JRIFST

www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1391، جلد 1، شماره 2، صفحات 99-116
DOI: 10.22101/JRIFST.2012.06.21.123

جداسازی و شناسایی مولکولی لاکتوباسیل های موجود دربرخی از فرآورده های لبنی بومی

مریم قبادی دانا[1]، علی هاتف سلمانیان[*2]، باقر یخچالی[3]

1- استادیار گروه میکروبیولوژی، پژوهشگاه استاندارد
2- دانشیار گروه بیوتکنولوژی گیاهی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری
*نویسنده مسئول (salman@nigeb.ac.ir)
3- دانشیار گروه زیست فناوری صنعت و محیط زیست، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

چکیده

یکصد و دوازده نمونه فراورده 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 آنالیز های بعدی انتخاب شدند. به منظور شناسایی بیوشیمیایی سویه ها تخمیر 19 قند، همچنین رشد در دمای 15 و 45 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 سالهای اخیر گزارش شده است.

تاریخ دریافت : 90/2/26
تاریخ پذیرش : 90/8/30

واژه های کلیدی
ایران
زیست شناسی مولکولی
فراورده لبنی
لاکتوباسیلوس

مقدمه

مطابق تعریفی که فدراسیون بین المللی محصولات لبنی[1] (IDF) و سازمان جهانی استاندارد[2] (ISO) در سال 2008 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 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, Pediococcus, Streptococcus* و *Lactobacillus* هستند (IDF149, 2008).

1- International Dairy Federation
2- International Standard Organization

جنس *لاکتوباسیلوس* شامل گونه های متنوعی می-باشد. *لاکتوباسیل* ها باکتری های میله ای شکل به طول 1-10 و عرض0/5-1/2 میکرون می باشند. این باکتری-ها همین[1] (سیتوکروم، کاتالاز) ندارند ولی در مجاورت اکسیژن هوا رشد می کنند و میکروآئروفیل بوده، در حضور هوا رشد کمی دارند و وجود 5٪ دی اکسید کربن در محیط باعث تحریک رشد آنها می شود. دمای بهینه رشد آنها بین 40-30 درجه سلسیوس می باشد اما توانایی رشد تا دمای 53-50 درجه سلسیوس را نیز دارند. *لاکتوباسیل* ها قدرت تحمل اسید را در محیط داشته و گر چه pH بهینه برای رشد آنها 5/8-5/5 می باشد اما بطور کلی در pH کمتراز 5 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 *آنتروباکتریاسه* که آنها هم اسیدلاکتیک تولید می کنند، *لاکتوباسیل ها* تخمیر کننده اجباری هستند (نوحی، 1367) .

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 2001 در افریقای جنوبی و نامیبیا از نمونه های محصولات لبنی سنتی به نام amasi *L.delbruki lactis* و *L.plantarum* را جداسازی و شناسایی نمودند. Mathara و همکاران در سال 2004 در کشور کنیا از نمونه های محصولات لبنی سنتی به نام Kule naoto که pH آن کمتراز 4/5 است توانستند باکتری های *L. Plantarum, L. fermentum, .L. paracasei, L.acidophilus* را شناسایی نمایند . Ayhan و همکاران نیز در سال 2005 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 2005 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 ,gundruk، sinki و khalpi توانستند *L.brevis* و *L.plantarum* را جداسازی و شناسایی نمایند (Schillinger, 2005). Kostinek و همکاران در سال 2007 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 2008 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 2008 در شمال ایتالیا از نمونه های پنیر سنتی به نام Grana padano دو گونه از لاکتوباسیلها و یک گونه استرپتوکوک را به صورت غالب جدا نمودند. این باکتری‌ها شامل *L. delbrukii lactis* , *L.helveticus* و *Streptococcus thermophillus* بودند.

مطالعاتی که در ایران در زمینه لاکتوباسیل ها صورت گرفته بیشتر با هدف کاربرد در صنایع غذایی و بهینه سازی کیفیت فراورده 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، 1383؛ فاضلی،1382؛ بارویی، 1379) همچنین تحقیقاتی با استفاده از بررسی قابلیت زیست *بیفیدوباکتر* در دوغ صورت گرفته است و نتایج تحقیق نشان می دهد که *بیفیدوباکتر* در دوغ زنده مانده پس می توان از این فراورده غذایی به عنوان پایه برای این پروبیوتیک استفاده نمود. (بارویی، 1379). کارهای مشابهی در زمینه استفاده از باکتری های اسیدلاکتیک بومی در زمینه فرآوری پنیر انجام شده است (جان‌جانی، 1381؛ کازرونی، 1382). 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 جداشده بومی توانایی تولید ماست با کیفیت مناسب را در آزمایشگاه دارا می باشند (اجدانی، 1380). احسانی و همکاران طی پایان نامه کارشناسی ارشد به بررسی اثر باکتری های

1- Hemmin

گرمادوست و میاندوست در تولید نوشیدنی های تخمیری پرداخته است در این تحقیق از سویه های وارداتی استفاده شده است (طاهری، 1384).

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 کاملا 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، 1383). این وابستگی در حدی است که اگر محدودیتی در مورد فروش استارتر ها 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 16*S* *r*DNA) 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 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[1] در محیط کشت MRS برای جداسازی سویه های باکتریایی بومی مولد ماست انجام شد. پس از گرمخانه گذاری در شرایط میکروآئروفیل و در دمای 37 درجه سلسیوس کلنی های تشکیل شده روی سطح و درون محیط کشت از نظر خواص مورفولوژیکی و میکروسکوپی بررسی شدند. سویه های جداشده براساس محل نمونه برداری شماره گذاری شدند (سویه های جداشده از استان کرمانشاه با پیشوند KR، سویه های جداشده از استان ایلام با پیشوند IL، سویه های جداشده 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 جداشده انجام شد.

برای شناسایی احیا نیترات، باکتری ها را در آبگوشت حاوی 1% KNO_3 به مدت 24 ساعت کشت داده شد. سپس با افزودن یک دهم میلی لیتر از مخلوطی با حجم مساوی از معرف A (اسید سولفانیلیک[2]) و معرف B (آلفا نفتیل آمین[3]) 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 می‌شود. جهت

1- Pour plate

2- معرف A: اسید سولفانیلیک: هشت گرم اسید سولفانیلیک در 1000 میلی لیتر اسید استیک پنج نرمال است.

3- معرف B: آلفانفتیل آمین: پنج گرم آلفانفتیل آمین در 1000 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 37 درجه سلسیوس به مدت 24 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 24 ساعت در دمای 37 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 37 درجه سلسیوس به مدت 18 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 37 درجه سلسیوس ب مدت 5-3 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 15 و 45 درجه سلسیوس در محیط MRS مایع بررسی شد.

سپس برای تایید جنس لاکتوباسیل و شناسایی بیوشیمیایی این باکتری ها از منوساکاریدهای شش کربنی (هگزوز): گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز و مانوز، مونوساکارید های پنج کربنه (پنتوز): آرابینوز، رامنوز و گزیلوز، از دی ساکاریدها: سوکروز، لاکتوز، مالتوز، تره هالوز و سلوبیوز، تری ساکارید ها: 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 0/5 تا 1 درصد برسد. سپس محیط کشت مایع تلقیح شده با باکتری در 37 درجه سلسیوس به مدت 5-3 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 R16-1:5´-CTTGTACACACCGCCCGTCA -3´ و LbLMA1-rev:5´-CTCAAAACTAAACAA AGTTTC-3´ واکنش زنجیره ای پلیمراز با شرایط زیر نجام گرفت:

دمای دناتوره شدن اولیه 95 درجه سلسیوس و مدت زمان آن 5 دقیقه بود. سپس سی چرخه شامل 40 ثانیه در دمای 95 درجه سلسیوس40 ثانیه در دمای 53 درجه سلسیوس و 40 ثانیه در دمای 72 درجه سلسیوس انجام شد. پس از این مراحل نمونه ها به مدت 5 دقیقه در دمای 72 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.

idl16r09R:5´TACCTTGTTACGACTTCACC-3´, .idl16r08F:5´AGAGTTTGATCCTGGCTCA3´

شرایط تکثیر شامل دمای دناتوره شدن اولیه 95 درجه سلسیوس و مدت زمان 5 دقیقه و در ادامه سی چرخه شامل 40 ثانیه در دمای 95 درجه سلسیوس90 ثانیه در دمای 57/6 درجه سلسیوس و 90 ثانیه در دمای 72 درجه سلسیوس انجام بود. سپس 5 دقیقه در دمای 72 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 1/5٪ الکتروفورز گردید، تا غلظت نمونه تخمین زده شود. مراحل اتصال قطعه و ناقل pTZ57R/T و در دمای 4 درجه سلسیوس به مدت 4-3 ساعت انجام شد. سپس سلول های مستعد DH5α تهیه و محصول ligation به روش شوک حرارتی به داخل آن

منتقل گردید. سلول های تراریخت شده *E.coli* DH5α بر روی محیط LB حاوی آنتی بیوتیک آمپی سیلین(100 mg/lit)، *Xgal* (40 µg/lit) و IPTG (200µM) 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[1] *Xba*I و *Sac*I 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 Clastal w هم ردیفی چندتایی انجام شد و سپس توسط برنامه MEGA4 و 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 6000 ساله انتخاب شدند. در این مناطق تولید صنعتی محصولات لبنی امکان پذیر نیست و این فراورده ها به صورت سنتی و در منازل تهیه می شوند. جدول شماره 1 تعداد و منابع نمونه های فراورده لبنی سنتی تهیه شده از استانهای غربی کشور را نشان می دهد.

جداسازی *لاکتوباسیل ها*

مجموعا 93 سویه *لاکتوباسیل* از 112 نمونه دوغ و ماست سنتی مختلف جدا شد. 32 سویه از استان ایلام، 23 سویه از استان کرمانشاه، 17 سویه از استان کردستان، 17 سویه از استان لرستان و 3 سویه دیگر از استان مرکزی جدا شد. تمامی سویه های جدا شده 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 19 قند و محصولات تخمیر و رشد در 15 و 45 درجه سلسیوس به عنوان کلید فنوتیپی برای تشخیص سویه ها استفاده شد که نتایج آن در جدول 2 مشاهده می شود.

بیشتر سویه های جدا شده قادر به تخمیر گلوکز (95/6٪)، لاکتوز (94/6٪)، فروکتوز (91/3٪)، گالاکتوز (78/4٪)، سوکروز (86٪) و مانوز84/9٪ بودند اما تعداد کمی از آنهاً توانایی تخمیر سوربیتول (8/6٪)، ملزیتوز (6/4٪)، رامنوز (12/9٪)، سلوبیوز (26/8٪)، گلوکونات (19/3٪)، ملیبیوز (22/5٪)، ترهالوز (25/8٪) و گزیلوز(30/1٪) را داشتند. برخی از آن ها می توانند آمیگدالین (41/9٪)، آرابینوز (43٪)، مالتوز (35/4٪) و سالیسین (32/2٪) را تخمیر کنند و 24/7٪ از سویه ها نیز می توانستند اسکولین را تجزیه نمایند.

1- Double digestion

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

استان	ماست			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

strains \ Sugar	Amigdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15°C	Growth at 42°C
ATCC9595	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	n	-	-	+	+	+	+	n	-	-	+
ATCC393	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	n	-	-	-	+	-	+	n	-	-	+
ATCC7830	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	n	-	-	-	+	-	+	n	-	-	+
ATCC314	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	n	+	+	-	+	-	+	n	-	-	+
KR5	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	n	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
KR7	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+
KR8	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
KR14	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KR15	n	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KR16	n	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KR19	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+
KR22	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	n	-	+	+	+	+	n	+	-	+
KR24	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
KR25	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KR27	-	-	-	n	+	+	+	+	+	+	n	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
KR29	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	n	-	+	-	-	-	+
KR30	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	n	n	+	+	-	+	n	+	-	+
KR31	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	n	n	+	-	+	-	-	n	-	-	+
KR32	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	+	-	+	-	+	n	-	-	+
KR33	n	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
KR35	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	-	+	+	+	-	+
KR36	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
KR37	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
KR38	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	n	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
KR40	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	n	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
KR41	n	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	n	+		+
KR43	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KO48	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	n	n	+	-	-	-	+	+	-	-	+
KO49	n	n	-	-	±	+	+	-	+	-	+	+	n	n	+	-	-	-	+	-	-	-	+

ادامه جدول ۲

Strains \ Sugar	Amigdalin	Arabinose	Cellobiose	Escuilin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15ºC	Growth at 42ºC
KO50	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	n	-	-	+	+	+	n	-	-	+
KO54	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	n	n	+	-	+	-	+	n	-	-	+
KO55	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+	n	-	-	+
KO56	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
KO57	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	n	n	+	+	-	-	+	-	-	-	+
KO59	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	n	n	-	+	-	+	+	-	-	-	+
KO60	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	n	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+
KO61	n	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	n	+	-	+
KO63	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	+
KO67	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	n	n	+	-	-	-	+	+	-	-	+
KO68	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	n	+	-	+
KO69	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	n	n	-	-	-	+	+	+	-	-	+
KO70	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+
KO72	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	-	+
KO73	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	n	-	-	+
LO74	n	n	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	n	n	-	+	n	-	n	+	-	-	+
LO75	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	-	-	n	-	+	n	n	-	+
LO76	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	+	n	n	-	+
LO77	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	n	+	-	n	-	+
LO80	+		-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	n	+	+
LO81	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	+	+	+	+	-	+
LO83	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	n	+	-	+	-	+
LO84	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+
LO86	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
LO90	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	n	+	+	+	-	+
LO92	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	n	+	-	-	-	+
LO93	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+

ادامه جدول ۲

Strains \ Sugar	Amigdalin	Arabinose	Cellobiose	Escuilin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15ºC	Growth at 42ºC
LO94	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	n	+	-	-	-	+
LO95	n	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	n	+	-	+	-	+
LO96	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	n	+	+	+	-	+
LO97	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	n	n	+	+	+	-	+
LO98	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	-	-	-	+
IL99	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	n	-	+
IL100	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	n	-	+	+
IL101	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	+	-	-	+	+
IL102	n	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	n	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
IL103	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	+	-	+	+	+	n	-	-	-
IL104	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	n	-	+	+
IL105	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	+	+
IL106	n	n	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	n	+	-	-	+	+
IL108	+	+	+	+	+	-	n	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+	n	+	-	-	-	+
IL109	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	-	+	-	-	+
IL110	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+
IL111	-	+	+	+	+	+	n	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	n	+	+	-	+	+
IL112	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	-	-	-	-
IL113	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	n	-	-	-	+	-	-	n	-	+	+
IL114	n	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	n	+	+	-	+	+
IL116	n	n	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	-	-	-	+
IL117	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
IL118	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	n	+	+	+
IL119	n	n	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	n	-	-	-	-	+
IL120	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	+	-	+	-	+
IL121	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	n	+	+	+

ادامه جدول ۲

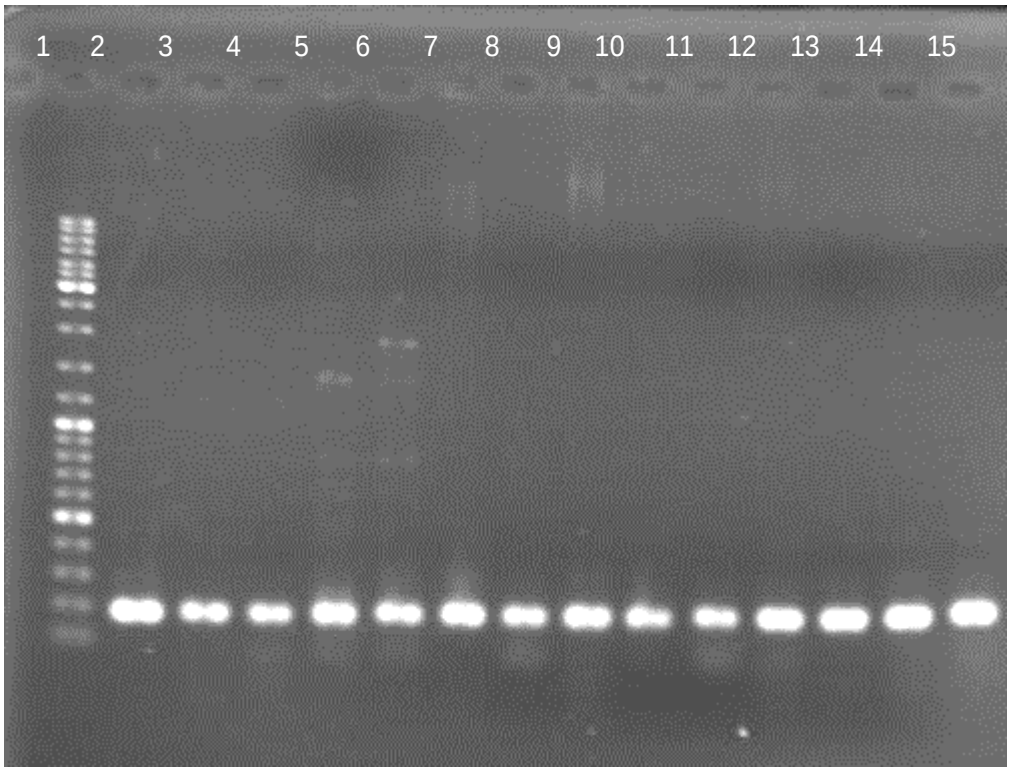
Strains \ Sugar	Amigdalin	Arabinose	Cellobiose	Escuilin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	Growth at 15°C	Growth at 42°C
IL122	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	-	-	+
IL123	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	+	-	-	-	+
IL124	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	n	+	-	-	+	+
IL125	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	n	-	+	-	+	-	-	n	±	+	+
IL126	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	n	+	-	-	+	+
IL127	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n	+	+	+	+	+
IL128	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	n	+	+	+	+	-
IL129	n	n	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	n	+	-	-	+	+
IL131	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	n	-	+	+
IL132	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	+	-	-	-	+	n	-	+	+
IL133	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	n	+	-	-	-	+
IL134	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	n	+	-	-	-	+	n	-	+	+

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

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 شد. تمامی سویه های جدا شده باند حدود 200 جفت بازی اختصاصی جنس *لاکتوباسیل* را نشان دادند که در شکل شماره 1 مشخص می باشد.



شکل 1- الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر با استفاده ازآغازگر های مخصوص جنس *لاکتوباسیلوس*. چاهک 1 شاخص وزن مولکولی چاهک ها ی 2-15 قطعه 200 جفت بازی که معرف جنس *لاکتوباسیلوس* است.

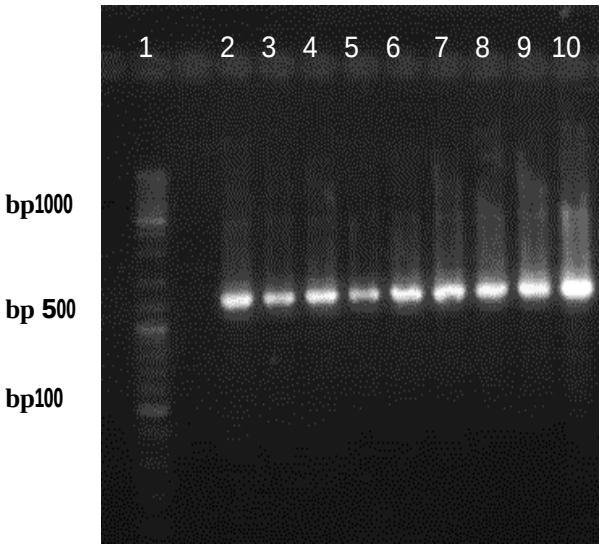
تکثیر *16Sr DNA* کامل

واکنش زنجیره ای پلیمراز برای تکثیر کامل *16S rDNA* تعدادی از سویه های برتر *لاکتوباسیل* ها انجام شد. الکتروفورز تعدادی از نمونه های تکثیر یافته با استفاده ازآغازگر های مخصوص *16S rDNA* *لاکتوباسیلوس* در شکل شماره 2 مشاهده می شود.

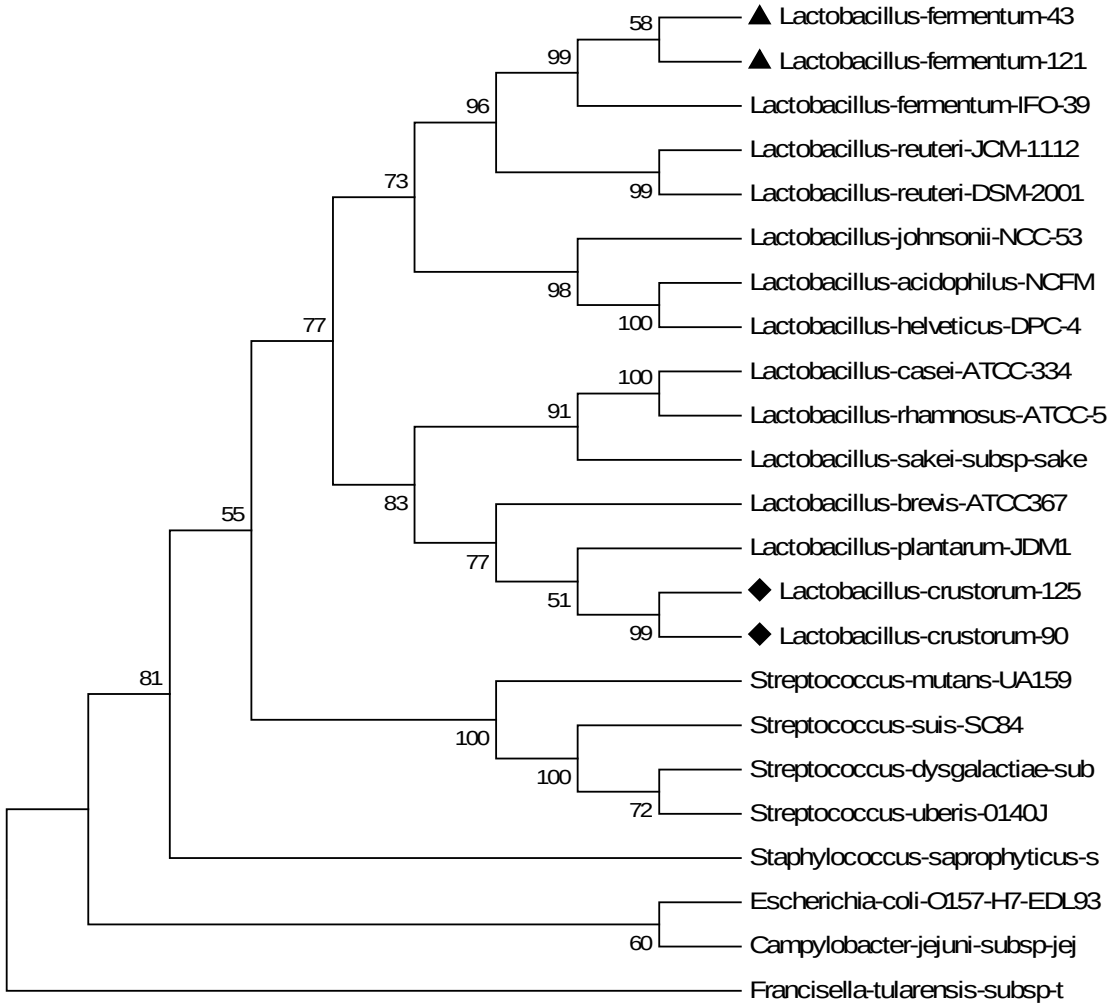
باند اختصاصی حدود 1500 جفت بازی تکثیر شد و پس از انجام آزمایشات تاییدی قطعه *16S rDNA*، چهار باکتری تعیین توالی شدند (شرکت ژن فن آوران). سپس در بانک اطلاعاتی NCBI با شماره های FJ645922, FJ645923, FJ645924, FJ645925 ثبت شدند.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی

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 3 سویه های (*IL125, LO90*) هر دو با 99٪ شباهت *لاکتوباسیلوس کروستوروم* هستند که با علامت لوزی در درخت فیلوژنی مشخص می-باشند و سویه های (*IL121, KR43*) هر دو با 99% 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.



شکل 2– الکتروفورز تعدادی از نمونه های تکثیر یافته با استفاده ازآغازگر های مخصوص 16S rDNA *لاکتوباسیلوس*. چاهک1شاخص وزن مولکولی DNA. چاهک های 2-10 مربوط به تکثیر قطعه 1500 جفت بازی با استفاده از آغازگر های اختصاصی 16Sr DNA



شکل 3- 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

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 37 درجه سلسیوس به مدت 24 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). Fitzsimons در سال 1999 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 2005 تخمیر پنج قند اینولین، سالیسین، سوربیتول، مانیتول و لاکتوز را بررسی نمود (Ayhan et al., 2005). Pourahmad و Assadi در سال 2007 نیز تنها تخمیر هشت قند: گلوکز، گالاکتوز، لاکتوز، سوکروز، مالتوز،مانوز، تره هالوز و مانیتول را بررسی کرد (Pourahmad and Assadi, 2007). در بهترین گزارشات، Scheirlinck و Vandamme در سال 2007 تخمیر 19 قند: آمیگدالین، آربوتین، گالاکتوز، سلوبیوز، لاکتوز، مانیتول، سوکروز، ملزیتوز، ملیبیوز، رافینوز، رامنوز، سوربیتول، تره هالوز، مالتوز، ریبوز، جنتیبیوز و تاگاتوز را آزمون کرد. در این تحقیق نیز از تخمیر 19 قند: گلوکز، گالاکتوز، فروکتوز، مانوز، آرابینوز، رامنوز، گزیلوز، سوکروز، لاکتوز، مالتوز، تره 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 بررسی با جداول مندرج در کتاب برجی[1]، سویه های شناخته شده ای مانند: *L. helveticus, L. delbrueckii bulgaricus, L. acidophilus, L .plantarum L .casei.casei L. coryniformis torquens* شناسایی شدند. اما در این زمینه هم ملاحظاتی وجود دارد. یکی از سویه ها (*IL127*) شبیه به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود اما می توانست رامنوز را تخمیر کند درحالی که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* قادر به تخمیر این قند نیست. هم چنین سویه (*IL117*) شبیه *لاکتو باسیلوس دلبروکی بلگاریکوس* بود اما قادر به تخمیر سوکروز و گالاکتوز بود درصورتی 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 فیزولوژیکی 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[2] (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). در 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

1- Bergeys
2- Randomly Amplified Polymorphic DNA

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 تایید 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 دقیقا شناسایی شده اند آمده است:

سویه *IL 121 (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 99٪ 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 19 قند فقط تخمیر 14 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 1.7 mg/kg ± 20 را دارا می-باشد (Ghobadidana et al., 2010; Ghobadi Dana et al., 2011).

سویه *KR43* (PTCC1751) که از نمونه ماست گاوی جوشیده از روستای مالمیر 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 دقیقا نمی توان آن را به هیچ کدام از گونه های جدول برجی نسبت داد اما شباهت زیادی به *L.fermentum* دارد. اما مبنای 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، 99% 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 1.7 mg/kg ± 20 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 کاملا دور از هم نمونه برداری شده اند (یکی از استان کرمانشاه و دیگری از استان ایلام) و هرکدام خصوصیات بیوشیمیایی منحصر به فرد دارند یعنی از نظر تخمیر قند ها کاملا 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 1998 نشان داد که *L. fermentum* و *L. roteri* هرکدام 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 3).

سویه *IL 125 (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 ها ی 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.

با بررسی های 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 ویژگی های بسیار مهم سویه *IL 125 (PTCC1754)* که خاصیت پروبیوتیکی به آن میدهد توانایی تولید فولیک اسید به میزان 66.6±1.76 µg/l است (Ghobadi Dana, 2010). لاکتوباسیل ها به عنوان مصرف کننده اسید فولیک مطرح بودند اما داده های جدید تر توانایی تولید اسید فولیک را در این باکتری ها اثبات کرد. گر چه سطح تولید در این باکتری ها محدود می باشد اما این میزان توانایی در تولید اسید فولیک ارزش تجاری این سویه ها را نیز مطرح میسازد.

سویه *LO90* (*PTCC1752*) از نمونه دوغ گاوی از خانواده ای از روستای چشمک واقع در بخش ویسیان در استان لرستان جدا شد. این باکتری توانایی تولید فولیک اسید به میزان 55.6±1.69 µg/l را دارا می‌باشد (Ghobadi, 2010). در مقایسه نتایج حاصل از تخمیر قند ها ی این سویه با جدول برجی مشاهده شد که این سویه نیز مانند هیچ کدام *لاکتوباسیل های* مندرج در این کتاب نیست. از مقایسه ارتباط فیلوژنتیکی براساس *16Sr DNA* با دیگر سویه های موجود در پایگاه اطلاعاتی NCBI مشخص شد که سویه *LO90* *لاکتوباسیلوس کروستوروم* است (Scheirlinck et al., 2007). البته *L. crustorum* توانایی تجزیه ی اسکولین را دارد اما این سویه این توانایی را ندارند.

دو سویه *IL125, LO90* از محل هایی با فاصله مکانی نسبتا دور از هم (یکی از آنها از استان ایلام و دیگری از استان لرستان) نمونه برداری شده اند. شرایط محیطی حاکم بر محیط رشد این ارگانیسمهاد کاملا متفاوت است و حتی هرکدام خصوصیات بیوشیمیایی منحصر به فردی از نظر تخمیر قند ها دارند ، ولی قرابت ژنتیکی آنها به همراه شباهت در توانایی در تولید فولیک اسید بسیار جالب توجه است. این مسئله می تواند اثرات سایر عوامل و به ویژه میانکنش بین میکرو ارگانیم ها را مطرح کند. این دو باکتری قرابت زیادی با *L. farcimis, L. kimchi, L. brevis, L. Plantarum* و به ویژه *L. rhamnosus* و *L. casei* دارند. قبلا نیز وارد و همکاران در سال 1999 گزارش کرده بودند که *L. rhamnosus* و *L. casei* با هم قرابت ژنتیکی زیادی دارند (Ward and Timmins, 1999).

اختلاف این باکتری ها در مصرف قند و عدم انطباق با جداول ارئه شده ممکن است ناشی از جهش در یک یا تعدادی از ژن های مربوط به آنزیم های 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 می رسد که ثبات شرایط محیطی این باکتری ها که ناشی از باورهای افراد و خانواده ها است (حفظ سویه ها در درون یک خانواده و عدم تداخل با نمونه های سایر خانواده ها) 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* می تواند بسیار دقیق تر از خصوصیات بیوشیمیایی در تشخیص گونه ها عمل کند.

به نظر می رسد که جمع آوری مشخصات سویه های بومی هر ناحیه از کشور می تواند منشا باکتری های 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 پیشرفته ای نیز وجود دارند که در زمینه باکتری های اسید لاکتیک با بهره گیری از ژنومیکس و پروتئومیکس باکتری ها تحقیقات هدفداری را برای کاربردی کردن میکروارگانیسم های مورد مصرف در فرآیندهای تخمیر صنعتی انجام می دهند، شایسته است که ساختاری منسجم برای جمع آوری، حفظ و کاربردی کردن باکتری های اسید لاکتیک در کشور ایجاد گردد.

تشکر و قدردانی

از اداره کل استاندارد و تحقیقات صنعتی استان های 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 می شود.

منابع

1- اجدانی، ه. و ملکزاده، ف.1380. شناسایی سویه های استارتر های بومی مولد ماست ، جداسازی نگهداری و بررسی نقش هریک از آنها: دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم.

2- بارویی، الف. و کرباسی، م.1379. ارزیابی باکتریهای اسیدلاکتیک موجود در فراورده های لبنی سنتی (پنیر) برای تولید استارتر در مقایسه با استارترهای تجاری: دانشگاه شیراز.

3- جان‌جانی، م.1381. بررسی نقش و اهمیت استارتر در فراورده‌های پنیر چدار آنزیم لیپولیتیک: جهادسازندگی خراسان.

4- طاهری، الف. و احسانی، م. 1384. بررسی امکان تولید ونگهداری نوشیدنی تخمیری پروبیوتیک با استفاده از کشت باکتریایی گرما دوست و میاندوست دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم وتحقیقات تهران.

5- فاضلی، ع.1382. آزمایشگاهی انتروتوکسیکوژنیک توسط لاکتوباسیل کازئی در مدل موش E-Coli بررسی کاهش کلونیزاسیون: دانشگاه علوم پزشکی اصفهان.

6- کازرونی، الف. و احسانی، م.1382 .تاثیر افزودن باکتریهای استارتر حرارت دیده و پروتئوزهای تجارتی در تسریع رسانیدن پنیر سفید ایرانی - مؤسسه تحقیقات علوم دامی.

7- گمرک .1383 .اطلاعات آمار صادرات و واردات کشور.

8- محمدی، م.1383. بررسی اثر مهاری لاکتوباسیل اسیدفیلوس بر روی سویه های بیماریزای اشرشیاکلای درطیور.

9- نوحی، الف.1367. میکروبیولوژی عمومی: موسسه 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., Egounlety, 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 genenetically 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 Dana[1], A. Hatef Salmanian*[2], B. Yakhchali[3]

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 ºC, 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