه گذاری در شرایط میکروآنروفل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کلنی های تشکیل شده روی سطح و درون محیط کشت از نظر خواص مورفولوژیکی و میکروسکوپی بررسی شدند. سویه های جداسازی شده براساس محل نمونه برداری شماره گذاری شدند (سویه های جداسازی شده از استان کرمانشاه با پیشوند KR، سویه های جداسازی شده از استان ایلام با پیشوند IL، سویه های جداسازی شده از استان لرستان با پیشوند LO).

انجام آزمون های تاییدی

آزمون های تاییدی بیوشیمیایی از قبیل احیا نیترات، ذوب ژلاتین، تولید اندول از تریپتوفان و آزمایش کاتالاز برای تشخیص باکتری های اسید لاکتیک بر روی سویه های جداسازی شده انجام شد.

برای شناسایی احیا نیترات، باکتری ها را در آبگوشت حاوی ۱٪ KNO_3 به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. سپس با افزودن یک دهم میلی لیتر از مخلوطی با حجم مساوی از معرف A (اسید سولفانلیک^۲) و معرف B (آلفا نفتیل آمین^۳) به محیط کشت نتیجه آزمایش مشخص گردید. در آزمایش احیاء نیترات و در صورت مثبت بودن آزمایش رنگ قرمز پدیدار می شود و در صورت منفی بودن آزمایش و عدم احیاء نیترات ایجاد رنگ قرمز در مرحله اضافه کردن پودر روی مشاهده می شود. جهت

گرمادوست و میاندوست در تولید نوشیدنی های تخمیری پرداخته است در این تحقیق از سویه های وارداتی استفاده شده است (طاهری، ۱۳۸۴).

با افزایش جمعیت و نیز بالا رفتن فرهنگ مصرف فراورده های لبنی در حال حاضر روزانه در کارخانجات صنایع لبنی کشورمان بیش از هزاران تن فراورده لبنی تولید می شود. با توجه به مصرف روز افزون فراورده های لبنی از جمله ماست و پنیر، نیاز به باکتری های اسید لاکتیک به عنوان استارتر نیز بیشتر می شود. با بررسی های میدانی و آماری به عمل آمده در کارخانجات تولیدی صنایع لبنی مشخص گردید صنایع مزبور در کشور کاملاً وابسته به تامین این باکتری ها از خارج از کشور می باشند. طبق آخرین اطلاعات سالانه دو میلیون دلار ارز جهت واردات استارتر از کشور خارج می شود (گمرک، ۱۳۸۳). این وابستگی در حدی است که اگر محدودیتی در مورد فروش استارترها به ایران اعمال شود، کارخانجات صنایع لبنی قادر به تولید ماست و پنیر نخواهند بود. از طرف دیگر با توسعه صنایع لبنی در کشور و ترویج فرهنگ بهداشت مواد غذایی و احتمال وجود آلودگی در فراورده های لبنی سنتی، مصرف فراورده های لبنی حاصل از این صنعت در اقصی نقاط کشور جایگزین مصرف فراورده های لبنی سنتی شده لذا تولید سنتی فراورده های فوق، بصورت چشمگیری کاهش یافته است. از این رو بسیاری از سویه های بومی باکتری های اسید لاکتیک در حال نابودی می باشند. بررسی ابعاد مختلف این مسئله نشان می دهد که از بین رفتن این سویه ها را می توان به عنوان یک ضرر جبران ناپذیر ملی و حتی جهانی در نظر گرفت.

این تحقیق به منظور جداسازی لاکتوباسیل های بومی در چند منطقه کشور و بررسی خصوصیات بیوشیمیایی آنها انجام شد. سپس چهار ایزوله مورد بررسی های مولکولی دقیق تر (تعیین توالی کامل 16S rDNA) قرار گرفت. پس از آن بر اساس توالی کامل 16S rDNA رده بندی باکتری ها و تهیه درخت فیلوژنتیکی این باکتری ها انجام شد.

مواد و روش ها

نمونه برداری از محلی انجام شد که از عدم حضور سویه های تجاری در آن منطقه اطمینان وجود داشت. نمونه فراورده های لبنی سنتی (ماست و دوغ) از مناطق

1- Pour plate

- ۲- معرف A: اسید سولفانلیک: هشت گرم اسید سولفانلیک در ۱۰۰۰ میلی لیتر اسید استیک پنج نرمال است.
- ۳- معرف B: آلفانفتیل آمین: پنج گرم آلفانفتیل آمین در ۱۰۰۰ میلی لیتر اسید استیک پنج نرمال است.

آزمون ذوب ژلاتین، کشت بطور عمقی در لوله ی حاوی مواد غذایی و ژلاتین انجام شد. پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت، لوله ها در یخچال قرار گرفته تا ذوب ژلاتین محرز گردد. یک لوله کشت داده نشده به عنوان شاهد نیز گرمخانه گذاری و یخچال گذاری شد. جهت انجام آزمون اندول باکتری ها در آبگوشت تریپتون کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در شرایط هوازی گرمخانه گذاری شده سپس توسط معرف Kovacs ایجاد رنگ قرمز ارغوانی به عنوان واکنش مثبت در نظر گرفته شد. جهت بررسی آزمون کاتالاز، کشت تازه از باکتری در محیط کشت نوترینت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۸ ساعت تهیه شد. تولید حباب های اکسیژن پس از مجاور نمودن پراکسید هیدروژن با کلنی نشانه مثبت بودن کاتالاز تلقی می شود. جهت انجام آزمون اسکولین، محیط اسکولین مایع تلقیح شده با لاکتوباسیلوس در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵-۳ روز گرمخانه گذاری و سپس تشکیل کمپلکس رنگی سبز زیتونی تا سیاه نشانه واکنش مثبت در نظر گرفته شد. همچنین توانایی رشد باکتری ها در ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس در محیط MRS مایع بررسی شد.

سپس برای تایید جنس لاکتوباسیل و شناسایی بیوشیمیایی این باکتری ها از مونوساکاریدهای شش کربنی (هگزوز): گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز و مانوز، مونوساکارید های پنج کربنه (پنتوز): آرابینوز، رامنوز و گزیلوز، از دی ساکاریدها: سوکروز، لاکتوز، مالتوز، تریهالوز و سلوبیوز، تری ساکاریدها: رافینوز، از پلی ساکاریدهای الکلی: مانیتول، اینوزیتول و سوربیتول، گلیکوزیدها: سالیسین و اسکولین، از اسیدهای آلی: گلوکونات استفاده گردید. برای تخمیر قند، محلول غلیظ هر یک از قند های مورد آزمایش که به طور جداگانه ای استریل شده بودند، به هر یک از لوله های حاوی محیط پایه قندی فوق اضافه شد تا غلظت آنها به ۰/۵ تا ۱ درصد برسد. سپس محیط کشت مایع تلقیح شده با باکتری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۵-۳ روز گرمخانه گذاری شد. تبدیل رنگ ارغوانی به زرد نشانه تخمیر قند در نظر گرفته شد.

شناسایی مولکولی باکتری ها

برای شناسایی باکتری ها به روش مولکولی استخراج DNA به روش استاندارد با به کارگیری لیزوزیم (Standard, 2005) انجام شد. استفاده از آغازگرهای طراحی شده از ژن *16S rDNA* برای انجام واکنش PCR برای تشخیص جنس های لاکتوباسیلوس مورد تایید قرار گرفته است (Nour, 1998). آغازگرهای اختصاصی جنس و *16S rDNA* مطابق با منابع موجود طراحی شد (Kwon et al., 2004). توالی آغازگرهای مورد استفاده در تشخیص جنس لاکتوباسیل ها که از *16S rDNA* طراحی شدند، عبارت بودند از: 5'-R16-1:3'-CTTGTACACACCGCCCGTCA و LbLMA1-3' rev:5'-CTCAAAACTAAACAA AGTTTC-3' واکنش زنجیره ای پلیمرز با شرایط زیر انجام گرفت:

دمای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان آن ۵ دقیقه بود. سپس سی چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ۴۰ ثانیه در دمای ۵۳ درجه سلسیوس و ۴۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA نهایی نگه داشته شدند. سپس جهت بدست آوردن ردیف کامل نوکلئوتیدی *16S rDNA* که برای رده بندی فیلوژنی باکتری ها به آن نیاز است، از جفت آغازگر زیر با شرایط تکثیر ذکر شده استفاده شد.

3'-id116r09R:5'TACCTTGTTACGACTTCACC-3',
3'-id116r08F:5'AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3'
شرایط تکثیر شامل دمای دناتوره شدن اولیه ۹۵ درجه سلسیوس و مدت زمان ۵ دقیقه و در ادامه سی چرخه شامل ۴۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲/۶ ۵۷ درجه سلسیوس و ۹۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام بود. سپس ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به منظور تکمیل سنتز DNA اعمال شد.

همسانه سازی قطعه *16S rDNA* در ناقل pTZ57R/T

ابتدا قطعه *16S rDNA* تکثیر شده توسط روش PCR روی ژل آگارز ۱/۵٪ الکتروفورز گردید، تا غلظت نمونه تخمین زده شود. مراحل اتصال قطعه و ناقل pTZ57R/T و در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت ۳-۴ ساعت انجام شد. سپس سلول های مستعد DH5α تهیه و محصول ligation به روش شوک حرارتی به داخل آن

متعلق به باکتری های اسید لاکتیک و جنس لاکتوباسیل هستند. به این ترتیب که همه میله ای گرم مثبت، بدون اسپور، بدون حرکت، کاتالاز منفی و اندول منفی بوده و قادر به احیا نیترات و ذوب ژلاتین نمی باشند (IDF149, 2008).

شناسایی بیوشیمیایی سویه های جدا شده

تخمیر ۱۹ قند و محصولات تخمیر و رشد در ۱۵ و ۴۵ درجه سلسیوس به عنوان کلید فوتوتیپی برای تشخیص سویه ها استفاده شد که نتایج آن در جدول ۲ مشاهده می شود.

بیشتر سویه های جدا شده قادر به تخمیر گلوکز (۹۵/۶٪)، لاکتوز (۹۴/۶٪)، فروکتوز (۹۱/۳٪)، گالاکتوز (۷۸/۴٪)، سوکروز (۸۶٪) و مانوز (۸۴/۹٪) بودند اما تعداد کمی از آنها توانایی تخمیر سوربیتول (۸/۶٪)، ملزیتوز (۶/۴٪)، رامنوز (۱۲/۹٪)، سلوبیوز (۲۶/۸٪)، گلوکونات (۱۹/۳٪)، ملیبیوز (۲۲/۵٪)، ترهالوز (۲۵/۸٪) و گزیلوز (۳۰/۱٪) را داشتند. برخی از آن ها می توانند آمیگدالین (۴۱/۹٪)، آرابینوز (۴۳٪)، مالتوز (۳۵/۴٪) و سالیسین (۳۲/۲٪) را تخمیر کنند و ۲۴/۷٪ از سویه ها نیز می توانستند اسکولین را تجزیه نمایند.

منتقل گردید. سلول های تراریخت شده *E. coli* DH5 α بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین (100 mg/lit)، *Xgal* (40 μ g/lit) و IPTG (200 μ M) کشت داده شدند. رشد و تکثیر کلنی های باکتریایی که به علت عدم تخمیر به رنگ سفید می باشند نشانه حضور قطعه DNA خارجی درون پلاسمید های pTZ57R/T می باشد. پلاسمید حاوی قطعه *16S rDNA* به روش لیز قلیایی (mini-preparation of plasmid) تخلیص شد و هضم آنزیمی به منظور تایید قطعه *16Sr DNA* به صورت استفاده همزمان از دو آنزیم *SacI* و *XbaI* انجام شد. پس از تایید قطعه *16S rDNA* تعیین توالی شد (شرکت ژن فن آوران- ایران).

ساخت درخت فیلوژنتیکی

برای طراحی درخت فیلوژنتیکی *16S rDNA* با استفاده از بانک اطلاعاتی NCBI، توالی *16S rDNA* مربوط به چندین باکتری لاکتوباسیل که به طور کامل تعیین توالی شده اند شناسایی و با استفاده از برنامه Clustal w هم ردیفی چندتایی انجام شد و سپس توسط برنامه MEGA4 با شرایط Bootstrap=1000, cut off=50 درخت فیلوژنتیکی رسم گردید.

نتایج نمونه برداری

در این تحقیق مناطق جغرافیایی بکر ایران مثل استان های ایلام، کرمانشاه، کردستان، لرستان و مرکزی با پیشینه تاریخی ۶۰۰۰ ساله انتخاب شدند. در این مناطق تولید صنعتی محصولات لبنی امکان پذیر نیست و این فرآورده ها به صورت سنتی و در منازل تهیه می شوند. جدول شماره ۱ تعداد و منابع نمونه های فرآورده لبنی سنتی تهیه شده از استانهای غربی کشور را نشان می دهد.

جداسازی لاکتوباسیل ها

مجموعاً ۹۳ سویه لاکتوباسیل از ۱۱۲ نمونه دوغ و ماست سنتی مختلف جدا شد. ۳۲ سویه از استان ایلام، ۲۳ سویه از استان کرمانشاه، ۱۷ سویه از استان کردستان، ۱۷ سویه از استان لرستان و ۳ سویه دیگر از استان مرکزی جدا شد. تمامی سویه های جدا شده

جدول ۱- تعداد، منبع و محل جمع آوری نمونه فرآورده های لبنی سنتی تهیه شده از استان های غربی کشور

استان	ملاست			دوغ			جمع
	گاو	گوسفند	بز	گاو	گوسفند	بز	
کرمانشاه: KR	۶	۱۵	-	۱	۵	-	۲۷
کردستان: KO	۱۰	۱۱	۲	-	۱	-	۲۴
مرکزی: MA	۲	۲	-	-	-	-	۴
ایلام: IL	۴	۶	۱	۹	۹	۳	۳۲
لرستان: LO	۱۶	۷	۱	۱	-	-	۲۵
جمع کل	۳۸	۴۱	۴	۱۱	۱۵	۳	۱۱۲

جدول ۲- نتایج شناسایی بیوشیمیایی سویه های جدا شده و سویه های کنترل

Sugar strains	Amigdalim	Arabinose	Cellulobiose	Fescullin	Fructose	Galactose	Glucose	Glucanate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melzitlose	Melblose	Raffinose	Rhamnose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15°C	Growth at 42°C
ATCC9595	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC393	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ATCC7830	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
ATCC314	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR5	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KR15	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR16	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR22	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR24	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR25	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR27	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR29	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR30	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR31	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR32	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR33	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR35	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR36	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR37	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR38	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR40	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR41	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KR43	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KO48	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
KO49	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Sugar Strains	ادامه جدول ۲	
	Growth at 15°C	Growth at 42°C
KO50	+	+
KO54	+	+
KO55	+	+
KO56	+	+
KO57	+	+
KO59	+	+
KO60	+	+
KO61	+	+
KO63	+	+
KO67	+	+
KO68	+	+
KO69	+	+
KO70	+	+
KO72	+	+
KO73	+	+
LO74	+	+
LO75	+	+
LO76	+	+
LO77	+	+
LO80	+	+
LO81	+	+
LO83	+	+
LO84	+	+
LO86	+	+
LO90	+	+
LO92	+	+
LO93	+	+
Amigaldin	+	+
Arabinose	+	+
Cellulose	+	+
Esculin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Glucanase	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Melzitose	+	+
Melibiose	+	+
Raffinose	+	+
Rhamnose	+	+
Saltin	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Xylose	+	+

Sugar	ادامه جدول ۲	
	Strains	
LO94	+	+
LO95	+	+
LO96	+	+
LO97	+	+
LO98	+	+
IL99	+	+
IL100	+	+
IL101	+	+
IL102	+	+
IL103	+	+
IL104	+	+
IL105	+	+
IL106	+	+
IL108	+	+
IL109	+	+
IL110	+	+
IL111	+	+
IL112	+	+
IL113	+	+
IL114	+	+
IL116	+	+
IL117	+	+
IL118	+	+
IL119	+	+
IL120	+	+
IL121	+	+
Amgdalin	+	+
Arabinose	+	+
Cellulose	+	+
Fescullin	+	+
Fructose	+	+
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Glucenate	+	+
Lactose	+	+
Maltose	+	+
Mannitol	+	+
Mannose	+	+
Meleziose	+	+
Melibiose	+	+
Raffinose	+	+
Rhamnose	+	+
Saltin	+	+
Sorbitol	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	+	+
Xylose	+	+
Growth at 15°C	+	+
Growth at 42°C	+	+

Sugar Strains	ادامه جدول ۲																							
	Amigdalin	Arabinose	Cellulobiose	Fescullin	Fructose	Galactose	Glucose	Glucanate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melzitiose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Saltin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15°C	Growth at 42°C	
IL122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL124	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL125	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL126	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL127	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL129	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL132	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL133	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL134	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

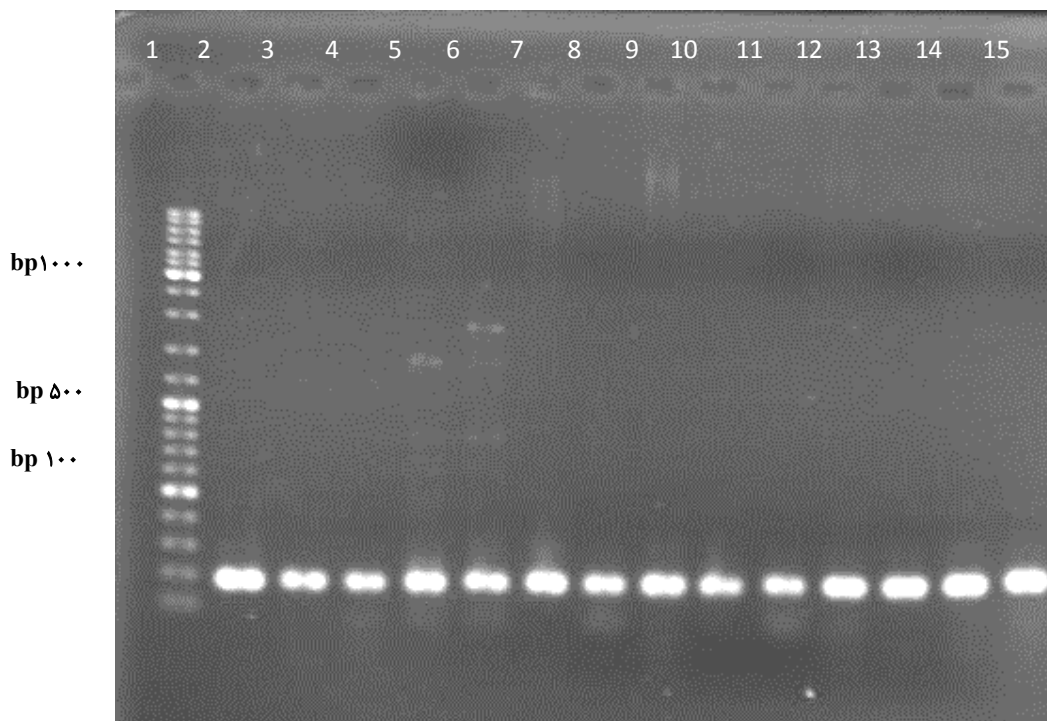
+: positive reaction
 -: negative reaction
 n: not determined

شد. تمامی سویه های جدا شده باند حدود ۲۰۰ جفت بازی اختصاصی جنس لاکتوباسیل را نشان دادند که در شکل شماره ۱ مشخص می باشد.

شناسایی باکتری ها به روش مولکولی

شناسایی جنس باکتری ها

با استفاده از آغازگر های R16-1 و LbLMA1-rev ، واکنش PCR برای شناسایی جنس لاکتوباسیل ها انجام



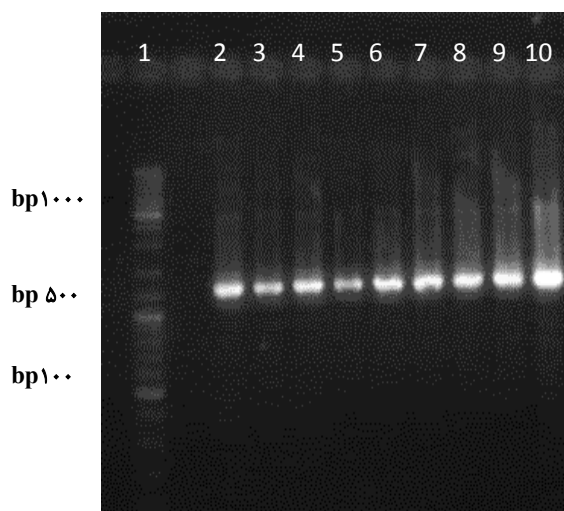
شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با استفاده از آغازگر های مخصوص جنس لاکتوباسیلوس. چاهک ۱ شاخص وزن مولکولی چاهک های ۲-۱۵ قطعه ۲۰۰ جفت بازی که معرف جنس لاکتوباسیلوس است.

بر اساس *16S rDNA* ارتباط فیلوژنتیکی سویه های (*IL125*, *LO90*) و (*IL121*, *KR43*) با هم و با دیگر سویه های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی و تعیین شد. در شکل ۳ سویه های (*IL125*, *LO90*) هر دو با ۹۹٪ شباهت لاکتوباسیلوس کروسستوروم هستند که با علامت لوزی در درخت فیلوژنی مشخص می-باشند و سویه های (*IL121*, *KR43*) هر دو با ۹۹٪ شباهت لاکتوباسیلوس فرمنتوم هستند که با علامت مثلث در درخت فیلوژنی مشخص می باشند. باکتری-های مذکور با شماره های *PTCC1751*, *PTCC1752*, *PTCC1753*, *PTCC1754* در بانک میکروبی ایران ثبت شدند.

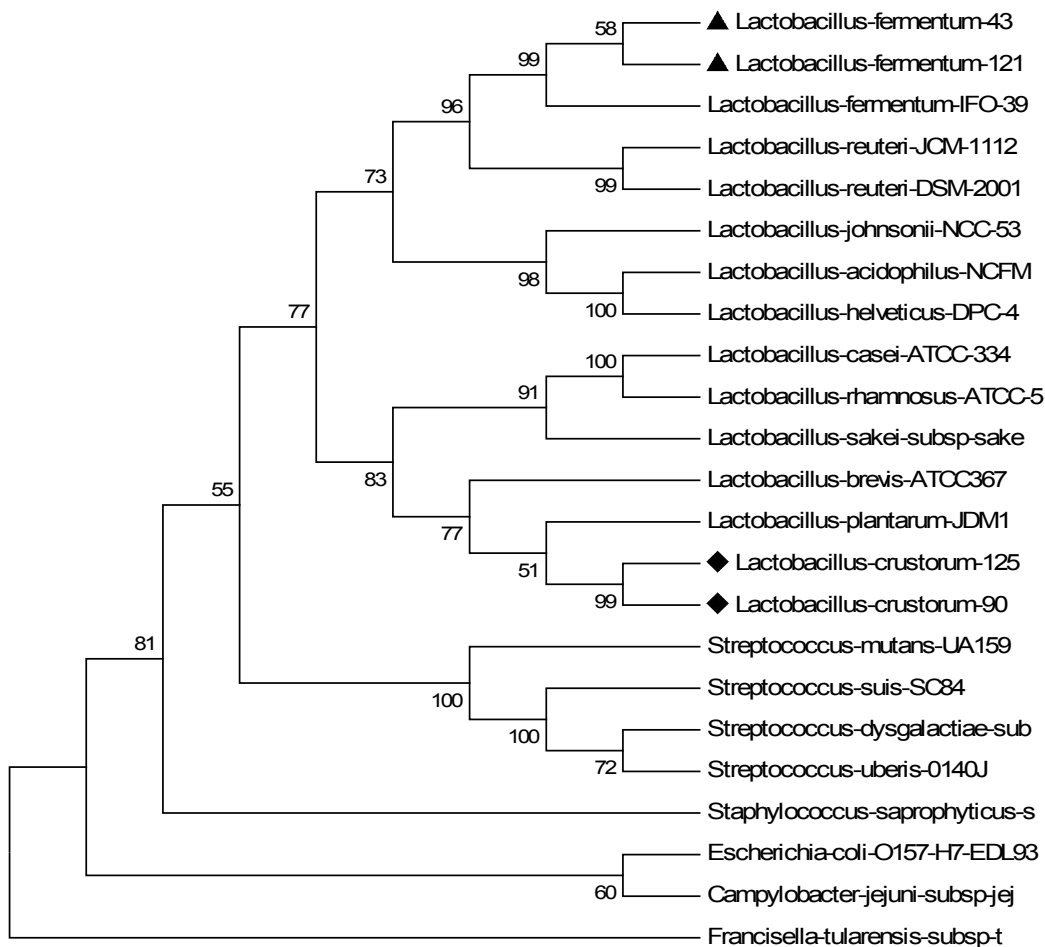
تکثیر *16S rDNA* کامل

واکنش زنجیره ای پلیمرز برای تکثیر کامل *16S rDNA* تعدادی از سویه های برتر لاکتوباسیل ها انجام شد. الکتروفورز تعدادی از نمونه های تکثیر یافته با استفاده از آغازگر های مخصوص *16S rDNA* لاکتوباسیلوس در شکل شماره ۲ مشاهده می شود. باند اختصاصی حدود ۱۵۰۰ جفت بازی تکثیر شد و پس از انجام آزمایشات تاییدی قطعه *16S rDNA*، چهار باکتری تعیین توالی شدند (شرکت ژن فن آوران). سپس در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره های FJ645922, FJ645923, FJ645924, FJ645925 ثبت شدند.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی



شکل ۲- الکتروفورز تعدادی از نمونه های تکثیر یافته با استفاده از آغازگر های مخصوص 16S rDNA لاکتوباسیلوس. چاهک اشخاص وزن مولکولی DNA. چاهک های ۱-۲ مربوط به تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی با استفاده از آغازگر های اختصاصی 16S rDNA



شکل ۳- تصویر درخت فیلوژنتیکی بر مبنای 16S rDNA بین سویه های (IL125, LO90) و سویه های (IL121, KR43) با دیگر سویه- های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI

بحث

بررسی با جداول مندرج در کتاب برجی^۱، سویه های *L. helveticus*, *L. delbrueckii* شناخته شده ای مانند: *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* *L. coryniformis* *torquens*. *casei*. *casei* شناسایی شدند. اما در این زمینه هم ملاحظاتی وجود دارد. یکی از سویه ها (*IL127*) شبیه به لاکتوباسیلوس پلانتروم بود اما می توانست رامنوز را تخمیر کند در حالی که لاکتوباسیلوس پلانتروم قادر به تخمیر این قند نیست. هم چنین سویه (*IL117*) شبیه لاکتوباسیلوس دلبروکی بلگاریکوس بود اما قادر به تخمیر سوکروز و گالاکتوز بود در صورتی که لاکتوباسیلوس دلبروکی بلگاریکوس این قدرت را ندارد.

آن چه مسلم است تست های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی محدودیت هایی دارد و در بین تعداد زیادی جدایه، خصوصیات فیزیولوژیکی مشابه ای دیده می شود. بعلاوه نتایج این روش ها همیشه دقیق نیست و جزئیات نتایج تنوع میکروب در فراورده های شیری تخمیر شده را نشان می دهد. چون این نتایج فقط بر پایه ی روش های کشت و خصوصیات فنوتیپی هستند. به همین دلیل در منابع توصیه شده که از روش های ژنتیکی همراه با آزمون های فنوتیپی برای تایید تشخیص سویه های جدا شده بهره گیری شود (FAO/WHO, 2002). در مورد استفاده از مارکرهای مولکولی برای شناسایی دقیق تر لاکتوباسیل ها روش هایی از قبیل RAPD^۲ (Fitzsimons N A, 1999; FAO/WHO, 2002)، هیبریداسیون DNA-DNA و همچنین مقایسه توالی نوکلئوتیدی 16S rDNA (FAO/WHO, 2002;) (Watanabe et al., 2008; Chammas et al., 2006) منابع مختلف ذکر شده است که دو روش اخیر دقیق تر می باشد (FAO/WHO, 2002). در این تحقیق نیز خصوصیات فنوتیپی سویه ها در شناسایی باکتری ها نقش داشت اما در بسیاری از سویه ها فقط با استفاده از خصوصیات بیوشیمیایی، شناسایی باکتری ممکن نبود چون تخمیر قند ها در بسیاری از سویه ها دقیقا مشابه سویه خاصی در کتاب برجی نبود. پس تعیین توالی 16S rDNA و مقایسه توالی آن با توالی های باکتری- های دیگر موجود در پایگاه داده های NCBI مقایسه شدند و

در این تحقیق سعی شده از به روز ترین روش ها برای جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی لاکتوباسیل ها استفاده شود. در منابع مختلف برای جداسازی باکتری ها از محیط کشت MRS استفاده شده و گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گزارش شده بود (Watanabe et al., 2008; Chammas et al., 2006; Pourahmad and Assadi, 2007). در این تحقیق نیز با استفاده از محیط کشت مذکور کلنی های تیپیک و خالص لاکتوباسیل بدست آمد. روش مرسوم در شناسایی لاکتوباسیل ها پس از جداسازی، آنالیز خصوصیات بیوشیمیایی آنها از جمله تخمیر قند ها است. در مورد شناسایی لاکتوباسیل ها از تخمیر قند ها استفاده می شود اما در منابع مختلف تعداد قند ها و نوع آنها متفاوت می باشد مثلا برخی مانند چاماس از کیت API استفاده نموده (Chammas et al., 2006) و برخی دیگر بدون کیت تخمیر قند هارا مورد بررسی قرار داده اند (Scheirlinck et al., 2007, Pourahmad and Assadi, 2007; Fitzsimons, 1999; Ayhan et al., 2005). در سال ۱۹۹۹ برای شناسایی تنها تخمیر هشت قند گلوکز، رامنوز، سلوبیوز، ملیبیوز، مانیتول، ریبوز، رافینوز و مانوز را آزمایش کرد (Fitzsimons N A, 1999). Ayhan و همکاران در سال ۲۰۰۵ تخمیر پنج قند اینولین، سالیسین، سوربیتول، مانیتول و لاکتوز را بررسی نمود (Ayhan et al., 2005). Pourahmad و Assadi در سال ۲۰۰۷ نیز تنها تخمیر هشت قند: گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، سوکروز، مالتوز، مانوز، تری هالوز و مانیتول را بررسی کرد (Pourahmad and Assadi, 2007). در بهترین گزارشات، Scheirlinck و Vandamme در سال ۲۰۰۷ تخمیر ۱۹ قند: آمیگدالین، آربوتین، گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، مانیتول، سوکروز، ملزیتوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، سوربیتول، تری هالوز، مالتوز، ریبوز، جنتیبیوز و تاگاتوز را آزمون کرد. در این تحقیق نیز از تخمیر ۱۹ قند: گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، مانوز، آرابینوز، رامنوز، گزیلوز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، تری هالوز، سلوبیوز، رافینوز، مانیتول، اینوزیتول، سوربیتول، سالیسین و اسکولین و گلوکونات برای شناسایی بیوشیمیایی لاکتوباسیل ها استفاده شد. با مقایسه نتایج شناسایی بیوشیمیایی باکتری های مورد

1- Bergeys

2- Randomly Amplified Polymorphic DNA

اصلی تشخیص گونه، مقایسه توالی کامل *16S rDNA* با توالی این ژن در دیگر لاکتوباسیل های گزارش شده در NCBI بود. این مقایسه نشان داد سویه KR43، ۹۹٪ شباهت به *L. fermentum* دارد. از آنجا که برجی (Bergeys, 2005) نیز یکی از مکان های جداسازی این باکتری را فراورده های لبنی ذکر می کند، پس جداسازی سویه KR43 از ماست سنتی و شناسایی آن به عنوان *L. fermentum* می تواند قابل قبول باشد. سویه KR43 بجز تخمیر گلوکونات و مالتوز و ملیبیوز شبیه به *L. fermentum* بود. لازم به ذکر است که این باکتری نیز نظیر سویه *IL121* توانایی تولید استالدئید به میزان 20 ± 1.7 mg/kg را دارا می باشد (Ghobadidana et al., 2010, Ghobadi et al., 2011).

دو سویه *IL121* و *KR43* از نظر توالی *16Sr DNA* شبیه به *L. fermentum* بودند. اما با توجه به این که سویه های مورد نظر از محل های کاملاً دور از هم نمونه برداری شده اند (یکی از استان کرمانشاه و دیگری از استان ایلام) و هر کدام خصوصیات بیوشیمیایی منحصر به فرد دارند یعنی از نظر تخمیر قند ها کاملاً مثل هم نیستند و با هم تفاوت هایی دارند، قرابت ژنتیکی آنها به همراه شباهت در توانایی تولید استالدئید بسیار جالب توجه است.

این دو باکتری *L. roteri* قرابت ژنتیکی زیادی دارند. البته در گذشته تصور می شد که *L. fermentum* و *L. roteri* متعلق به یک گونه هستند اما Kelin در سال ۱۹۹۸ نشان داد که *L. roteri* و *L. fermentum* هر کدام گونه مستقلی می باشند. طبق آنالیز های انجام شده دو سویه *KR43*، *IL121* به *L. jansonii* و همچنین به *L. acidophilus* و *L. helveticus* نیز قرابت ژنتیکی دارند (شکل ۳).

سویه *IL125* (PTCC1754) از نمونه ماست گوسفندی از روستای جعفرآباد واقع در بخش میش خاص در استان ایلام جدا شد. در مقایسه نتایج حاصل از تخمیر قند های این سویه با جدول برجی مشاهده شد که این سویه با هیچ کدام از لاکتوباسیل های مندرج در این کتاب شباهت ندارد. از مقایسه ارتباط فیلوژنتیکی بر اساس *16S rDNA* با دیگر سویه های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI نشان داد که سویه *IL125* با *L. crustorum* در یک مجموعه قرار می گیرند.

بر اساس مشابهت توالی *16S rDNA* باکتری مورد آزمون این تحقیق با توالی باکتری های دیگر گزارش شده مشخص شد که باکتری مربوط به چه گونه ای است. بنابراین شناسایی مولکولی و شباهت توالی *16S rDNA* باکتری ها نقش تعیین کننده دارد.

در فرایند تکثیر و تعیین توالی ژنهای *16S rDNA*، در مرحله اول از آغازگر مخصوص شناسایی جنس استفاده شد. نتیجه این تکثیر، شناسایی بیوشیمیایی سویه ها را تأیید نمود. به این ترتیب که همه باکتری هایی که از نظر واکنش های بیوشیمیایی لاکتوباسیل شناخته شده بودند، پس از تکثیر با آغازگر جنس نیز لاکتوباسیل شناسایی شدند. در زیر توضیحاتی در مورد چهار نمونه از سویه هایی که دقیقاً شناسایی شده اند آمده است:

سویه *IL121* (PTCC1753) از نمونه ماست گوسفندی از روستای کلاه کبود واقع در بخش میش خاص در استان ایلام جدا شد. شناسایی این سویه از طریق بیوشیمیایی بسیار مشکل بود و شبیه به هیچکدام از لاکتوباسیل های جدول برجی نبود. اما پس از تعیین توالی *16S rDNA* و مقایسه توالی آن با توالی *16S rDNA* دیگر باکتری های گزارش شده، نشان داد که این باکتری ۹۹٪ شباهت به *L. fermentum* دارد. نتایج حاصل از تخمیر قند های این باکتری تفاوت های زیادی را با تخمیر قند های *L. fermentum* نشان می داد. چون از میان ۱۹ قند فقط تخمیر ۱۴ قند به سویه فرمنتوم شبیه بود (به جز تخمیر گلوکونات، مالتوز، ملیبیوز، سوکروز و سالیسین شبیه به *L. fermentum* بود. در عوض این سویه می تواند سالیسین را تخمیر کند در صورتی که *L. fermentum* نمی تواند سالیسین را تخمیر کند. لازم به ذکر است که این باکتری توانایی تولید استالدئید به میزان 20 ± 1.7 mg/kg را دارا می - باشد (Ghobadidana et al., 2010; Ghobadi Dana et al., 2011).

سویه *KR43* (PTCC1751) که از نمونه ماست گاوی جوشیده از روستای مال میر واقع در منطقه چمچمال در استان کرمانشاه جدا شده بود. شناسایی این سویه بر اساس تخمیر قند ها نشان می دهد که این سویه جزء لاکتوباسیل های ناجور تخمیر بوده ولی دقیقاً نمی توان آن را به هیچ کدام از گونه های جدول برجی نسبت داد اما شباهت زیادی به *L. fermentum* دارد. اما مبنای

Ward and) با هم قرابت ژنتیکی زیادی دارند (Timmins, 1999).

اختلاف این باکتری‌ها در مصرف قند و عدم انطباق با جداول ارئه شده ممکن است ناشی از جهش در یک یا تعدادی از ژن‌های مربوط به آنزیم‌های حد واسط در تخمیر قندها باشد. شاید در طول تکامل و با توجه به شرایط محیطی این باکتری نیاز به تخمیر این قند نداشته است، بنابراین ژن مربوط به آن دچار جهش یا حذف شده باشد. به نظر می‌رسد که ثبات شرایط محیطی این باکتری‌ها که ناشی از باورهای افراد و خانواده‌ها است (حفظ سویه‌ها در درون یک خانواده و عدم تداخل با نمونه‌های سایر خانواده‌ها) موجب گردیده که باکتری نیاز به جبران یا اصلاح مسیر بیوشیمیایی نداشته باشد. اما مسئله مهم که در این تحقیق نیز ثابت شد این است که مطالعات مولکولی و مقایسه توالی DNA در مکانهای خاص مانند *16S rDNA* می‌تواند بسیار دقیق‌تر از خصوصیات بیوشیمیایی در تشخیص گونه‌ها عمل کند.

به نظر می‌رسد که جمع‌آوری مشخصات سویه‌های بومی هر ناحیه از کشور می‌تواند منشأ باکتری‌های اسید لاکتیک جدید بوده و علاوه بر حفظ ذخایر میکروبی و ژنتیکی، اطلاعات مفید برای کاربردهای علمی و تجاری بخصوص در زمینه صنایع لبنی ارائه نماید. همچنان که در جهان مراکز بسیار پیشرفته‌ای نیز وجود دارند که در زمینه باکتری‌های اسید لاکتیک با بهره‌گیری از ژنومیکس و پروتئومیکس باکتری‌ها تحقیقات هدف‌داری را برای کاربردی کردن میکروارگانیسم‌های مورد مصرف در فرآیندهای تخمیر صنعتی انجام می‌دهند، شایسته است که ساختاری منسجم برای جمع‌آوری، حفظ و کاربردی کردن باکتری‌های اسید لاکتیک در کشور ایجاد گردد.

تشکر و قدردانی

از اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان‌های ایلام، کردستان، کرمانشاه، لرستان و مرکزی که در نمونه برداری از مناطق مختلف ما را یاری کردند و از پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری که اجرای این تحقیق با مساعدت آنها انجام پذیرفت، تشکر و قدردانی می‌شود.

با بررسی‌های انجام شده مشخص شد که این گونه باکتری در مجله سیستماتیک میکروبیولوژی به عنوان باکتری جدید گزارش شده اما هنوز این گزارش در کتاب برجی وارد نشده است (Scheirlinck et al., 2007). از ویژگی‌های بسیار مهم سویه *IL 125* (*PTCC1754*) که خاصیت پروبیوتیکی به آن می‌دهد توانایی تولید فولیک اسید به میزان $66.6 \pm 1.76 \mu\text{g/l}$ است (Ghobadi Dana, 2010). لاکتوباسیل‌ها به عنوان مصرف‌کننده اسید فولیک مطرح بودند اما داده‌های جدید تر توانایی تولید اسید فولیک را در این باکتری‌ها اثبات کرد. گرچه سطح تولید در این باکتری‌ها محدود می‌باشد اما این میزان توانایی در تولید اسید فولیک ارزش تجاری این سویه‌ها را نیز مطرح می‌سازد.

سویه *LO90* (*PTCC1752*) از نمونه دوج گاوای از خانواده‌ای از روستای چشمک واقع در بخش ویسیان در استان لرستان جدا شد. این باکتری توانایی تولید فولیک اسید به میزان $55.6 \pm 1.69 \mu\text{g/l}$ را دارا می‌باشد (Ghobadi, 2010). در مقایسه نتایج حاصل از تخمیر قند‌ها ی این سویه با جدول برجی مشاهده شد که این سویه نیز مانند هیچ کدام لاکتوباسیل‌های مندرج در این کتاب نیست. از مقایسه ارتباط فیلوژنتیکی براساس *16Sr DNA* با دیگر سویه‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص شد که سویه *LO90* لاکتوباسیلوس کروستوروم است (Scheirlinck et al., 2007). البته *L. crustorum* توانایی تجزیه‌ی اسکولین را دارد اما این سویه این توانایی را ندارند.

دو سویه *IL125*، *LO90* از محل‌هایی با فاصله مکانی نسبتاً دور از هم (یکی از آنها از استان ایلام و دیگری از استان لرستان) نمونه برداری شده‌اند. شرایط محیطی حاکم بر محیط رشد این ارگانیسم‌ها کاملاً متفاوت است و حتی هر کدام خصوصیات بیوشیمیایی منحصر به فردی از نظر تخمیر قند‌ها دارند، ولی قرابت ژنتیکی آنها به همراه شباهت در توانایی در تولید فولیک اسید بسیار جالب توجه است. این مسئله می‌تواند اثرات سایر عوامل و به ویژه میانکنش بین میکروارگانیسم‌ها را مطرح کند. این دو باکتری قرابت زیادی با *L. farcimis*، *L. kimchi*، *L. brevis*، *L. Plantarum* و به ویژه *L. casei* و *rhamnosus* دارند. قبلاً نیز وارد و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کرده بودند که *L. rhamnosus* و

منابع

- ۱- اجدانی، ه. و ملکزاده، ف. ۱۳۸۰. شناسایی سویه های استارترهای بومی مولد ماست، جداسازی نگهداری و بررسی نقش هریک از آنها: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم.
- ۲- بارویی، الف. و کرباسی، م. ۱۳۷۹. ارزیابی باکتریهای اسیدلاکتیک موجود در فراورده های لبنی سنتی (پنیر) برای تولید استارتر در مقایسه با استارترهای تجاری: دانشگاه شیراز.
- ۳- جان جانی، م. ۱۳۸۱. بررسی نقش و اهمیت استارتر در فراورده های پنیر چدار آنزیم لیپولیتیک: جهادسازندگی خراسان.
- ۴- طاهری، الف. و احسانی، م. ۱۳۸۴. بررسی امکان تولید و نگهداری نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با استفاده از کشت باکتریایی گرما دوست و میاندوست دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران.
- ۵- فاضلی، ع. ۱۳۸۲. آزمایشگاهی انتروتوکسیکوژنیک توسط لاکتوباسیل کازئی در مدل موش E-Coli بررسی کاهش کلونیزاسیون: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.
- ۶- کازرونی، الف. و احسانی، م. ۱۳۸۲. تاثیر افزودن باکتریهای استارتر حرارت دیده و پروتئوزهای تجارتي در تسريع رسانیدن پنیر سفید ایرانی - مؤسسه تحقیقات علوم دامی.
- ۷- گمرک ۱۳۸۳. اطلاعات آمار صادرات و واردات کشور.
- ۸- محمدی، م. ۱۳۸۳. بررسی اثر مهارى لاکتوباسیل اسیدفیلوس بر روی سویه های بیماریزای اشرشیاکلای در طیور.
- ۹- نوحی، الف. ۱۳۶۷. میکروبیولوژی عمومی: مؤسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران.
- 10- Ayhan, K., Durlu-ozkaya, F., & Tunail, N. 2005. Commercially important characteristics of Turkish origin domestic strains of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *International Journal of Dairy Technology*, 58: 150-157.
- 11- Bergeys. 2005. *Manual of determinative bacteriology*.
- 12- Beukes, E. M., Bester, B. H., & Mostert, J. F. 2001. The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63: 189-197.
- 13- Carl, B. 1999. *Lactobacillus*. Academic press.
- 14- Chammas, G. I., Saliba, R., Corrieu, G., & Beal, C. 2006. Characterisation of lactic acid bacteria isolated from fermented milk "laban". *International Journal of Food Microbiology*, 110: 52-61.
- 15- FAO/WHO. 2002. *Guidelines for the evaluation of probiotics in food* London Ontario.
- 16- Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S. & Beresford, T. 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 3418 - 3426.
- 17- Ghobadi dana, M., Salmanian, A. H., Yakhchali & Rastegar Jazii, F. 2010. High folate production by naturally occurring *lactobacillus* Spp. with probiotics potential, isolated from dairy products in Ilam and Lorestan provinces of Iran. *African Journal of iotechnology*, 9: 5383-5391.
- 18- Ghobadi Dana, M., Yakhchali, B., Salmanian, A.H., & Rastgarjazi Jazii, F. 2011. High-level acetaldehyde production through a putative acetoin dehydrogenase complex by indigenous *lactobacillus* strain obtained from traditional dairy products of Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 5(25): 4398-4405.
- 19- Ghobadi Dana, M., Salmanian, A.H., Yakhchali, B. & Rastgarjazi Jazii, F. 2010. High-level acetaldehyde production by wild type *lactobacillus* strains isolated from traditional dairy products of Iran. 22nd International ICFMH Symposium, FoodMicro 2010. Denmark.
- 20- Hammes, V. 1995. *The genus Lactobacillus*, London, Chapman and Hal.l.
- 21- IDF149, I. 2008 Milk products -Acidifying starter cultures- Standard of identify.
- 22- Scheirlinck, I., Meulen, R.V., Schoor, A.V., Huys, G., Vandamme, P., Vuyst, L.D. & Vancanneyt, M. 2007. *Lactobacillus crustorum* sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57: 1461-1467.
- 23- Jokovic, N., Nikolic, M., Begovic, J., Jovcic, B., Savic, D., & Topisirovic, L. 2008. A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 305-311.

- 24- Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., Van De Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., Van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., DE VOS, W., Weimer, B., Zagorec, M., & Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, 82: 29-58.
- 25- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., & Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125.
- 26- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Pinto, C., Egunlety, M., Sossa, C., Mbugua, S., Dortu, C., Thonart, P., Taljaard, L., Mengu, M., Franz, C.M.A.P & Holzapfel, W.H. 2007. Characterization and biochemical properties of predominant lactic acid bacteria from fermenting cassava for selection as starter cultures. *International Journal of Food Microbiology*, 114(3): 342-351.
- 27- Krieg N R., Holt, J. G. 1984. *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wikins.
- 28- Kwon, H. S., Yang, E. H., Yeon, S. W., Kang, B. H., & Kim, T. Y. 2004. Rapid identification of probiotic *Lactobacillus* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 239: 267-275.
- 29- Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., & Holzapfel, W. H. 2004. Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: The Maasai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 269-278.
- 30- Nour, M. 1998. 16S-23S and 23S-5S intergenic spacer regions of lactobacilli: Nucleotide sequence, secondary structure and comparative analysis. *Research in Microbiology*, 149: 433-448.
- 31- Pourahmad, R., & Assadi, M. M. 2007. Use of isolated autochthonous starter cultures in yogurt production. *International Journal of Dairy Technology*, 60: 259-262.
- 32- Rossetti, L., Fornasari, M. E., Gatti, M., Lazzi, C., Neviani, E., & Girraffa, G. 2008. Grana Padano cheese whey starters: microbial composition and strain distribution. *International Journal of Food Microbiology*, 127: 168-171.
- 33- Schillinger, U. 2005. Identification of predominant Lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas. *International Journal of Food Microbiology*, 105: 347-356.
- 34- Standard, I. 2003. Yogurt-identification of characteristic microorganisms (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*). ISO9232 IDF146.
- 35- Standard, I. 2005. Foodstuffs- Methods of analysis for the detection of genetically modified organisms and derived product-nucleic acid extraction. IN ISO21. Ed. 571.
- 36- Standard, I. 2006. Milk products - enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium - Colony-count technique at 37 °C. IN IDF192, I.
- 37- Ward, L. J. H., & Timmins, M. J. 1999. Differentiation of *lactobacillus casei*, *lactobacillus paracasei* and *lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 29: 90-92.
- 38- Watanabe, K., Fujimoto, J., Sasamoto, M., Dugersuren, J., Tumursuh, T., & Demberel, S. 2008. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 1313-1325.

Isolation and identification of indigenous *Lactobacilli* in traditional dairy products in Iran

M. Ghobadi Dana¹, A. Hatef Salmanian*², B. Yakhchali³

1- Assistant Professor, Department of Microbiology, Standard Research Institute

2- Associated Professor, Department of Plant Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

* Corresponding author (salman@nigeb.ac.ir)

3- Associated Professor, Department of Industrial and Environmental Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology

Abstract

One hundred and twelve traditional dairy samples including yoghurt, doogh and raw milk were collected from Kermanshah, Kurdistan, Lorestan, Ilam and Markazi provinces in Iran. The bacteria were isolated based on standard procedure. The samples were sub-cultured on selective media, typical colonies were examined microscopically and finally ninety three bacteria were selected for further analyses. The isolated bacteria were characterized by fermentation of 19 sugars and growing in 15 and 45 °C, nitrate reduction, gelatin solidification and esculin degradation. In order to confirm the biochemical results, molecular analysis such as amplification of lactobacillus genus specific fragment with specific primer was carried out. The results showed that all isolates belong to lactobacillus. Four lactobacillus with specific properties were further identified by amplification and sequencing of 16S rDNA gene. These genes were submitted to gene bank in NCBI. The phylogenetic tree was constructed after comparing with other 16S rDNA genes. Results showed that two strains were similar to *Lactobacillus crustorum* which was recorded recently.

Keywords: Dairy product; Iran; *Lactobacillus*; Molecular biology