

غربالگری و کلونینگ ژن کد کننده آنزیم دکستراناز از *استریپتومایسس* های خاک جهت استفاده در موارد دندان پزشکی

اشکان گودرزی^۱، کیومرث امینی^{۲*}، محدثه لاری پور^۳

۱. دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۲. استاد تمام، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

۳. دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: دکستراناز یکی از مهم ترین آنزیم های درمانی و صنعتی است. به دلیل اهمیت و کاربرد گسترده این آنزیم، هدف از این مطالعه تعیین مولکولی، کلونینگ و کینتیک آنزیم دکستراناز از *استریپتومایسس* های خاک جهت استفاده در دندان پزشکی بود.

روش کار: پس از شناسایی و انجام تست های بیوشیمیایی و مولکولی، *استریپتومایسس* های خاک جداسازی شدند. از طریق واکنش PCR سوبه های *استریپتومایسس* دارای ژن آنزیم دکستراناز مشخص شدند. اسیدپتته و دمای بهینه به منظور تولید دکستراناز نیز تعیین گردید. ژن دکستراناز سوبه های مثبت از طریق وکتور به باکتری میزبان *اشرشیا کلی* الحاق و از طریق تکنیک TA کلونینگ کلون شد. در پایان از طریق تکنیک Real Time PCR، بیان ژن دکستراناز در *اشرشیا کلی* XL\blue سنجیده شد.

نتایج: از غربالگری نمونه های خاک که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و بیوشیمیایی تعیین هویت شدند، در مجموع ۱۲ ایزوله *استریپتومایسس* جداسازی شد. از ۱۲ ایزوله تنها ۳ ایزوله *استریپتومایسس کویلی کالر* دارای ژن دکستراناز بودند. اسیدپتته بهینه دکستراناز ۵/۲ و دمای بهینه در محدوده ۶۵-۵۵ درجه سانتی گراد تعیین شد. صحت کلونینگ از طریق کلنی سلکشن، PCR و توالی یابی محصول PCR تایید شد. نتایج Real time PCR نیز بیان ژن دکستراناز را در باکتری *اشرشیا کلی* XL\blue تایید نمود.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان داد بررسی *استریپتومایسس* خاک بدلیل پتانسیل بالا در تولید دکستراناز، این سوبه می تواند زمینه ساز مطالعات آینده باشد و می توان این ایزوله ها را به عنوان کاندیدای مناسبی در طراحی و ساخت سوبه های تولید کننده ی آنزیم معرفی نمود.

واژگان کلیدی: *استریپتومایسس* خاک، دکستراناز، کلونینگ

Screening and cloning of the gene encoding dextranase enzyme from soil *Streptomyces* for use in dental cases

Ashkan Gooderzi¹, Kiumarss Amini^{2*}, Mohaddeseh Larypoor³

1. PhD. student, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran

2. Full Professor, Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran,

3. Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, North Tehran Azad University, Tehran, Iran

Abstract

Introduction: This study aimed to explore the molecular, cloning, and kinetic properties of the dextranase enzyme produced by *Streptomyces* isolated from soil, for potential applications in dentistry. *Dextranase* is an enzyme that breaks down dextran, a polysaccharide, and is important in both therapeutic and industrial fields, including use in blood substitutes, vasodilators, and the sugar industry.

Methods: Microbial enzymes, such as those from soil bacteria, are preferred over plant and animal-derived enzymes due to their variety, lower cost, and greater stability. Soil bacteria, in particular, are abundant sources of biologically active compounds with minimal toxicity, making them suitable for human treatment.

Results: The study isolated 12 *Streptomyces* strains from soil samples. After biochemical and molecular analysis, three strains, identified as *Streptomyces quilibicolor*, were found to contain the dextranase gene. The optimal conditions for dextranase production were determined to be a pH of 5.2 and a temperature range of 55-65°C. The dextranase gene was successfully cloned into *Escherichia coli* using a TA cloning technique, and its expression was confirmed through Real-Time PCR.

Conclusion: The results suggest that *Streptomyces* from soil, with its high potential for dextranase production, could serve as a valuable resource for future industrial and therapeutic applications. The isolated strains are promising candidates for the development of efficient dextranase-producing strains, particularly for use in dental treatments and other clinical fields.

Key words: Soil *Streptomyces*, Dextranase, Cloning

مقدمه

و مجموعه‌ای از پلی ساکاریدهای با جرم مولکولی کم می‌باشند (۲). دکستراناز به طور گسترده در تولید دکستران‌های بالینی خاص استفاده شده است (۳، ۴). مولکول‌های دکستران تولید شده توسط دکستراناز با جرم مولکولی متوسط با وزن نسبتاً کم ۲۰ تا ۷۰ کیلو دالتون می‌توانند به عنوان گشاد کننده عروق خونی استفاده شوند و مولکول‌های با جرم مولکولی ۶ تا ۸ کیلو دالتون می‌توانند کمپلکس‌هایی با آهن برای درمان کم‌خونی شدید تشکیل دهند (۵). در کاربردهای بالینی، دکستران بالینی خاص تولید شده توسط دکستراناز می‌تواند به عنوان یک جایگزین خون در مواقع اضطراری استفاده شود. در صنعت قند، از دکستراناز برای رفع شفافیت و بازده ضعیفی که دکستران می‌تواند در آب نیشکر ایجاد کند استفاده شده است (۶-۸). شایان ذکر است که این آنزیم را می‌توان با دکستران تجاری برای سنتز مستقیم ایزومالتوز و ایزومالتوالیگوساکاریدهایی که اثرات پری‌بیوتیکی از خود نشان می‌دهند، استفاده نمود (۶). گزارش‌های قبلی پیشنهاد کرده است که دکستراناز ممکن است قادر به درمان پلاک‌های دندانی باشد. از آنجایی که دکستراناز می‌تواند به طور موثر دکستران را در پلاک‌های دندانی تجزیه کند، استفاده از این آنزیم به روشی موثر برای درمان پوسیدگی دندان تبدیل شده است (۷، ۹-۱۱). به همین دلیل، استفاده از دکستراناز برای درمان پوسیدگی دندان، به ویژه با توجه به تخریب دکستران در پلاک‌های دندانی، توجه زیادی را به خود جلب کرده است (۱۴-۱۲). سلول‌های باکتریایی بیوفیلیم‌هایی را به‌عنوان یک سد محافظ در برابر شرایط خارجی تشکیل می‌دهند و به عنوان مکانیسمی برای بهبود بقا و پراکندگی عمل می‌کنند (۱۵). استرپتوکوکوس موتانس عامل اصلی پوسیدگی دندان در دندان‌های انسان و تعدیل کننده کلیدی توسعه بیوفیلیم‌های پوسیدگی‌زا است. تجمع این باکتری پوسیدگی‌زا در بیوفیلیم ممکن است منجر به شروع التهاب پرودنتال شود

باکتری‌ها متابولیت‌های ثانویه را برای دفاع در برابر میکروارگانیسم‌های دیگر تولید می‌کنند و این متابولیت‌های ثانویه به عنوان منبعی از ترکیبات فعال زیستی برای استفاده های درمانی در انسان عمل می‌نمایند. آنزیم‌های میکروبی نسبت به آنزیم‌های مشتق شده از منابع گیاهی و جانوری مزیت‌هایی دارند که از آن جمله می‌توان به تنوع فعالیت‌های کاتابولیکی، هزینه ارزانتر، منابع فراوان، مستمر و حتی کمیت و پایداری نسبی بیشتر آن‌ها اشاره نمود. باکتری‌های خاک-زی آنزیم‌های متفاوتی را بر اساس زیستگاه و ساختار اکولوژیکی‌شان تولید می‌کنند. از آنجایی که خاک به طور طبیعی مملو از باکتری‌های مختلف می‌باشد، بنابراین محصولات میکروبی خاک به ویژه آنزیم‌ها، ایمنی بیشتر و سمیت‌زایی سلولی کمتری داشته و در مجموع برای کارهای درمانی در انسان مناسب‌تر می‌باشند. میکروارگانیسم‌های خاک منابع عظیم و پایداری برای استحصال ترکیبات فعال بیولوژیکی هستند (۱). دکستراناز (E.C.۳.۲.۱.۱۱α-d-glucan-۱,۶-glucanohydrolase) یک آنزیم القایی است و می‌تواند به طور خاص، اندوهیدرولیز پیوندهای α-(۱,۶)-d-گلیکوزید را در مکان‌های تصادفی دکستران کاتالیز کند. محصولات اصلی شامل ایزومالتوز، ایزومالتوتریوز، مقادیر کمی دی‌گلوکز

نویسنده مسئول: استاد تمام، گروه

میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه

آزاد اسلامی واحد ساوه

آدرس الکترونیک:

Dr_kumarss_amin@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

(۱۶، ۱۷). بنابراین، برداشتن بیوفیلم درمان اصلی التهاب پریودنتال است. دکستراناز قلیایی ممکن است برای درمان پوسیدگی دندان مناسب باشد زیرا انتظار می رود محصولات قلیایی دندان شویه نسبت به محصولات اسیدی با مینای دندان سازگارتر باشند. علاوه بر این، دکستراناز در دمای حدود ۳۷ درجه سانتی گراد به طور موثر عمل می کند و همچنین ممکن است به تخریب پلاک های دندانی انسان کمک کند (۱۸). در حال حاضر باکتری ها و قارچ ها دو منبع اصلی برای تولید دکستراناز هستند (۱۹). دکسترانازهای باکتری معمولاً پایداری حرارتی مطلوبی دارند اما فعالیت دکستراناز نسبتاً

کمی دارند. با این حال، قارچ ها، رایج ترین منبع دکستراناز، دکسترانازهای اسیدی و مگاگرمی تولید می کنند که در مقادیر اسیدیته از ۵ تا ۶/۵ و دمای بالای ۵۰ درجه سانتی گراد کاتالیز می کنند و در شرایط قلیایی ناپایدار هستند. دکسترانازها به ندرت قادر به کاتالیز در شرایط قلیایی و دمای متوسط هستند (۶). در تحقیق حاضر تلاش شد تا باکتری های *استریپتومایسس* تولید کننده دکستراناز از منابع خاک جداسازی شده و سپس ژن کد کننده ی دکستراناز جهت افزایش تولید این آنزیم، کلون گردد.

مواد و روش ها

نمونه برداری و جداسازی *استریپتومایسس* از خاک

نمونه برداری از خاک بر اساس مطالعات مشابه (۲۰) و همچنین فرمول کوکران، از ۵ ایستگاه در تهران انجام شد و از هر ایستگاه ۱۲ نمونه خاک از سطح تا عمق ۵ سانتی متری جمع آوری شد. جداسازی *استریپتومایسس* با روش هایاکاوا و نونومورا انجام شد (۲۱). برای این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از هر مقدار از رقت های نهایی روی سطح هیومیک اسید-ویتامین آگار (اسید هیومیک محلول در آگار باکتریولوژیک ۲۰ گرم، $MgSO_4 \cdot 0/5$ گرم، Na_2HPO_4 ۵ گرم، $CaCO_3$ ۰/۲ گرم، اسید هیومیک ۱۰ گرم، KCL ۲۰ گرم، سیکلوهگزیماید ۵ گرم و آب مقطر ۱ لیتر) کشت داده شد.

پلیت های کشت شده در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در تاریکی تا اسپوراسیون کلنی های باکتری به مدت دو هفته انکوبه شدند. کلنی های باکتری بر اساس ویژگی های مورفولوژیکی با میکروسکوپ نوری شناسایی شدند. کلنی های نماینده *استریپتومایسس* برداشته شدند و روی پلیت های آگار Bennet تازه (گلوکز ۱۰ گرم، عصاره مخمر ۱ گرم، پپتون ۲ گرم، عصاره گوشت گاو ۱ گرم، آگار باکتریولوژیک ۲۰ گرم و آب مقطر ۱ لیتر) کشت داده شد تا کلنی های *استریپتومایسس* خالص به دست آمد (۲۲).

تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی مشکوک به

استریپتومایسس

در خصوص تعیین هویت جدایه‌های باکتریایی از خصوصیات ماکروسکوپی کلنی، خصوصیات میکروسکوپی (رنگ‌آمیزی گرم)، تست‌های بیوشیمیایی و شناسایی مولکولی استفاده شد. تست‌های بیوشیمیایی شامل تست حرکت، ایندول، متیل رد، VP، سیترات، تولید پیگمان، هیدرولیز ژلاتین، احیای نیترات، اکسیداز، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز نشاسته، تست سوکروز و تست تولید SH₂ بودند. در نهایت جهت تایید نهایی، شناسایی مولکولی نیز انجام گردید. برای

این منظور از پرایمرهای عمومی برای تکثیر ۱۶srDNA (پرایمر ۸F و ۱۵۴۱R) به روش PCR استفاده گردید (۲۳). سپس محصول PCR پس از ارزیابی کمی و کیفی با روش‌های اسپکتروفتومتری و الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، به منظور توالی‌یابی برای شرکت Bioneer ارسال گردید و نتیجه سکانس در دیتابیس NCBI، BLAST شد تا سوییچ مذکور شناسایی گردد.

جداسازی باکتری‌های تولید کننده دکستراناز

جهت مشخص کردن ایزوله‌هایی که توانایی تولید آنزیم دکستراناز را داشتند، از واکنش PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی برای ژن کد کننده دکستراناز استفاده گردید. پرایمرها با استفاده از نرم‌افزار Primer³ طراحی شدند و با بلاست در پایگاه داده NCBI صحت عملکرد آن‌ها ارزیابی شد. توالی پرایمر رفت و برگشت به ترتیب ۵'-^۳GAATCCATGCAGACTCTCCTTGTGAGC-^۵ و ۳'-^۵AGGCTTTCCTGTCATGGAAGCATAATC-^۳ بود.

سپس واکنش PCR با یک دناتوراسیون اولیه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۵ سیکل شامل دناتوراسیون به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، انلینگ به مدت ۴۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و در نهایت یک چرخه گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

سنجش فعالیت آنزیم

فعالیت دکستراناز با تعیین سرعت هیدرولیز دکستران اندازه گیری شد. مخلوط واکنش مورد استفاده در سنجش دکستراناز حاوی ۱ میلی‌لیتر دکستران ۲ درصد در بافر استات ۲۰ میلی‌مولار (اسیدیته ۵/۲) (۲۰ میکرولیتر (۰/۸ میکروگرم) از محلول آنزیمی رقیق شده مناسب بود. پس از تسهیل تجزیه آنزیمی دکستران در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰

دقیقه، قندهای احیاکننده آزاد شده با استفاده از روش ۳،۵-دی نیتروسالیسیلیک اسید تعیین شدند. یک واحد (I U) از فعالیت آنزیم به عنوان مقدار آنزیمی تعریف شد که بازده دکستران را هیدرولیز کرد و قندهای احیا کننده معادل ۱ میکرومول از مالتوز در دقیقه تحت شرایط فوق مورد ارزیابی قرار گرفتند (۲۴).

تعیین شرایط بهینه فعالیت دکستراناز

۲۰ تا ۸۵ درجه سانتی گراد) به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از دکستران ۰/۲٪ به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت (۲۴). شایان ذکر است مقدار دکستراناز با منحنی استاندارد گلوکز تعیین گردید.

تأثیر اسیدیته در محدوده ۳-۹ و در دمای ۶۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۰ دقیقه با استفاده از ۰/۲٪ دکستران به عنوان سوبسترا مورد ارزیابی قرار گرفت (۲۴). اثر دما با انکوبه کردن دکستراناز در اسیدیته بهینه آن (۵/۲) در دماهای مختلف (از

کلون کردن ژن دکستراناز در باکتری اشریشیا کلی
x1\blue

میزبان اشریشیا کلی x1\blue انتقال یافت. پس از ترانسفورماسیون، باکتری روی پلیت LB آگار کشت داده شده و به مدت ۱ الی ۲ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه و در نهایت صحت کلونینگ از طریق غربالگری سفید/آبی تایید گردید. همچنین با استفاده از پرایمر M۱۳ که در وکتور وجود داشت، یک واکنش PCR برای تایید نهایی کلونینگ انجام شد (۲۵).

به منظور کلونینگ سریع تر و موثرتر محصول PCR از روش TA-Cloning (سیناکلون-ایران) استفاده شد. در این روش از یک وکتور خطی بنام PTG۱۹-T که در انتهای ۳' آن باز تیمین قرار دارد استفاده می شود. این وکتور بعلاوه دارای ژن LacZ بمنظور غربالگری سفید/آبی، پرایمر M۱۳ برای PCR و توالی یابی و آنزیم محدود کننده BamH۱ می باشد. مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده، اتصال محصول PCR در وکتور کلونینگ PTG۱۹-T انجام شد. سپس وکتور به

بررسی بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده

میکرولیتتر از Rox dye و ۲ میکرولیتتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه BIO-RAD با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد (۲۶).

با استفاده از واکنش real time-PCR بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده ارزیابی گردید. برای این منظور در حجم ۲۰ میکرولیتتر با استفاده از کیت SMOBIO LOT:IQ۱۱۰۰۲۱۰۸۹۰۱ کره جنوبی انجام شد. برای این منظور ۱۰ میکرولیتتر از Prime Qmaster mix (۲x) with syber green، ۵ میکرولیتتر از DEPC water، ۱ میکرولیتتر از پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتتر از پرایمر ریورس، ۱

یافته ها

غربالگری نمونه‌های خاک به منظور جداسازی استرپتومایسس

استرپتومایسس رنگ آمیزی گرم انجام و از لحاظ وجود باکتری‌های رشته‌ای گرم مثبت بررسی شدند. بررسی نتایج تست های بیوشیمیایی مورد نظر در خصوص تعیین هویت جدایه ها نیز در جدول ۱ ذکر شده است.

از غربالگری نمونه های خاک ارسالی به آزمایشگاه که بر اساس خصوصیات مورفولوژیک، میکروسکوپی و تست‌های بیوشیمیایی تعیین هویت شدند در مجموع ۱۲ ایزوله استرپتومایسس جداسازی شد. از کلنی های مشکوک به

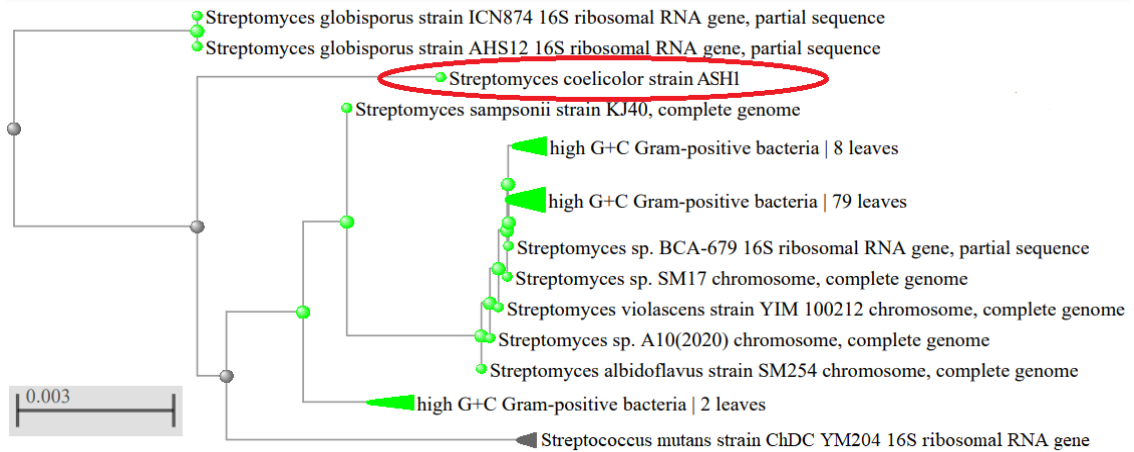
جدول ۱- نتیجه تست های بیوشیمیایی جهت شناسایی جنس استرپتومایسس

تست‌های بیوشیمیایی	رنگ آمیزی گرم	متیل رد	VP	سیترات	هیدرولیز نشاسته	هیدرولیز کازئین	احیای نیترات	اکسیداز	کاتالاز
نتایج	+	-	-	+	متفاوت در ایزوله‌ها	+	-	+	+

شناسایی مولکولی ایزوله‌های استرپتومایسس

بررسی قرار گرفت. نتایج درخت فیلوژنی به روش پیوند همجواری (NJ) نشان داد که گونه مورد بررسی با بوت استرپ ۱۰۰۰ و شباهت بالای ۹۹ درصد، استرپتومایسس کویلی کالر می‌باشد (شکل ۱).

برای رسم درخت فیلوژنی از نرم‌افزار clustalX و Mega5 استفاده شد. در این مرحله از روش neighbor joining برای رسم درخت استفاده گردید. بررسی درخت فیلوژنی گونه‌های مورد مطالعه و مقایسه با گونه های مشابه، روابط فیلوژنی بین گونه‌های استرپتومایسس با استفاده از ژن ۱۶SrDNA مورد



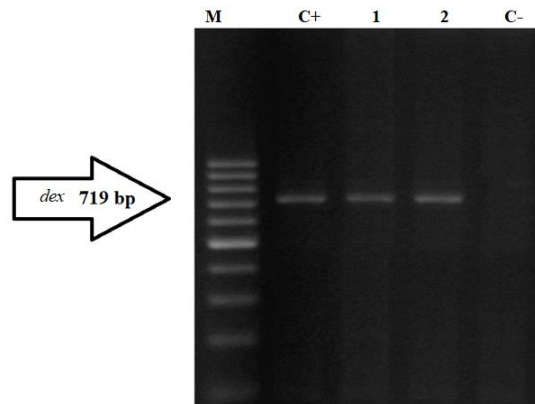
شکل ۱- درخت فیلوژنی رسم شده بر اساس توالی ژن ۱۶SrDNA (گونه مورد مطالعه با دایره قرمز نشان داده شده است)

نتیجه آزمون PCR به منظور شناسایی ایزوله‌های

دارای ژن دکستراناز

واکنش PCR برای ژن دکستراناز با پرایمرهای اختصاصی انجام شد. نتایج حاصل نشان داد که از ۱۲ سویه

استریومایسس جدا شده، ۳ سویه استریپتومایسس کویلی کالر واجد ژن دکستراناز بودند (شکل ۲).

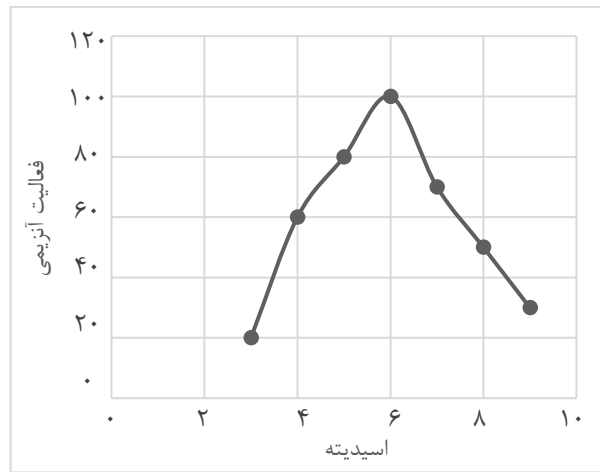
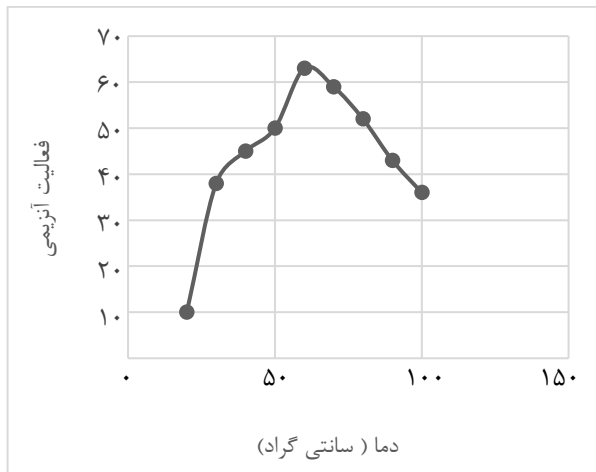


شکل ۲- نتیجه PCR ژن های دکستراناز، C⁺: کنترل +، C⁻: کنترل منفی، نمونه ۱ و نمونه ۲: ژن دکستراناز مثبت، M: مارکر ۱۰۰ bp

اثرات اسیدیته و دما بر فعالیت آنزیم

مشاهده شد (شکل ۳-الف). دکستراناز حداکثر فعالیت را در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد نشان داد و بیش از ۸۵ درصد از حداکثر فعالیت خود را در محدوده دمایی ۶۵-۵۵ درجه سانتی گراد نشان داد (شکل ۳-ب).

اثرات اسیدیته و دمای واکنش بر فعالیت آنزیمی در محدوده اسیدیته از ۳ تا ۹ و محدوده دمایی ۲۰ تا ۸۵ درجه سانتی گراد با استفاده از دکستران به عنوان سوبسترا مورد بررسی قرار گرفت. اسیدیته بهینه دکستراناز تقریباً ۵/۲ بود و بیش از ۸۵ درصد از حداکثر فعالیت آن در محدوده اسیدیته برابر با ۴-۶

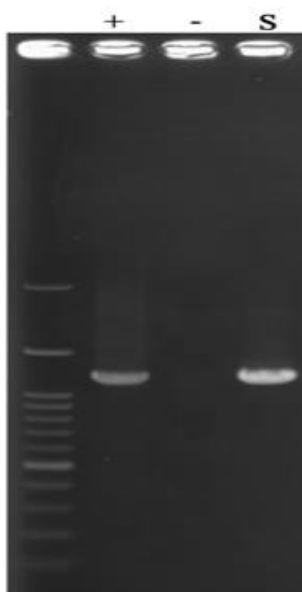


شکل ۳- فعالیت آنزیم دکستراناز در اسیدیته های مختلف (الف) و در دماهای مختلف (ب)

تایید کلونینگ ژن دکستراناز

باکتری‌ها تایید گردید (شکل ۴-ب). محصول PCR توالی یابی شده و در نهایت با بلاست توالی محصول PCR در پایگاه داده NCBI، حضور ژن دکستراناز در باکتری *اشریشیا کلی* x1\blue تایید شد (شکل ۴-ج).

پس از کلون کردن ژن دکستراناز، توسط کلنی سلکشن (آبی/سفید) سویه های کلون شده جداسازی شدند (شکل ۴-الف). همچنین با استفاده از واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی M13 که در وکتور وجود داشت، حضور وکتور در



ب



الف

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 7 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor strain KPS dextranase (dex2) gene, complete cds	Streptomyces c...	1810	1810	100%	0.0	100.00%	1882	DQ497801.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor dextranase (aod2) gene, complete cds	Streptomyces c...	1783	1783	98%	0.0	100.00%	1863	AY769086.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. KQ11 dextranase gene, complete cds	Streptomyces c...	1760	1760	98%	0.0	99.59%	1863	KJ571608.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor genes for gluco-dextranase and endodextranase, complete cds	Streptomyces c...	1123	1123	100%	0.0	87.36%	8516	D88362.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor DNA for endodextranase, complete cds	Streptomyces c...	305	305	85%	7e-78	73.74%	3801	D88361.2
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces coelicolor var. dextransylicum dexG gene, dexT gene for isomaltotriose-dextranase precursor and...	Streptomyces c...	267	267	85%	3e-66	72.86%	4506	AB025195.1
<input checked="" type="checkbox"/> Streptomyces sp. gene for dextranase precursor, complete cds	Streptomyces li...	261	261	79%	2e-64	73.27%	2380	D00834.1

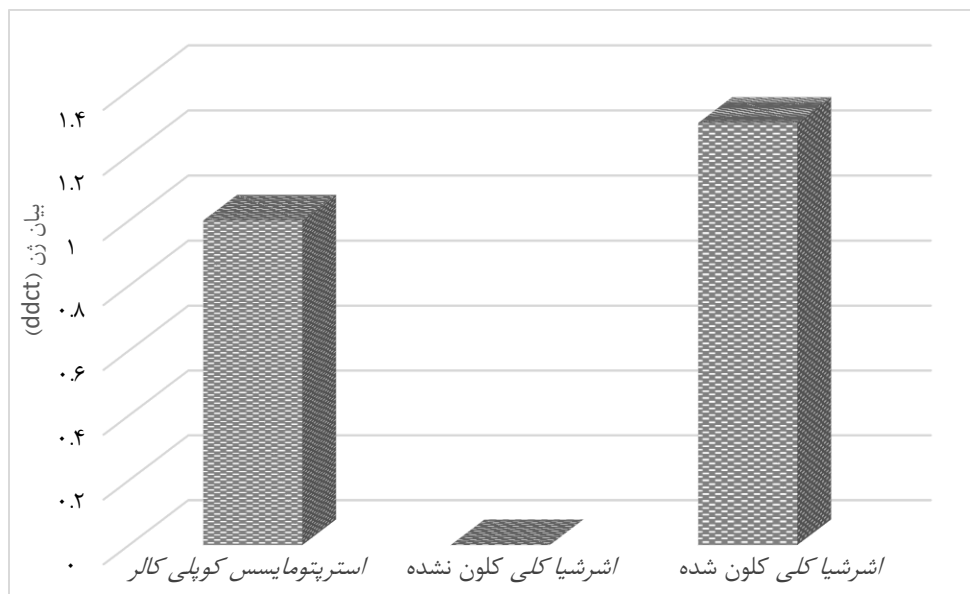
۴- تایید کلونینگ ژن آنزیم دکستراناز در باکتری *اشریشیا کلی* از طریق کلنی سلکشن (الف)، واکنش PCR اختصاصی با پرایمر M۱۳ (ب) و بلاست توالی محصول PCR در پایگاه داده NCBI (ج) (در شکل ب +: کنترل مثبت، -: کنترل منفی، S: باکتری ترانسفورم شده).

بررسی گردید (شکل ۵). همان طور که در شکل ۵ مشاهده می‌گردد در باکتری‌های ترانسفورم شده بیان دکستراناز مشاهده می‌گردد در حالی که در باکتری کنترل منفی که ترانسفورم نشده بود، بیان مشاهده نشد. همچنین از خود

بررسی بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده به منظور اطمینان از بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده، RNA کلنی‌ها استخراج شده و پس از سنتز cDNA، با تست Real time PCR میزان بیان ژن دکستراناز در آن‌ها

مشاهده می‌شود بیان دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده نسبت به *استرپتومایسس کویلی کالر* بیشتر بود.

باکتری *استرپتومایسس کویلی کالر* به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید و داده‌ها با آن نرمالایز شد. همان‌طور که



شکل ۵- بیان ژن دکستراناز در باکتری ترانسفورم شده در مقایسه با باکتری ترانسفورم نشده و سویه‌ی *استرپتومایسس کویلی کالر*

بحث

دکستراناز تعیین شد. سپس ژن کد کننده‌ی دکستراناز به باکتری *اشرشیا کلی* وارد شد و مشخص گردید که ژن مذکور در باکتری ترانسفورم شده بیان می‌گردد. تحقیقات قبلی در مورد دکسترانازها بیشتر بر روی جهش (۱۹)، غربالگری (۲۷)، ساخت باکتری‌های دستکاری شده ژنتیکی (۲۸، ۲۹)، بهینه سازی محیط تخمیر (۳۰) و شرایط تخمیر (۳۱) و خواص خالص سازی و آنزیمی متمرکز شده بود (۳۲-۳۴)، در حالیکه در مطالعه حاضر به بررسی بیان ژن دکستراناز پرداخته شد. مطالعات کمی در مورد چگونگی تنظیم جرم مولکولی دکستران در طول تولید وجود دارد. از آنجایی که جرم مولکولی دکستران تا حد زیادی کاربرد آنها را تعیین می‌کند، یافتن راهی کارآمد برای کنترل این پارامتر ضروری است.

با توجه به کاربردهای گسترده‌ی آنزیم دکستراناز در پزشکی و صنعت، جداسازی این آنزیم از منابع میکروبی توجه محققان را به خود جلب کرده است. در تحقیق حاضر از منابع خاک جهت غربالگری باکتری‌های *استرپتومایسس* تولید کننده‌ی دکستراناز استفاده گردید. در ابتدا ۱۲ ایزوله‌ی *استرپتومایسس* بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی و بیوشیمیایی جداسازی شدند و ارزیابی مولکولی نیز گونه‌های *استرپتومایسس کویلی کالر* را تایید نمود. در مرحله‌ی بعد واکنش PCR اختصاصی نشان داد که از این ۱۲ ایزوله، ۳ ایزوله دارای ژن دکستراناز می‌باشند. فعالیت آنزیمی در اسیدپپتازها و دماهای مختلف بررسی شد و اسیدپپتاز بهینه ۵/۲ و دمای بهینه در محدوده ۶۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد برای

چندین نقطه ایزوالکتریک بین ۵/۶ و ۶/۱۱ نشان داده شد که تمام اشکال ایزوالکتریک فعال و از نظر کاتالیستی مشابه بودند. دکستراناز حاوی یک بخش کربوهیدرات (۰.۸٪) بود. فعالیت بهینه آنزیم در اسیدیته برابر ۵ مشاهده شد با این حال این دکستراناز بین اسیدیته ۲/۵ و ۷ در دماهای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد نیز پایدار بود (۳۶).

Abdel-Naby و همکاران (۱۹۹۹) تولید دکستراناز در کشت استاتیک پنی سیلیوم فانیکولوسوم ۲۵۸ را مورد بررسی قرار دادند. حداکثر فعالیت آنزیم در اسیدیته برابر ۸ به دست آمد. آن‌ها آنزیم را بر روی حامل‌های مختلف با تکنیک‌های متفاوت تثبیت کردند. آنزیم تهیه شده با اتصال کووالانسی روی کیتوزان با استفاده از گلوکارآلدئید دارای بالاترین فعالیت بود و تا ۶۳٪ از فعالیت ویژه اولیه خود را در مقایسه با دکستراناز آزاد حفظ کرد. آنزیم تثبیت شده اسیدیته بهینه، دمای واکنش بهینه، انرژی فعال سازی، ثابت میکائیلیس بالاتر و پایداری حرارتی بهبود یافته و همچنین مقادیر بالاتر ثابت نرخ غیرفعال سازی را نشان داد.

آنزیم تثبیت شده حدود ۸۰٪ از فعالیت کاتالیزوری اولیه را حتی پس از ۱۲ دوره استفاده، حفظ کرد (۳۷). با توجه به مطالعاتی که به آن‌ها اشاره شد مشخص می‌گردد که تلاش برای یافتن دکسترانازهایی با بیشترین فعالیت آنزیمی یکی از موضوعات مورد توجه محققان بوده است و سویه‌های میکروبی مختلف تا کنون توانایی متفاوتی را در تولید انواع دکستراناز نشان داده‌اند. در تحقیق حاضر نیز باکتری مولد ژن دکستراناز از بستر خاک جدا و ژن مورد نظر تخلیص شد و از طریق وکتور Ptg۱۹، الحاق ژن به باکتری *اشرشیا کلی* (x1۱blue صورت گرفت و کلونینگ انجام شد. کلونینگ در واقع برای افزایش تولید آنزیم مذکور انجام شد تا بتوان سویه‌های مهندسی شده‌ی تولید کننده‌ی دکستراناز با توانایی بالا رو توسعه داد.

هدف از مطالعه حاضر تعیین مولکولی، کلونینگ و کینتیک آنزیم دکستراناز از استرپتومایسس‌های خاک جهت استفاده در دندان پزشکی بود. Ren و همکاران (۲۰۱۸) توانایی یک دکستراناز از یک باکتری دریایی به نام *کاتینولوم* را ارزیابی کردند. آن‌ها نشان دادند که یک دکستراناز قلیایی و سازگار با دمای پایین به نام کادیکس توسط این باکتری تولید می‌شود که می‌تواند برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌های استرپتوکوکوس موتانس، یک پاتوژن اولیه در پوسیدگی دندان، استفاده شود. در این تحقیق نشان داده شد که کادکس دارای فعالیت ویژه ۲۳۰۹ U/mg و وزن مولکولی ۷۵ کیلو دالتون بود. کادکس حداکثر فعالیت را در اسیدیته برابر ۸ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد و در دماهای زیر ۳۰ درجه سانتی‌گراد و اسیدیته بین ۵ تا ۱۱ نیز پایدار بود. در این گزارش بیان شده است که چندین معرف محصول شستشوی دندان، از جمله کربوکسی بنزن، اتانول، سدیم فلوراید و زایلیتول هیچ تاثیری بر فعالیت کادکس نداشتند (۳). در مطالعه‌ی Park و همکاران (۲۰۱۲) یک دکستراناز به نام TPDex را از *ترموانیروباکتر سودوتانولیکوس* جداسازی کردند. آن‌ها نشان دادند که TPDex دارای جرم مولکولی ۷۰ کیلو دالتون و فعالیت آنزیمی ۷۳۷ U/mg می‌باشد. اسیدیته بهینه آن ۵/۲ بود و آنزیم در اسیدیته بین ۳/۱ و ۸/۵ در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد پایدار بود. TPDex بدون توجه به انواع دکستران، از جمله دکستران ۲۰۰۰T، دکستران ۷۴۲CB، و آلترن، فعالیت دکستراناز وسیعی را نشان داد. TPDex بالاترین پایداری حرارتی را در بین دکسترانازهای مشخص شده نشان داد و می‌تواند آنزیمی مناسب برای استفاده در تولید قند بدون کاهش دما باشد (۳۵).

دکستراناز تولید شده توسط *لیپومایسس استارکیوز* توسط KOENIG و DAY جداسازی گردید. آنزیم خالص شده چهار باند را روی ژل SDS/PAGE با جرم تخمینی ۷۴ کیلو دالتون، ۷۱ کیلو دالتون، ۶۸ کیلو دالتون و ۶۵ کیلو دالتون نشان داد.

نتیجه گیری

خاک به دلیل پتانسیل بالا در تولید دکستراناز، می تواند زمینه ساز مطالعات آینده باشد و با مطالعه بیشتر متابولیت های فعال *استرپتومایسس های خاک* می توان گامی پیشرو در جهت توسعه آنزیم های موثر برای درمان بیماری های عفونی ناشی از میکروارگانیزم های مقاوم و درمان پوسیدگی های حاصل از میکروب های بیماری زا برداشت. در مطالعه حاضر تولید آنزیم دکستراناز از طریق وکتور نو ترکیب و TA کلونینگ صورت گرفت و مطالعات بعدی می تواند در راستای بهینه سازی شرایط مختلف برای تولید این آنزیم باشد.

با توجه به شرایط ویژه حاکم بر خاک بخش اعظمی از آن دست نخورده است و میکروارگانیزم هایی که در آن زندگی می کنند قادر به تولید متابولیت های ثانویه منحصر به فردی هستند که این متابولیت ها می توانند برای فعالیت های خاصی به کار روند. در این مطالعه با ارزیابی پتانسیل ضد میکروبی *استرپتومایسس های جدا شده از بستر خاک تهران*، باکتری *استرپتومایسس* به عنوان منبع غنی از آنزیم دکستراناز معرفی و به عنوان یک سویه بومی به منظور تولید آنزیم دکستراناز شناخته شد. نتایج این تحقیق نشان داد *استرپتومایسس*

Reference

- Himmel ME, Xu Q, Luo Y, Ding S-y, Lamed R, Bayer EA. Microbial enzyme systems for biomass conversion: emerging paradigms. *Biofuels*. 2010;1(2):323-41.
- Bashari M, Eibaid A, Wang J, Tian Y, Xu X, Jin Z. Influence of low ultrasound intensity on the degradation of dextran catalyzed by dextranase. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2013;20(1):155-61.
- Ren W, Cai R, Yan W, Lyu M, Fang Y, Wang S. Purification and characterization of a biofilm-degradable dextranase from a marine bacterium. *Marine drugs*. 2018;16(2):51.
- Shahid F, Aman A, Nawaz MA, Karim A, Ul Qader SA. Chitosan hydrogel microspheres: an effective covalent matrix for crosslinking of soluble dextranase to increase stability and recycling efficiency. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2017;40(3):451-61.
- Chan YJ, Chong MF, Law CL. An integrated anaerobic-aerobic bioreactor (IAAB) for the treatment of palm oil mill effluent (POME): Start-up and steady state performance. *Process Biochemistry*. 2012;47(3):485-95.
- Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes: fundamentals and applications. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2005;69(2):306-25.
- Ren W, Wang S, Lü M, Wang X, Fang Y, Jiao Y, et al. Optimization of four types of antimicrobial agents to increase the inhibitory ability of marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase mouthwash. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. 2016;34(2):354-66.
- Wang D, Lu M, Wang S, Jiao Y, Li W, Zhu Q, et al. Purification and characterization of a novel marine *Arthrobacter oxydans* KQ11 dextranase. *Carbohydrate Polymers*. 2014;106:71-6.
- Walker GV, Heng NC, Carne A, Tagg JR, Wescombe PA. Salivaricin E and abundant dextranase activity may contribute to the anti-cariogenic potential of the probiotic candidate *Streptococcus*

- salivarius JH. Microbiology. 2016;162(3):476-86.
10. Qiu Y-x, Mao M-y, Jiang D, Hong X, Yang Y-m, Hu T. Co-operative effect of exogenous dextranase and sodium fluoride on multispecies biofilms. Journal of Dental Sciences. 2016;11(1):41-7.
 11. Marotta M, Martino A, De Rosa A, Farina E, Carteni M, De Rosa M. Degradation of dental plaque glucans and prevention of glucan formation using commercial enzymes. Process Biochemistry. 2002;38(1):101-8.
 12. Eggleston G, Monge A. Optimization of sugarcane factory application of commercial dextranases. Process Biochemistry. 2005;40(5):1881-94.
 13. Bowler G, Wones S. Application of dextranase in UK sugar beet factories. Zuckerindustrie. 2011;136(12):780-3.
 14. Park T-S, Jeong H-J, Ko J-A, Ryu Y-B, Park S-J, Kim D-M, et al. Biochemical characterization of thermophilic dextranase from a thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*. Journal of microbiology and biotechnology. 2012;22(5):637-41.
 15. Bertrand E, Pierre G, Delattre C, Gardarin C, Bridiau N, Maugard T, et al. Dextranase immobilization on epoxy CIM® disk for the production of isomaltooligosaccharides from dextran. Carbohydrate polymers. 2014;111:707-13.
 16. Purushe S, Prakash D, Nawani NN, Dhakephalkar P, Kapadnis B. Biocatalytic potential of an alkalophilic and thermophilic dextranase as a remedial measure for dextran removal during sugar manufacture. Bioresource technology. 2012;115:2-7.
 17. Goulas AK, Cooper JM, Grandison AS, Rastall RA. Synthesis of isomaltooligosaccharides and oligodextrans in a recycle membrane bioreactor by the combined use of dextransucrase and dextranase. Biotechnology and bioengineering. 2004;88(6):778-87.
 18. Majeed A, Grobler SR, Moola MH. The pH of various tooth-whitening products on the South African market: scientific. South African Dental Journal. 2011;66(6):278-81.
 19. Wang X, Lu M, Wang S, Fang Y, Wang D, Ren W, et al. The atmospheric and room-temperature plasma (ARTP) method on the dextranase activity and structure. International journal of biological macromolecules. 2014;70:284-91.
 20. Dehnad A, Esmaili E, Solouki M. Isolation and molecular identification chitinase-producing *Streptomyces* strains and examination of their in-vitro antagonistic effects. Biological Journal of Microorganism. 2015;4(15):123-34.
 21. Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferment Tech. 1987;65:501-9.
 22. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology E-book: Elsevier Health Sciences; 2020.
 23. Frank JA, Reich CI, Sharma S, Weisbaum JS, Wilson BA, Olsen GJ. Critical evaluation of two primers commonly used for amplification of bacterial 16S rRNA genes. Applied and environmental microbiology. 2008;74(8):2461-70.
 24. Erhardt FA, Stammen S, Jördening H-J. Production, characterization and (co-) immobilization of dextranase from

- Penicillium aculeatum*. *Biotechnology letters*. 2008;30(6):1069-73.
25. Kang HK, Kim SH, Park JY, Jin XJ, Oh DK, Soo Kang S, et al. Cloning and characterization of a dextranase gene from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2005;22(15):1239-48.
 26. García B, Rodríguez E. Carbon source regulation of a dextranase gene from the filamentous fungus *Penicillium minioluteum*. *Current Genetics*. 2000;37(6):396-402.
 27. Cai R, Lu M, Fang Y, Jiao Y, Zhu Q, Liu Z, et al. Screening, production, and characterization of dextranase from *Catenovulum* sp. *Annals of microbiology*. 2014;64(1):147-55.
 28. Crawford B, Kasmidi M, Korompis F, Pollnac RB. Factors influencing progress in establishing community-based marine protected areas in Indonesia. *Coastal Management*. 2006;34(1):39-64.
 29. Kim Y-M, Kim D. Characterization of novel thermostable dextranase from *Thermotoga lettingae* TMO. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;85(3):581-7.
 30. Li K, Lu H, Hang F, Li S, Liu J. Improved dextranase production by *Chaetomium gracile* through optimization of carbon source and fermentation parameters. *Sugar Tech*. 2017;19(4):432-7.
 31. Zohra RR, Aman A, Zohra RR, Ansari A, Ghani M, Qader SAU. Dextranase: hyper production of dextran degrading enzyme from newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. *Carbohydrate polymers*. 2013;92(2):2149-53.
 32. Smith KV, Loughran J, Berry A, Dimitrakopoulos C. Developing scientific literacy in a primary school. *International Journal of Science Education*. 2012;34(1):127-52.
 33. Sufiate BL, Soares FEdF, Moreira SS, Gouveia AdS, Cardoso EF, Braga FR, et al. In vitro and in silico characterization of a novel dextranase from *Pochonia chlamydosporia*. *3 Biotech*. 2018;8(3):1-9.
 34. Matt C, Hess T, Benlian A. Digital transformation strategies. *Business & information systems engineering*. 2015;57(5):339-43.
 35. Park TS, Jeong HJ, Ko JA, Ryu YB, Park SJ, Kim D, et al. Biochemical characterization of thermophilic dextranase from a thermophilic bacterium, *Thermoanaerobacter pseudethanolicus*. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22(5):637-41.
 36. KOENIG D, DAY D. The purification and characterization of a dextranase from *Lipomyces starkeyi*. *European journal of biochemistry*. 1989;183(1):161-7.
 37. Abdel-Naby MA, Ismail A-MS, Abdel-Fattah AM, Abdel-Fattah AF. Preparation and some properties of immobilized *Penicillium funiculosum* 258 dextranase. *Process Biochemistry*. 1999;34(4):391-

تأثیر پودر گیاه پنیرک بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی ماست

زهرا صمصامی^۱، دکتر سارا متینی^{۲*}، دکتر پدرام حیدری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد خوی، دانشگاه آزاد اسلامی، خوی، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان دارویی در محصولات لبنی از جمله ماست در سالیان اخیر مورد توجه واقع شده است گل و برگ این گیاه دارای خواص تغذیه ای و دارویی می باشد. پنیرک دارای ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی است و همچنین دارای بتاکاروتن، سیانین، تانن، مالوئیدین، ساپونین، دلفینیدین، موسیلاژ و بالاخص آنتی کسیدان ها بوده که خاصیت ضد درد، ضد ویروس، ضد میکروب و ضد آنتی اکسیدانی دارند. در طب سنتی از پنیرک در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می کنند. هدف از این تحقیق، افزودن پودر گیاه پنیرک با غلظت های ۰/۵، ۱ و ۱/۵٪ به ماست و بررسی تأثیر آن بر خواص فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی ماست در طول ۲۸ روز دوره رسیدن بود.

مواد و روش ها: پودر گیاه پنیرک با درصد های ۰/۵، ۱ و ۱/۵ همزمان با افزودن استارتر به شیر اضافه شد و پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۸ درجه به مدت ۸ ساعت، در طی ۲۸ روز در دمای یخچال نگهداری شد.

یافته ها: نتایج حاصل از آنالیز داده ها نشان داد که در اسیدیته تأثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان اختلاف معنی دار است. همچنین بسته به درصد پنیرک اضافه شده میزان ماده خشک افزایش و آب اندازی کاهش یافت. طبق نتایج بدست آمده افزودن پودر پنیرک به تیمار ها سبب کاهش معنی دار شمارش کلی میکروبی، کلی فرم ها، کپک و مخمر و استارتر گردید. در ارزیابی حسی، شاخص طعم و بافت دهانی نشان دهنده اختلاف معنی داری در بین نمونه ها بودند در حالی که در شاخص ظاهری و بافت غیر دهانی اختلاف معنی داری مشاهده نشد.

نتیجه گیری: نتایج این تحقیق نشان دهنده این است که گیاه پنیرک دارای خواص ضد باکتریایی و ضد قارچی می باشد و به کار گیری از آن در فرمولاسیون ماست می تواند مسیری برای بدست آوردن ماست با کیفیت و زمان ماندگاری بالایی باشد.

کلید واژه: گیاه پنیرک، ماندگاری، ماست، خواص میکروبی، خواص شیمیایی

The effect of wild malva sylvestris on physicochemical ,microbial and sensory properties of yogurt

Samsami, Z¹ . Matini, S^{2*} . Heidari, P³

1. Master of scientist, Islamic Azad University, Khoy Branch, Khoy, Iran

2. Assistant Professor of Food Science Department, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Khoy Branch, Iran

3. Assistant Professor of Food Science Department, Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Khoy Branch, Iran

Introduction: The use of medicinal plants in dairy products, including yogurt, has used in recent years, and among these plants, we can mention Malva sylvestris, the flowers and leaves of this plant have nutritional and medicinal properties. Malva sylvestris contains phenolic and flavonoid compounds and also contains beta-carotene, cyanine, tannin, malvin, maloidin, saponin, delphinidin, mucilage, and especially antioxidants, which have analgesic, antiviral, antimicrobial, and antioxidant properties. The purpose of this research was to add 0.5%, 1% and 1.5% concentration of fennel plant powder to yogurt and investigate its effect on physicochemical, microbial and sensory properties of yogurt during 28 days of ripening period.

Methods: Malva sylvestris plant powder was added to the milk with the percentages of 0.5, 1 and 1.5 at the same time as the starter was added, and after being kept in a refrigerator at 38 degrees for 8 hours, it was kept in a refrigerator for 28 days.

Results: The results of the data analysis showed that there is a significant difference in pH and acidity of the effect of time and interaction between treatments and time. Also, depending on the percentage of cheese added, the amount of dry matter increased and syneresis decreased. According to the obtained results, the addition of Malva sylvestris to the treatments caused a significant decrease in total microbial count, total forms, mold, yeast and starter. In the sensory evaluation, the taste index and oral texture showed a significant difference among the samples, while no significant difference was observed in the appearance index and non-oral texture.

Conclusion: The results of this research show that the cheese plant has antibacterial and antifungal properties and its use in yogurt formulation can be a way to obtain yogurt with high quality and shelf life.

Keywords: *Malva plant*, shelf life, yogurt, microbial properties, chemical properties

مقدمه

و درمان بیماری هاست، گفته می شود (۳). پنیرک، یک گیاه نگهدارنده طبیعی است که دارای خاصیت ضد میکروبی و قارچ کشی می باشد. در میان گیاهان دارویی، گیاه پنیرک با داشتن خاصیت آنتی اکسیدانی، ضد سرطانی و ضد میکروبی جایگاه ویژه ای دارد. پنیرک با نام علمی *Malva sylvestris* یک گیاه دو یا چند ساله با ارتفاع ۱۰۰ سانتیمتر می باشد. پنیرک بومی آسیا، آفریقای شمالی، اروپا و مناطق مدیترانه است. از تمام قسمت های گیاه به عنوان ماده دارویی استفاده می کنند اما از قسمت گل و برگ گیاه استفاده بیشتری می شود. گل پنیرک، گیاهی بی بو و با مزه موسیلاژ مانند است. از این گیاه در طول تاریخ به عنوان غذا و دارو استفاده می کردند (۴). برگ های پنیرک حاوی فلاونوئید و شش تا هشت درصد موسیلاژ می باشد. مهم ترین ماده موثر گل پنیرک را موسیلاژ، فلاونوئید، تانن، ترکیبات فنولی و آنتوسیانین تشکیل می دهد (۵). به علاوه پنیرک حاوی قند، اگزالات و مواد رزینی و پکتینی است (۶). فعالیت بیولوژیکی برگ این گیاه وابسته به آنتی اکسیدان ها، پلی فنول ها، بتاکاروتن، ویتامین C، ویتامین E و مواد شیمیایی مهم دیگر در آن موجود می باشد (۷).

ماست یکی از انواع لبنیات است که به طور گسترده ای به دلیل خواص تغذیه ای و حسی مطلوب مصرف می شود. از هر نوع شیری برای تهیه ماست می توان استفاده کرد، اما ماست های امروزی را اغلب از شیر گاو تهیه می کنند. ماست از تخمیر قند شیر به نام لاکتوز حاصل می شود. باکتری مخصوص تهیه ماست، لاکتوز را به اسید لاکتیک تبدیل می کند و به دلیل وجود اسید لاکتیک، ماست مزه تند و ترشی پیدا می کند و به علاوه به ماست بافت ژل ماندنی می دهد. علاوه بر این در طی فرایند تخمیر محصولات جانبی نیز تولید می شود که عطر و طعم خاصی را به ارمان می آورد. ویژگی های اصلی کیفی ماست، عطر، طعم و بافت است. بیشتر ترکیبات طعم دهنده در ماست از لیپولیز چربی شیر و همچنین تبدیل میکروبیولوژیکی لاکتوز و سیترات است (۱). ماست اغلب در سراسر زنجیره توزیع در دمای ۲- درجه سانتی گراد نگهداری می شود. ماندگاری ماست در شکل طبیعی کوتاه است و این امر مانع تجاری شدن این محصول می باشد (۲). ارتباط تنگاتنگ بین غذا و سلامتی بر کسی پوشیده نیست. غذا دارو به ماده ی غذایی با خواص دارویی و سلامت بخش مفید که دارای اثر پیشگیری

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد خام مورد استفاده

شیر گاوی: شیر کامل از دامداری صنعتی در خوی تهیه شد. استارتر : استارتر مورد استفاده حاوی باکتری های لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس از شرکت ولیرن (Valiren Y 36 A) ایتالیا بود .

نویسنده مسئول: استادیار ، گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی

آدرس الکترونیک :

matinii.sara@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۵/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

پودر گیاه پنیرک : مقدار یک کیلوگرم گیاه پنیرک پس از جمع آوری و شستشو ، در دمای اتاق و دور از نور خورشید به طور کامل خشک گردید. سپس توسط آسیاب برقی پودر و از الکی با مش ۴۰ عبور داده شد و برای آزمایشات بعدی در محلی تاریک، سرد و خشک نگهداری گردید. پودر حاصل شده ۲۴ ساعت قبل از مصرف در داخل زیر نور UV و داخل هود لامینار، بر روی فویل آلومینیومی پخش شد تا در صورت وجود آلودگی استریل شود.

۲-۲- تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی

هود لامینار آزمایشگاهی، انکوباتور ساخت کشور آلمان، اتوکلاو ساخت آلمان، هیتر، آون مدل SHIMAZ CO، دستگاه سنجش اسیدیته مدل SANA ساخت ایران، دستگاه آب مقطر گیر، آسیاب و الک آزمایشگاهی، دستگاه سانتریفیوژ، ترازوی

آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۱ میلی گرم، ترازوی حساس رطوبت سنج در دار، هات پلیت Stuart انگلستان، محیط های کشت میکروبی Ibresco ساخت ایران.

۲-۳- محل انجام پژوهش

کلیه مراحل این تحقیق شامل تولید ماست و تمامی آزمایشات در آزمایشگاه دانشگاه آزاد واحد خوی انجام گرفت. آزمون های

فیزیکوشیمیایی در آزمایشگاه شیمی و آزمون های میکروبی در آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی نیز صورت گرفت.

۲-۴- روش تهیه ماست

گیاه پنیرک را از مناطق اطراف شهرستان خوی جمع آوری کردیم و پس از شستشو در زیر سایه در دمای اتاق خشک کرده و پس از آن با استفاده از آسیاب خانگی به پودر و از الک شماره ۱۸ عبور دادیم. شیر تازه و کامل گاوی از دامداری صنعتی خوی تهیه شد. پس از استاندارد سازی و کنترل کیفیت شیر و تعیین ترکیبات آن، در دمای ۶۳ تا ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه پاستوریزه شد و به منظور انجام مراحل تولید ماست دمای شیر را به ۴۵ درجه سانتی گراد رسانده و در ظروف استریل یک لیتری ریخته شد. پس از آن طبق دستور العمل، استارتر در دمای ۴۰ درجه به شیر اضافه شد. غلظت

های مختلف پودر پنیرک به ترتیب صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۱/۵٪ اضافه و خوب بهم زده تا پنیرک بصورت یکنواخت در ماست همگن شود. سپس تمامی ظرف ها با دمای ۳۸ درجه سانتی گراد به گرمخانه منتقل شد. پس از رسیدن اسیدیته نمونه ها به ۹۰ درجه دورنیک (۴/۶~pH) نمونه ها از گرمخانه خارج و به یخچال با ۴ درجه سانتی گراد انتقال داده شد. ماست پنیرک تولید شده را در روز (۱-۷-۱۴-۲۱-۲۸) از نظر ویژگی های حسی و آزمون های فیزیکوشیمیایی و میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۵- آزمون های فیزیکوشیمیایی ماست

۲-۵-۱- اندازه گیری pH

اسیدیته ی نمونه ها مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ با استفاده از دستگاه pH متر در روز های ۱، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ اندازه گیری می شود. ابتدا pH متر با محلول های بافر با pH ۴: ۷ و کالیبره شده پس از تنظیم آن و شستشو الکتروود دستگاه

با آب مقطر، الکتروود pH متر مستقیماً داخل نمونه به مدت حداقل ۴۵ ثانیه قرار می دهیم و pH نمونه ها در سه تکرار سنجیده و میانگین داده ها گزارش شد (۸).

۲-۵-۲- اندازه گیری اسیدیته

اسیدیته کل عبارت است از مقدار هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال که بتواند میزان اسید مقدار معینی از شیر و فرآورده های آن در حضور فنل فتالئین خنثی با روش عیارسنجی خنثی کند.

مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲، مقدار ۹ گرم از نمونه در بشر وزن شد و هم وزن نمونه آب مقطر افزوده شده و مقدار ۰/۵ میلی لیتر شناساگر فنل فتالئین به آن افزوده گردید

و با سود ۰/۱ نرمال تا ظهور رنگ ارغوانی ثابت تیترا می شود .
اسیدیته برحسب درصد اسید لاکتیک و با استفاده از فرمول زیر
محاسبه می شود: (۸)

$$\text{درصد لاکتیک اسید} = \frac{N \times 0/0009 \times 100}{M}$$

۳-۵-۲- اندازه گیری ماده خشک

که از قبل داخل آون (۲ ± ۱۰۳) به مدت ۲ ساعت قرار گرفته
و خنک شده بود توزین می شود و مجدداً ظرف همراه با نمونه
داخل آون با همان دما به مدت ۳ ساعت قرار می گیرد. بعد
خشک شدن در دسیکاتور، مقدار کل ماده خشک برحسب
درصد وزنی با استفاده از فرمول زیر بدست می آید (۹):

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{m_2 - m_1}{m_1 - m_0} \times 100$$

رویی درون بشر کوچک ریخته شده و حجم آن توسط
پیپت تعیین می شود محاسبه درصد سینرسیس مطابق
فرمول زیر انجام می شود (۱۰):

$$\text{Syneresis} = \frac{VE}{Y} \times 100$$

منظور از ماده خشک، مقدار ماده باقیمانده ای است که پس از
انجام عملیات حرارتی ویژه مشخص شده با استاندارد ملی ایران
به شماره ۶۹۵ بدست می آید. اساس این روش تبخیر آب
موجود در نمونه به وسیله آون در دمای ۲ ± ۱۰۳ درجه سانتی
گراد می باشد. براین اساس حدود ۳ گرم از نمونه درون ظرفی

۵-۴-۲- اندازه گیری آب اندازی

حدود ۲۰ گرم ماست در لوله های سانتیفریوژ وزن شده و در
دستگاه سانتیفریوژ با دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۵
دقیقه با سرعت ۵۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. سپس مایع شفاف

۶-۲-۲- آزمون های میکروبی ماست

۱-۶-۲- شمارش کلی باکتری (توتال کانت)

شمارش کل باکتری ها به روش کشت پورپلیت در محیط کشت
PCA و در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انکوبه می
کنیم (۱۱).

۲-۶-۲- شمارش کپک و مخمر

برای شمارش جمعیت کپک و مخمر از روش کشت سطحی با
استفاده از محیط کشت YGC و سپس انکوبه گذاری در دمای
۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲ ساعت استفاده شد (۱۱).

۳-۶-۲- شمارش کلی فرم

برای شمارش کلیفرم ها، کشت به صورت پورپلیت در محیط VRB و انکوبه گذاری در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت (۱۱).

۶-۴-۲- شمارش استارتر

از محیط MRS آگار ترکیب شده با سیکلوهگزامید (۱/۰ گرم بر لیتر) برای باکتری های اسید لا کتیک باسیلی شکل

(لاکتوباسیلوس) تحت شرایط بی هوازی در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت انجام گرفت (۱۱).

۷-۲- ارزیابی ویژگی های حسی

خواص حسی (ارگانولپتیک) فرآورده غذایی جنبه حسی آن فرآورده را تشکیل می دهند. این خواص به تمامی ویژگی هایی از ماده غذایی اطلاق می شوند که با حواس پنج گانه قابل درک هستند که از عوامل اساسی پذیرش یا رد بسیاری از فرآورده های غذایی و کسب رضایت از مصرف آن ها است. یک فرم

ارزیابی ۴ قسمتی برای بررسی رنگ، طعم، بافت، مزه پذیرش کلی تهیه شد و به منظور بررسی تاثیر فاکتور زمان، بافت، کیفیت محصول و ارزیابی حسی در روزهای اول، هفتم، چهاردهم، بیست و یکم و بیست و هشتم توسط ۸ نفر ارزیاب مورد مطالعه قرار گرفت (۱۲).

۸-۲- تجزیه و تحلیل آماری

داده های حاصل از آزمایش بر اساس طرح فاکتوریل در زمان با بلوک های کاملاً تصادفی تجزیه شدند. آزمون مقایسه میانگین ها با روش دانکن در سطح احتمال ۰/۵ انجام شد. تجزیه تحلیل

داده ها و مقایسه میانگین تیمار ها توسط نرم افزار SPSS و رسم نمودار ها با نرم افزار Excel انجام گرفت.

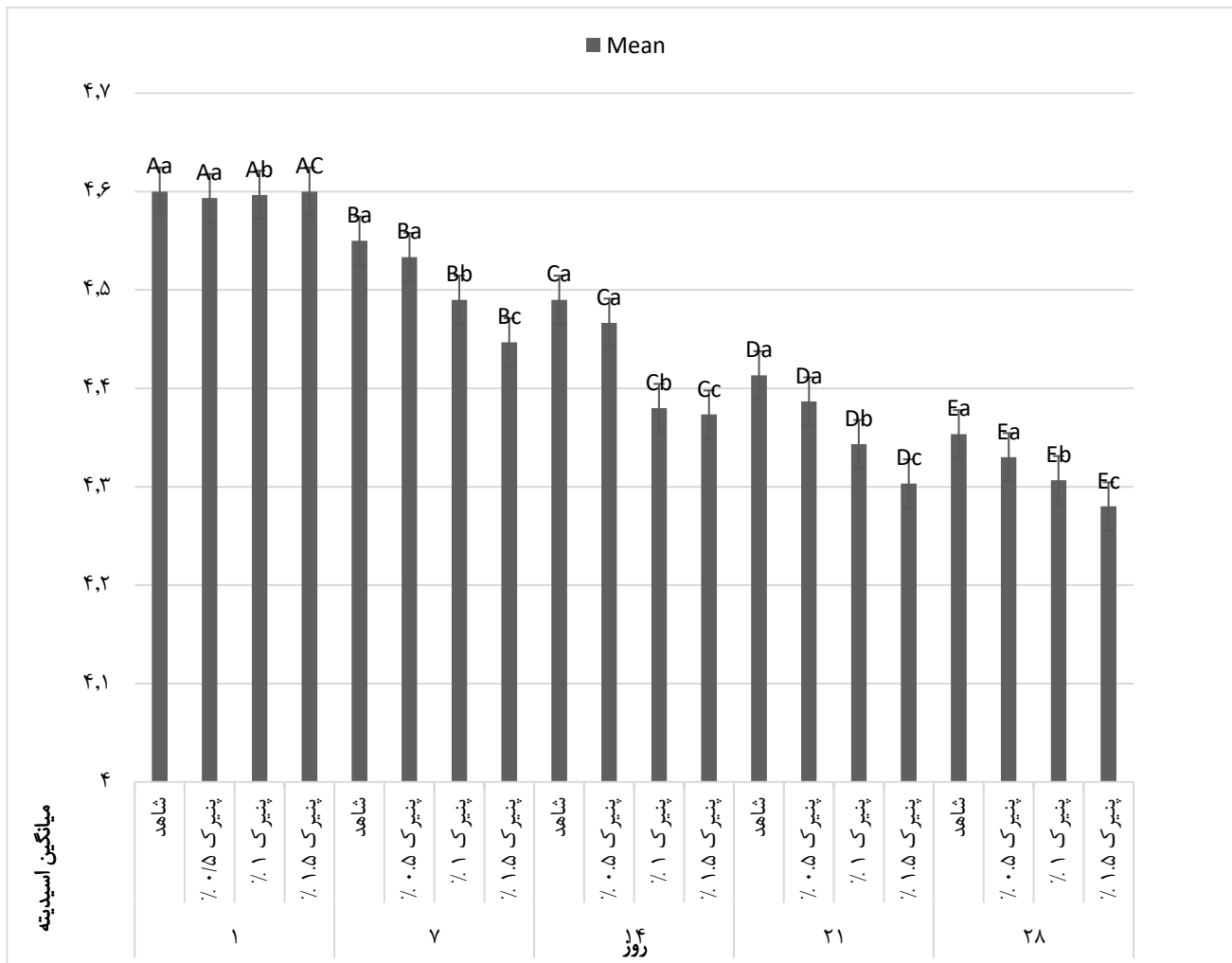
۳- نتایج و بحث

۱-۳- نتایج آزمون های فیزیوشیمیایی

۱-۱-۳- بررسی نتایج آزمون pH

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که pH بین تیمار های شاهد و پنیرک ۰/۵٪ اختلاف معنی داری در سطح ۰/۵٪ دیده نمی شود (p > ۰/۰۵) و بین تیمار های شاهد و پنیرک ۰/۵٪ با تیمار های پنیرک ۰/۱٪ و ۰/۱۵٪ اختلاف معنی داری

مشاهده می شود (p < ۰/۰۵) همچنین مطابق جدول ۴-۱ اثر متقابل بین تیمار ها و زمان در طی ۲۸ روز در بین تمامی تیمار ها اختلاف معنی داری در سطح ۰/۵٪ مشاهده شد (p > ۰/۰۵).



شکل ۳-۱ نمودار تغییرات مقدار اسیدیته در طول زمان

مختلف پودر پنیرک در سطح احتمال ۰.۵٪ دارای pH کمتری نسبت به نمونه ی شاهد می باشند. پدیده به pH بالای پودر پنیرک اضافه شده به ماست نسبت داده می شود. pH نمونه ها به صورت معنی دار در طول دوره ی نگهداری کاهش یافته است. نتایج نشان می دهد pH در نمونه های غنی شده با شدت بیشتری کاهش یافته است و این می تواند به علت ظرفیت بافری بالاتر در ماست نسبت به پودر پنیرک باشد (۱۴). همچنین تغییرات pH نمونه های مختلف ماست در طی زمان نگهداری نشان داده شده است. میزان pH نمونه ها کاهش یافته است و تفاوت معنی داری نیز بین نمونه ها مشاهده شده است. علت این پدیده می تواند بیشتر مربوط به تولید اسید لاکتیک توسط باکتری های اسید لاکتیک باشد که می توانند از دو مولکول لاکتوز، چهار مولکول اسید لاکتیک تولید کنند (۱۵). بیشترین میزان کاهش pH مربوط به ماست حاوی ۱.۵٪ پودر پنیرک

با بررسی نتایج مشاهده شد که در تمامی نمونه ها با گذشت زمان pH کاهش یافته که می توان علت آن را نتیجه تخمیر توسط باکتری های آغازگر موجود در ماست و تولید اسید لاکتیک دانست. روند کاهش pH در طی نگهداری ماست قابل انتظار است که در اثر تحقیقات مرتبط به آن اشاره کرد. نتایج به دست آمده از مطالعه pH نشان داد که با افزایش غلظت پودر پنیرک ، کاهش می یابد و بیشترین مقدار pH مربوط به نمونه ماست شاهد روز اول می باشد و روند کاهش pH در طول دوره نگهداری نسبت به نمونه های شاهد کند تر بود. نجمه صفری و همکاران (۲۰۱۷) طبق پژوهشی که انجام دادند، نشان دادند که افزودن پودر سیر وحشی در ماست باعث روند کند تر شدن کاهش pH در طول دوره ی نگهداری می شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۳). روند تغییرات pH در نمونه های ماست تولید شده بوسیله ی افزودن درصد های

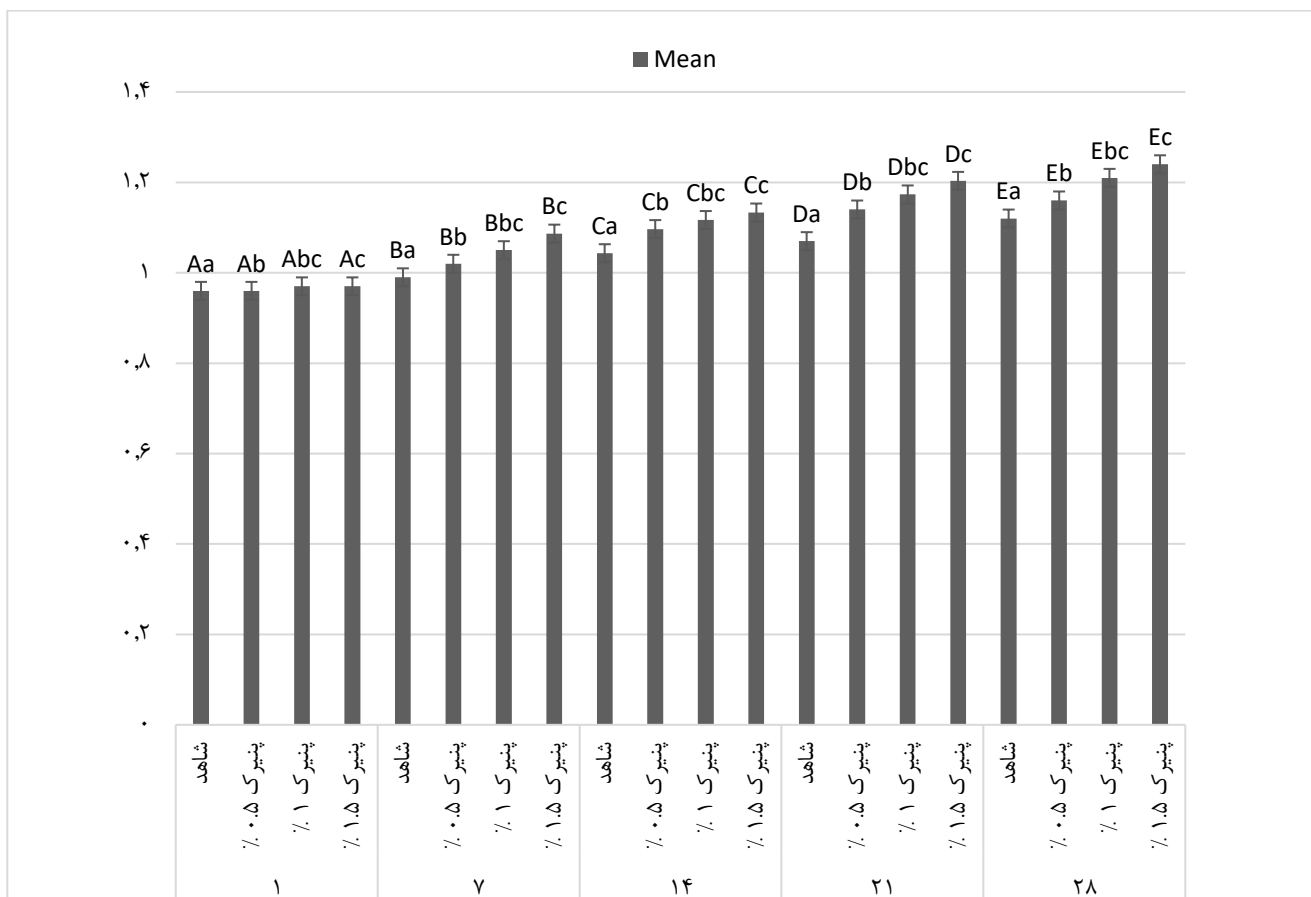
برای بالا بردن ماده خشک استفاده گردید. نتایج تحقیقات انجام شده نشان داد که افزایش غلظت ماده جامد بدون چربی باعث کاهش معنی دار در pH ماست غلیظ شده نسبت به نمونه شاهد می گردد (۱۶).

بود. در طول مدت زمان نگهداری، پایین ترین میزان pH در نمونه ها در روز ۲۸ مشاهده شد. یکی از دلایل آن می تواند این باشد که افزودن پودر پنیرک باعث بالا رفتن ماده خشک محصول می شود. این امر می تواند موجب کاهش pH گردد. به عنوان مثال در تحقیقی مشابه از شیر خشک بدون چربی

۳-۱-۲- بررسی نتایج آزمون اسیدیته

تیمارها به جز نمونه پنیرک ۱٪ اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین بین تیمار های پودر پنیرک و زمان اثرات متقابل آن ها در سطح ۵٪ اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0.05$).

تغییر مقدار اسیدیته نمونه های ماست حاوی مقدار مختلف پودر گیاه پنیرک در طی ۲۸ روز دوره رسیدن نشان داده شده است. نتایج حاصل از انجام آنالیز واریانس نشان می دهد که بین همه



شکل ۳- ۲ نمودار تغییرات مقدار اسیدیته در طول زمان

اسیدیته نسبت به نمونه شاهد شد. علت این امر، آن است که تخمیر ماست با عصاره های گیاهی، منجر به افزایش فعالیت متابولیک باکتری های ماست و افزایش اسیدیته به دلیل تولید اسید های آلی توسط باکتری های اسید لاکتیک می گردد (۱۷). علاوه بر این با گذشت زمان نگهداری، اسیدیته

نتیجه این تحقیق مطابق با تحقیقات نجمه صفری و همکاران (۲۰۱۷) می باشد که نشان داد با افزودن سیر وحشی به ماست باعث افزایش اسیدیته در تمامی نمونه های حاوی پودر سیر وحشی می شود که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد (۱۳). افزودن عصاره های گیاهی به ماست منجر به افزایش معنی دار

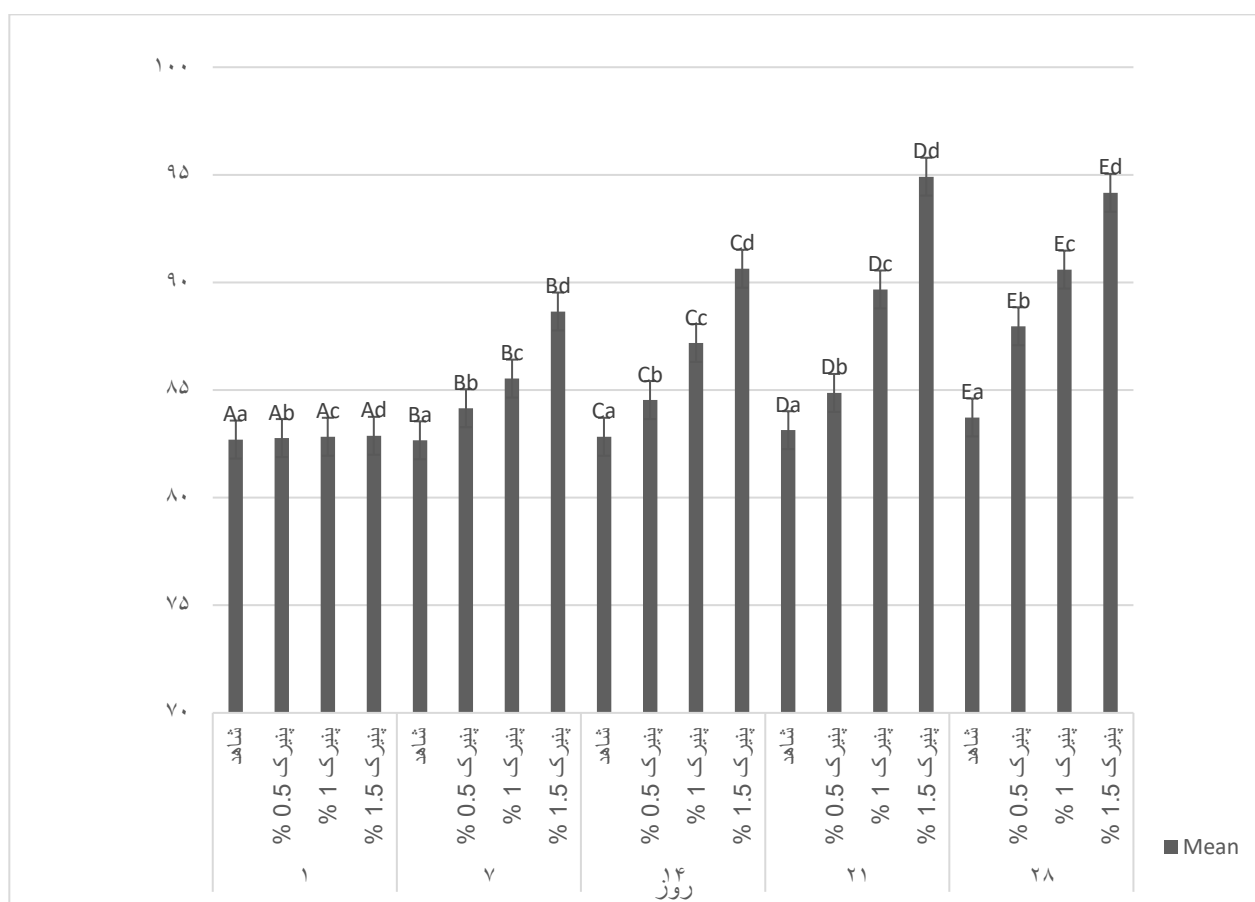
افزایش می یابد (۱۸). کنعانی و همکاران (۱۳۹۳) به غنی سازی ماست پروبیوتیک با عصاره گزنه، اسانس بابونه و اسانس نعناع و اثر آن بر اسیدیته ماست در دوران نگهداری پرداختند و به نتایج مشابهی دست یافتند (۱۹).

کلیه تیمارها به جز پنیرک ۱٪ به طور معنی دار افزایش یافت. علت آن است که با افزایش زمان نگهداری و نیز ادامه فرآیند تخمیر لاکتوز توسط باکتری های استارتر، اسیدیته به دلیل تجمع اسیدهایی نظیر اسید لاکتیک، اسید فرمیک و غیره

۳-۱-۳- بررسی نتایج آزمون اندازه گیری ماده خشک

در سطح احتمال ۵٪ نیز اختلاف معنی داری را نشان می دهد. نتایج حاصل از آزمون توکی در جدول زیر گزارش شده است.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که بین تیمار های پودر پنیرک و درصد ماده خشک اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ وجود دارد. همچنین تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمارها



۳-۳ نمودار تغییرات مقدار ماده خشک در طول زمان

احتمال تشکیل پیوند های شیمیایی بین ترکیبات ژله ماست و ایجاد مواد جامد و نیز تبخیر حلال از ماست، ماده خشک نسبت به حجم کلی ماست افزایش می یابد. نتایج حاصل از این پژوهش با نتایج پژوهش حیدری و همکاران که نشان دادند افزودن پودر دانه تاج خروس به ماست باعث افزایش ماده خشک در طول نگهداری می شود، مطابقت دارد (۲۰). در خصوص تغییرات در

در این تحقیق میزان ماده خشک تیمارها در طی دوره رسیدن افزایش یافته که این افزایش در تیمار های حاوی پودر پنیرک نسبت به نمونه شاهد افزایش معنی داری را نشان می دهد. به طوری که بیشترین افزایش مربوط به تیمار ۱/۵ و ۱٪ پنیرک می باشد. این طبیعی است که پودر پنیرک به عنوان یک ماده جامد خشک باعث افزایش ماده خشک شود و نیز با گذشت زمان به

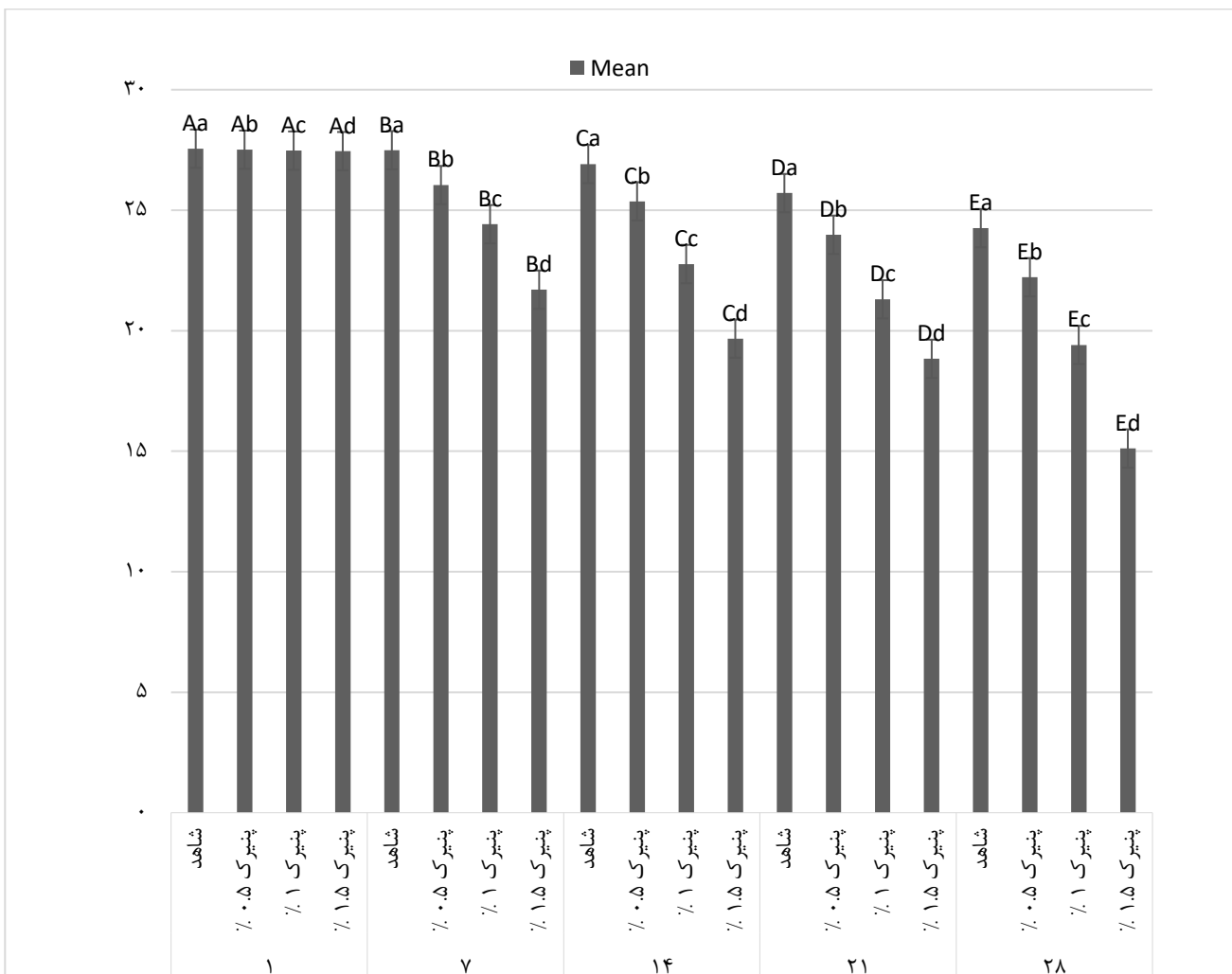
همکاران (۲۰۱۷) نیز در تحقیقات خود بیان داشتند که ماست حاوی پودر سیر وحشی دارای مقادیر پروتئین، خاکستر، ماده خشک و خاصیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به ماست معمولی می باشد (۱۳).

ترکیب شیمیایی نمونه های ماست، نتایج حاصل نشان می دهد که با اضافه کردن پودر پنیرک به نمونه ها، میزان ماده خشک افزایش می یابد. دلیل آن وجود مقادیر زیاد ماده خشک در پودر پنیرک نسبت به شیرمنجر به افزایش درصد ماده خشک با اضافه کردن پودر پنیرک به ماست می گردد (۲۱). *نجمه صفری و*

۴-۱-۳- بررسی نتایج آزمون آب اندازی

۵٪ اختلاف معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$) همچنین اثر متقابل بین تیمار های پودر پنیرک و زمان معنی دار است.

بررسی نتایج آنالیز نشان می دهد که بین تیمار های پودر پنیرک و زمان نگهداری بر میزان آب اندازی در سطح احتمال



شکل ۳-۴ تغییرات آب اندازی در طول زمان

پنیر و خروج آن از ماست می گردد (۲۲). طبق نتایج بدست آمده این روند نزولی می تواند به دلیل استحکام اتصالات ایجاد شده پودر پنیرک با آب باشد. طبق نتایج بدست آمده اسیدی کردن سریع شیر و شرایط گرمخانه گذاری، دو عامل مهم در

یکی از معایب عمده ماست، آب اندازی است که در واقع به ظهور سرم یا آب پنیر در سطح ماست اطلاق می شود. آب اندازی در ماست به دلیل چروکیدگی ساختار سه بعدی شبکه پروتئینی رخ می دهد که منجر به کاهش قدرت اتصال پروتئین های آب

چنیبرگر و همکاران (۲۰۲۴) در تحقیقی که تحت عنوان برآورد عمر مفید ماست غلیظ شده انجام دادند نتایج مشابهی در مورد تأثیر منفی زمان نگهداری بر میزان آب اندازی ماست چکیده سنتی مشاهده نمودند (۲۳).

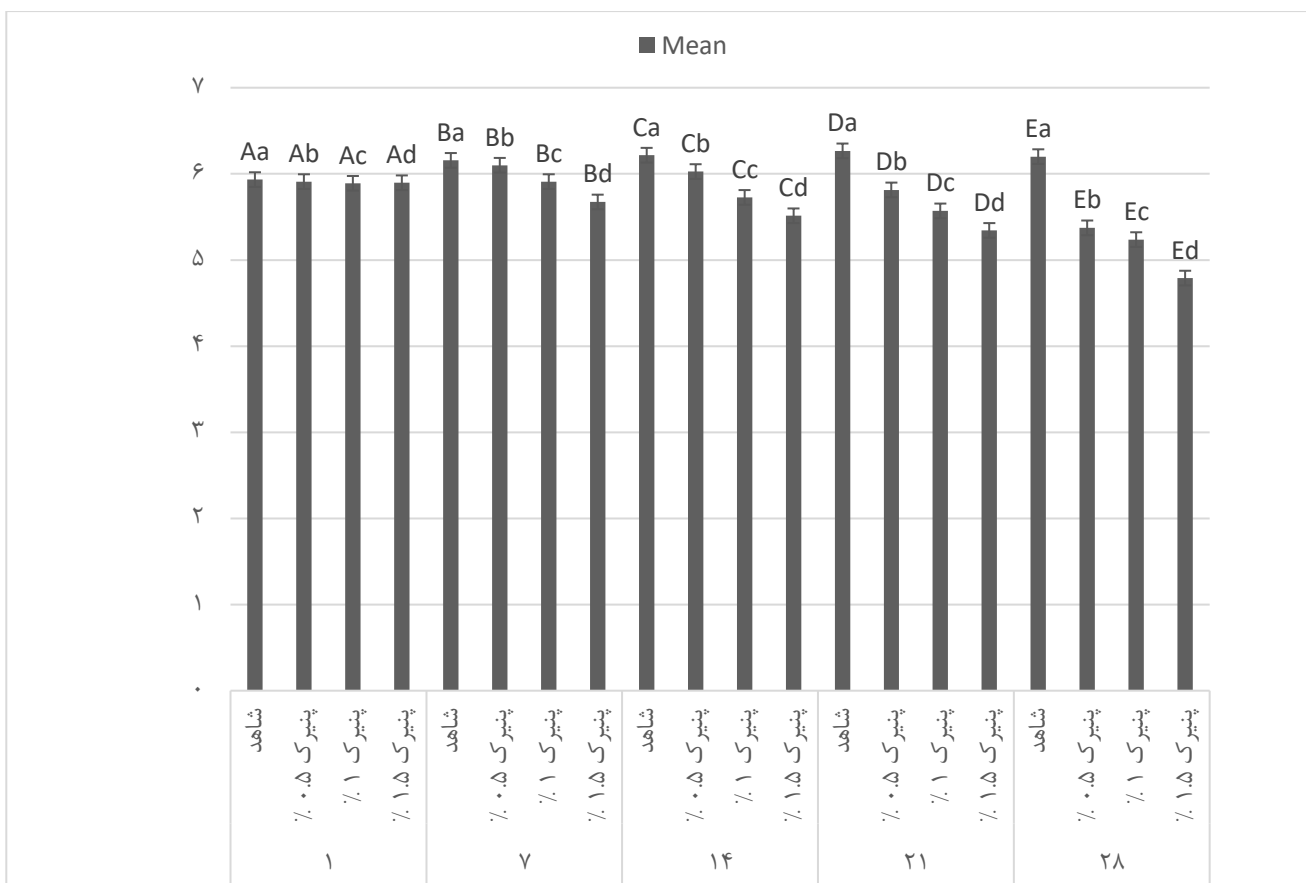
جدا شدن سرم در دلمه های اسیدی از جمله ماست می باشند (۲۲) پدیده آب انداختن، مستقیماً به میزان اختلال فیزیکی، بی دقتی در عمل آوری شیر مانند pH بسیار پایین و عدم کنترل درجه حرارت در مدت گرمخانه گذاری بستگی دارد و باعث به هم خوردن شبکه مسیل های پروتئینی می شود (۸).

۳-۲-نتایج آزمون های میکروبی

۳-۲-۱- شمارش کلی باکتری ها

های پودر پنیرک و زمان و تاثیر متقابل بین تیمارها اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۵٪ وجود دارد.

غلظت های مختلف پودر پنیرک باعث کاهش معنی دار شمارش کلی باکتری ها شده است. ($p < 0/05$) همچنین بین تیمار



شکل ۳-۵ نمودار تغییرات شمارش کلی باکتری ها در طی زمان

شده توسط سایر محققین همسو می باشد. شیرانی (۲۰۲۱) به بررسی اثرات ضد باکتریایی عصاره غیر قطبی گیاه پنیرک با استفاده از روش های انتشار چاهک و رقت لوله ای پرداختند و یافتند که عصاره غیر قطبی گیاه پنیرک از رشد باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیاکلا* و *سودوموناس آئروژینوزا* جلوگیری کرده و اثر ضد باکتریایی آن

مقادیر کل باکتری در تمامی نمونه های حاوی پنیرک کمتر از نمونه شاهد بوده و با افزایش غلظت پنیرک، مقدار باکتری نمونه ها کاهش یافته است که دلیل آن دارا بودن خاصیت ضد باکتریایی گیاه پنیرک در طی نگهداری و رسیدگی ماست است که سبب کاهش جمعیت میکروبی شده است. نتایج این تحقیق در زمینه خاصیت ضد باکتری گیاه پنیرک با مطالعات انجام

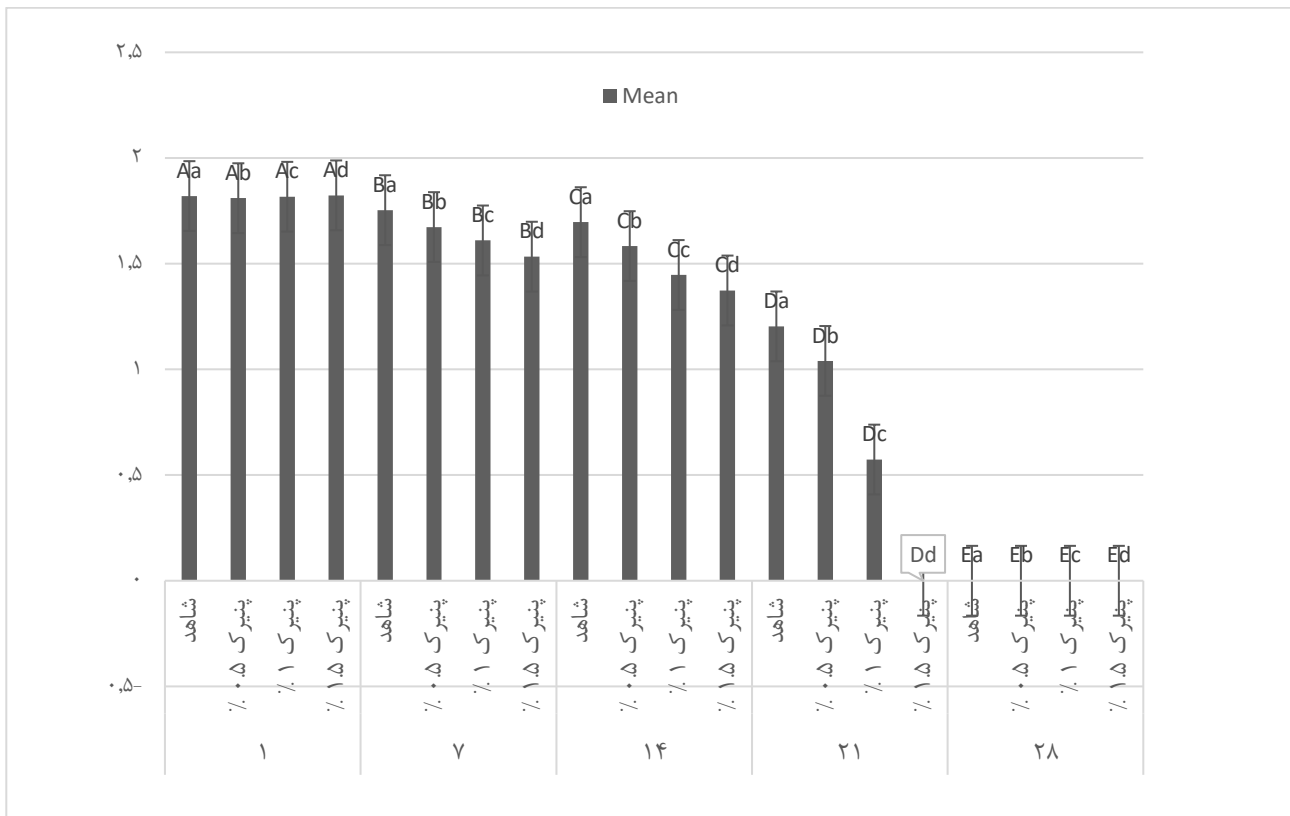
باکتری ها تاثیر می گذارند، نفوذ پذیری را مختل کرده و منجر به اختلال در فعالیت غشای سلولی در پذیرش انتقال الکترونی، برداشت مواد مغذی، سنتز اسید نوکلئیک و ... می شوند (۲۵).

آنزیم ATPase می باشد و برای مثال در باکتری/شیرشیا کلای از سنتز فلاژلین ممانعت می کند. (۲۷) با کاهش pH نمونه ها و نیز نگهداری در یخچال، شرایط برای رشد کلی فرم ها نامساعد شده و این میکروارگانیسم ها از محیط حذف خواهند شد. کلی فرم ها برای فعالیت مناسب نیاز به دمای ۷ تا ۴۴ درجه سانتیگراد و pH اولیه حداقل ۴/۵-۴/۴ دارند و اگر شرایط محیط خارج از این محدوده باشد، دیگر کلی فرم ها رشد نخواهند کرد، رقابت با لاکتیک اسید باکتری ها نیز شرایط را برای فعالیت کلی فرم ها مشکل تر ساخته و این دسته از میکروارگانیسم ها تحت تاثیر لاکتیک اسید باکتری ها غیرفعال می گردند (۲۸ و ۲۹).

با افزایش عصاره افزایش می یابد (۲۴). اهمیت استفاده از اسانس ها و ترکیبات گیاهی در این است که حاوی ترکیبات فنولی می باشند، این ترکیبات مسئول خواص ضد میکروبی فرآورده های گیاهی هستند. به طوری که بر روی غشای سلولی

۳-۲-۲- شمارش کلی فرم ها

نتایج حاصل از انجام آنالیز واریانس نشان می دهد که بین تیمار های غلظت پودر پنیرک، زمان و اثر متقابل آن ها اختلاف معنی داری از نظر تعداد کلی فرم، وجود دارد ($p < 0.05$). اثر متقابل مقادیر مختلف پودر پنیرک و زمان بر شمارش کلی فرم ها در ماست تولیدی معنی دار بود. پنیرک یکی از گیاهانی است دارای خواص غذایی و دارویی بسیار زیادی می باشد و دارای عطر و بوی بسیار مطبوعی می باشد. ترکیبات موجود در این گیاه و خواص آن در تحقیقات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است و وجود ترکیبات ضد میکروبی در این گیاه مشخص شده است (۲۶). کارواکرول به غشای باکتری ها آسیب می زند و قابلیت نفوذ پذیری غشای سلولی را افزایش می دهند و منجر به تراوش ATP می شوند. کارواکرول به طور خاص دارای اثر ممانعت روی

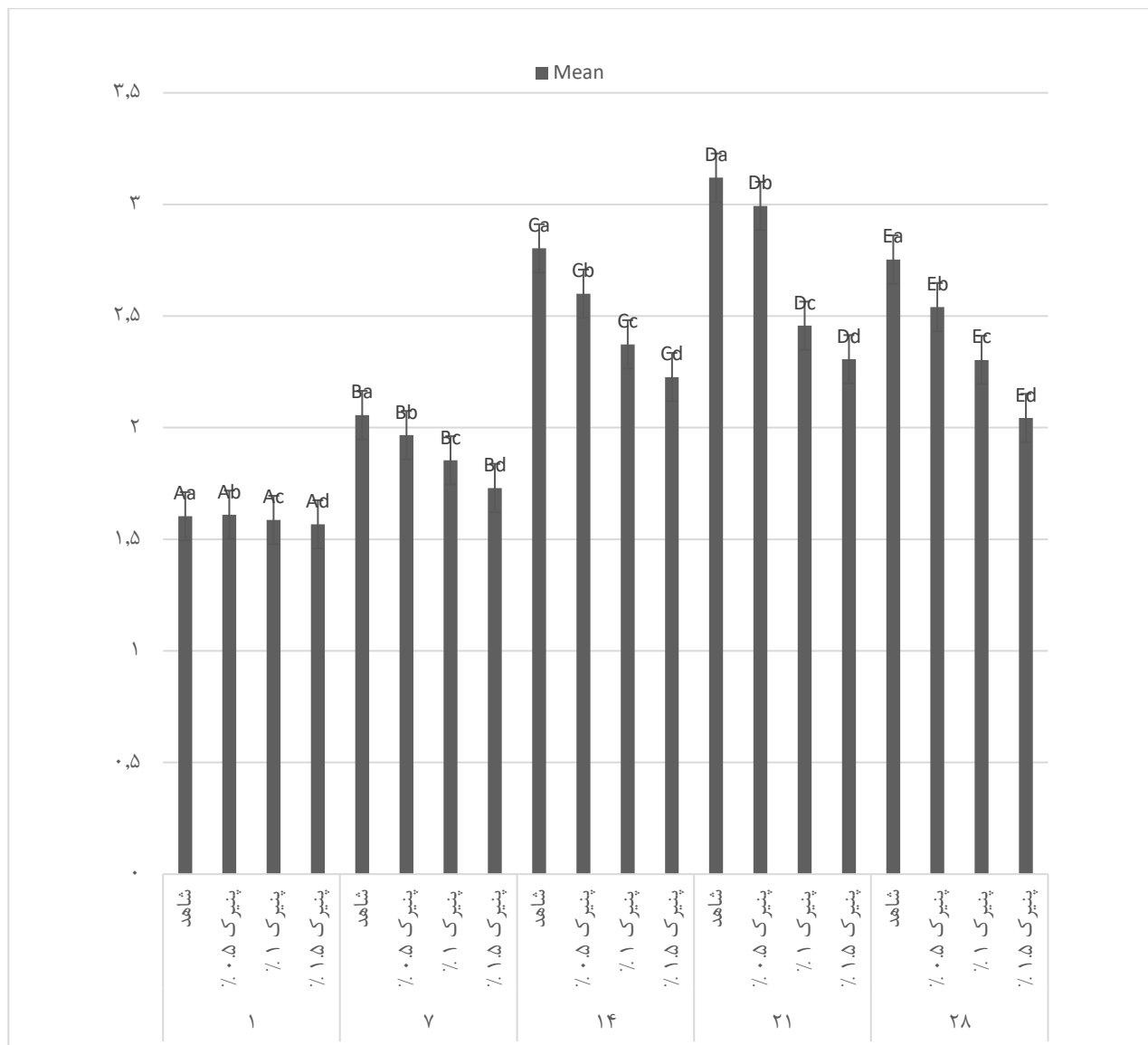


شکل ۳-۶ نمودار تغییرات کلی فرم در طول زمان

۳-۲-۳- بررسی نتایج آزمون کپک و مخمر

آبی، pH و در دسترس بودن مواد مغذی دارد. علاوه بر این، شرایط ذخیره سازی و همچنین حضور میکروب های دیگر، تعیین می کند که کدام نوع از قارچ ها در یک سیستم غذایی خاص رشد کند (۲۸ و ۳۰). کپک ها قادر به رشد در انواع مختلفی از غذاها می باشند. حضور گونه پنسیلیوم نوتاتوم به عنوان یک مشکلی جدی و مکرر در صنعت لبنیات چشمگیر است، زیرا این جنس از کپک می تواند در ماست به دلیل وجود شرایط هوازی رشد نماید (۳۱ و ۳۲).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که بین تیمار های غلظت پودر پنیرک، زمان و اثر متقابل آن ها اختلاف معنی داری از نظر کپک و مخمر وجود دارد. نتایج به دست آمده از شمارش کپک و مخمر نشان داد که طی نگهداری ماست تعداد کپک و مخمر افزایش یافته به طوری که در روز ۲۱ به حداکثر رسیده و سپس تا روز ۲۸ کاهش می یابد ولی با اضافه کردن پودر پنیرک روند کاهشی کپک و مخمر ادامه دارد. حضور قارچ ها در مواد غذایی بستگی به عوامل مختلفی از جمله فعالیت

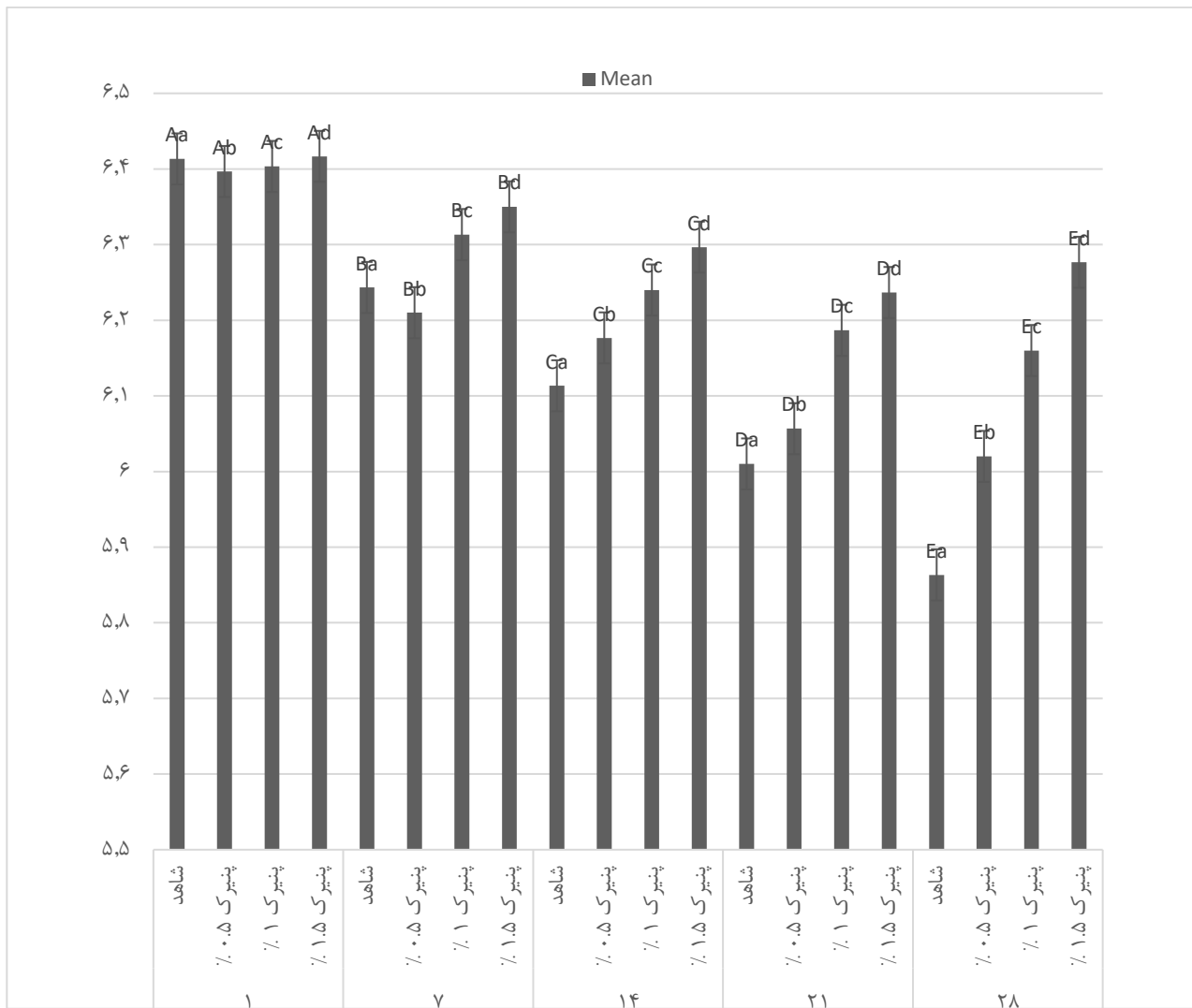


شکل ۳-۷ نمودار تغییرات کپک و مخمر در طول زمان

۴-۲-۳- شمارش استارترها

نتایج حاصل از آنالیز واریانس مربوط به شمارش لاکتوباسیلوس ها در تیمار شاهد و تیمار های دارای پودر پنیرک در طول مدت زمان نگهداری ۲۸ روز نشان داده شده است. نتایج آنالیز واریانس نمونه های ماست نشان می دهد که بین تیمار ها و همچنین بین مدت زمان نگهداری و اثرات متقابل آن ها اثر معنی داری روی شمارش جمعیت لاکتوباسیلوس ها دارد ($p < 0.05$). دو میکروارگانیزم / استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس بولگاریکوس دو کشت آغازگر ماست هستند که دارای رشد همزیست می باشند. فعالیت این باکتری ها بر ویژگی های کلی ماست اثرگذار است. لاکتیک اسید باکتری ها مسبب تولید اسید، جلوگیری از رشد پاتوژن ها و ایجاد عطر و طعم می باشند (۳۳ و ۳۴). عامل غلظت پودر پنیرک و زمان نگهداری به

طور معنا داری بر شمارش باکتری های آغازگر ماست حاوی پودر پنیرک موثر است، تعداد باکتری های زنده آغازگر در نمونه های دارای پودر پنیرک نسبت به نمونه ی شاهد بیشتر است. می توان گفت غیر از pH عوامل دیگری بر تعداد باکتری های زنده در طی نگهداری ماست دخیل هستند، حضور ترکیبات مانند الیگوساکاریدها، فیبر و نشاسته و اثرات حفاظتی و تحریک کنندگی آن ها بر روی میکروارگانیزم های آغازگر یکی از دلایل بقای بیشتر این باکتری ها است (۲۰ و ۳۵). فاکتورهای تحریک کننده مانند کربوهیدرات های پیچیده (نشاسته)، اسیدهای آمینه، ویتامین ها، مواد معدنی و آنتی اکسیدان ها برای رشد آغازگرها مفید تشخیص داده شده اند (۱۴).



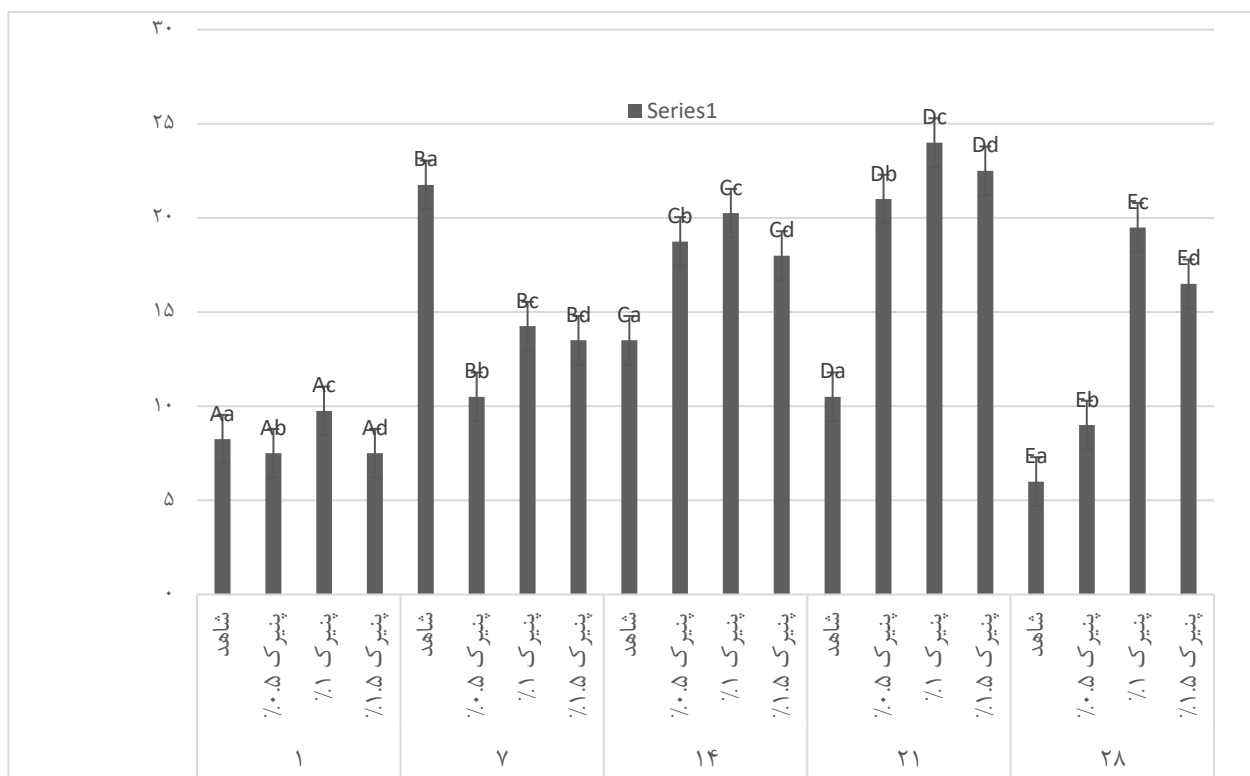
شکل ۳-۸ نمودار تغییرات مقدار لاکتوباسیلوس ها در طی زمان

۳-۳-نتایج آزمون های حسی

۳-۳-۱- بررسی نتایج طعم ماست (بو، مزه)

باعث کاهش پذیرش کلی مصرف کنندگان می شود. غلظت ۱٪ پودر پنیرک در نمونه ماست ها متناسب با ذائقه ارزیاب ها بود اما نمونه ماست های شاهد پایین ترین نمره را از ارزیاب ها دریافت کردند.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که شاخص طعم بین تیمار ها اختلاف معنی داری داشت . همچنین اثر متقابل بین تیمار ها و زمان در طی ۲۸ ، اختلاف معنی داری در سطح ۵٪ مشاهده شد. هرچه غلظت پودر پنیرک در نمونه ماست ها افزایش یابد طعم آن بیشتر ظاهر می شود و به همین دلیل

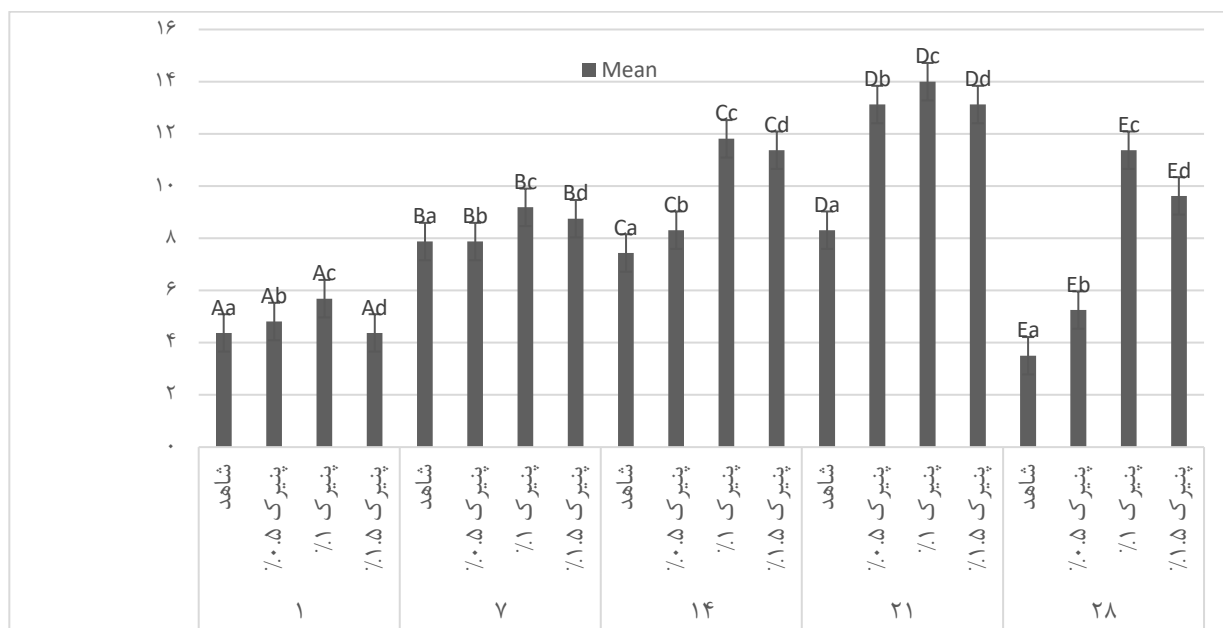


شکل ۳-۹ نمودار تغییرات مقدار طعم ماست در طی زمان

۳-۳-۲- بررسی نتایج بافت دهانی ماست (احساس دهانی)

شاهد در روز ۲۸ و بیشترین مقدار مربوط به نمونه پنیرک ۱٪ در روز ۲۱ برابر با ۱۴/۰۰ است که ارزیاب ها در نظر گرفته اند. شکل زیر تغییرات مقدار طعم مربوط به تیمار ها در طی زمان را نشان می دهد.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که بافت دهانی بین تیمار ها اختلاف معنی داری داشت همچنین اثر متقابل بین تیمار ها و زمان در طی ۲۸ روز در بین تمامی تیمار ها اختلاف معنی داری در سطح ۰.۵٪ مشاهده می شود. با توجه به جدول کمترین مقدار بافت دهانی برابر با ۳/۵۰ مربوط به نمونه

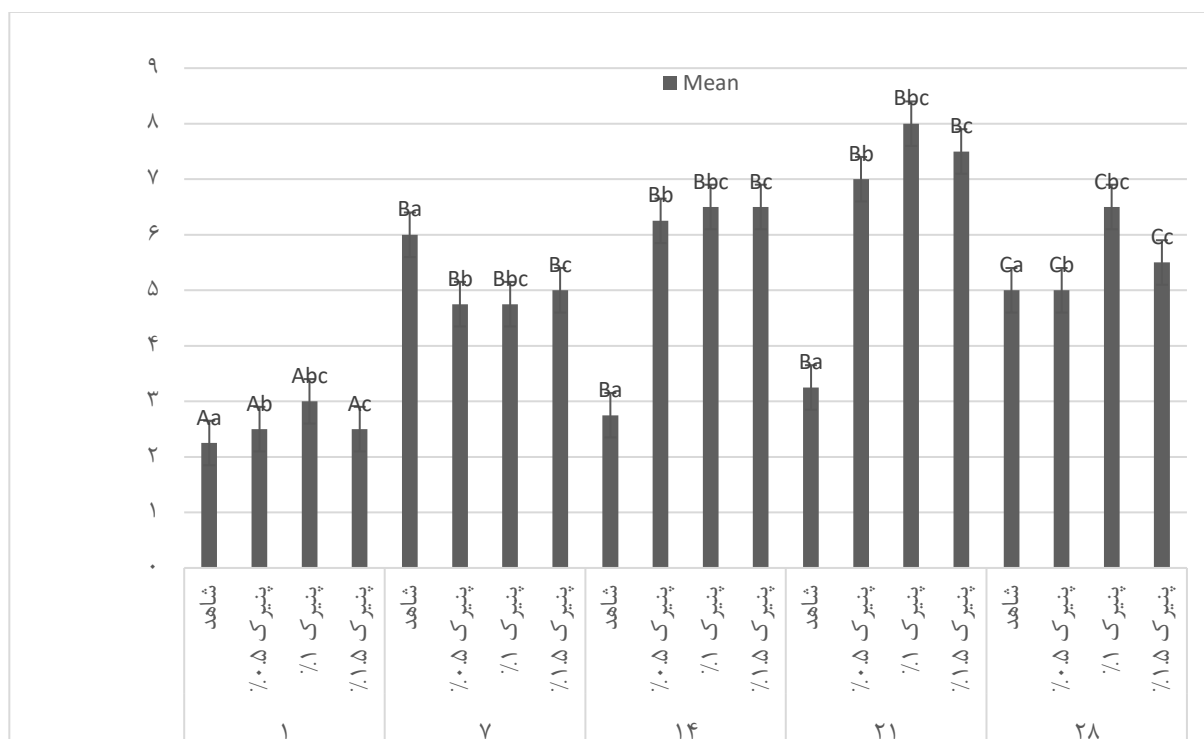


شکل ۳-۱۰ نمودار تغییرات احساس دهانی ماست در طی زمان

۳-۳-۳ بررسی نتایج شاخص ظاهری ماست (رنگ، آب اندازی)

ها و زمان در طی ۲۸ روز در بین روز های ۱۴، ۷ و ۲۱ اختلاف معنی داری در سطح ۰.۰۵٪ مشاهده نمی شود ($p > 0.05$).

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که شاخص ظاهری بین تیمار های شاهد، پنیرک ۰/۵٪ و پنیرک ۱/۵٪ اختلاف معنی داری داشت ($p < 0.05$). همچنین اثر متقابل بین تیمار

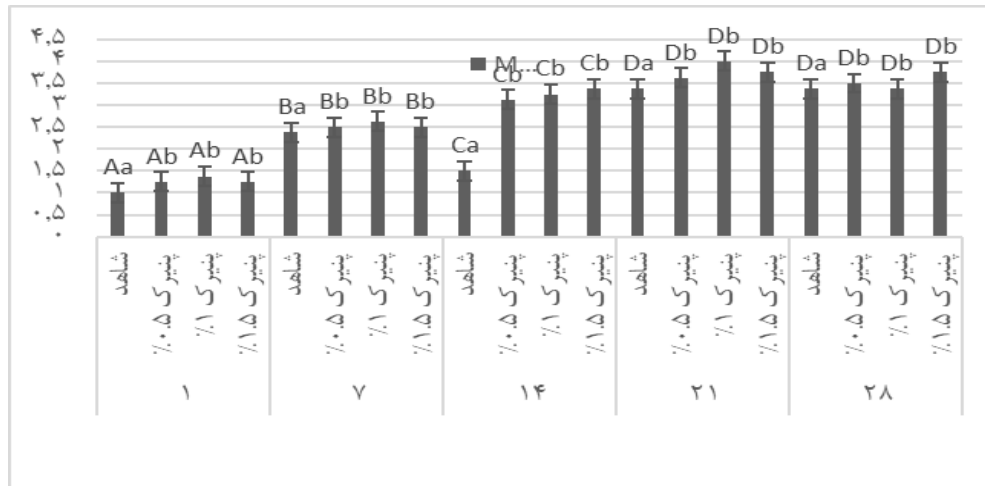


شکل ۳-۱۱ نمودار تغییرات ظاهری ماست در طی زمان

۳-۳-۴ بررسی نتایج بافت غیر دهانی ماست (قاشق زدن)

پودر پنیرک بود. همچنین اثر متقابل بین تیمار ها و زمان در طی ۲۸ روز دوره رسیدگی، بین روز اول تا ۲۱ اختلاف معنی داری در سطح ۰.۰۵٪ مشاهده می شود.

نتایج حاصل از آنالیز واریانس نشان می دهد که بافت غیر دهانی بین تیمار ها اختلاف معنی داری نداشت. اختلاف معنی داری بین نمونه شاهد با سایر نمونه های حاوی درصد های مختلف



شکل ۳-۱۲ نمودار تغییرات احساس غیر دهانی ماست در طی زمان

۴- نتیجه گیری کلی

اثر مهار کنندگی خوبی بر کلی فرم ها دارد. نتایج بررسی آزمون کپک و مخمر نشان دهنده اثرات ضد قارچی پودر پنیرک است. با افزایش غلظت پودر پنیرک اختلاف معنی داری در کاهش کپک و مخمر مشاهده شد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تعداد باکتری های اسید لاکتیک نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار است. از روز ۷ تا انتهای دوره رسیدگی شاهد کاهش تعداد اسید لاکتیک بودیم اما در بین تیمار های حاوی پودر پنیرک شاهد افزایش مشاهده شد که نشان می دهد پودر پنیرک اثر مهار کنندگی بر باکتری های اسید لاکتیک در مقایسه با نمونه های شاهد نداشته است. میزان طعم نمونه ها بین تیمار ها اختلاف معنی داری را نشان داد. همچنین تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان معنی دار است. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین نمونه ها در شاخص ظاهری ماست نشان می دهد که تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان در روز های ۷، ۱۴ و ۲۱ اختلاف معنی داری نشان نداد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین نمونه ها نشان داد که بین تمامی تیمار ها، در بافت دهانی ماست اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین نشان می دهد که تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان دارای اختلاف معنی داری است. نتایج بررسی بافت غیر دهانی ماست نشان داد که تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان معنی دار نیست.

با توجه به نتایج آنالیز واریانس میانگین های به دست آمده از بررسی ویژگی های فیزیکوشیمیایی، میکروبی و حسی بین نمونه های ماست به نتایج زیر می توان اشاره کرد:

نتایج PH نمونه ها نشان داد که بین تیمار ها ، در نمونه شاهد و پنیرک ۰.۵٪ اختلاف معنی دار مشاهده نشد اما بین نمونه های ۱٪ و ۱.۵٪ پودر پنیرک اختلاف معنی دار بود. اما تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان معنی دار است. میزان اسیدیته نمونه ها بین تیمار ها، در نمونه ۱٪ پنیرک اختلاف معنی داری را نشان نداد اما بین بقیه تیمار اختلاف معنی دار بود. همچنین تاثیر زمان و اثر متقابل بین تیمار ها و زمان معنی دار است. میزان ماده خشک تمامی تیمار ها از لحاظ آماری اختلاف معنی داری را نشان می دهد به طوری که با گذشت زمان میزان ماده خشک در همه تیمار ها افزایش یافت که این افزایش با افزودن پودر پنیرک به تیمار ها چشمگیر بود. با افزودن پودر پنیرک به ماست بر میزان آب اندازی آن بسته به غلظت پودر پنیرک، کاهش یافت که این کاهش اختلاف معنی داری را در بین همه تیمار ها نشان داد. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تعداد کلی فرم ها نشان می دهد که افزودن پودر پنیرک به تیمار ها تاثیر معنی داری در کاهش تعداد کلی فرم ها داشته و می توان نتیجه گرفت پودر پنیرک

۴-۱- پیشنهادات

لبنی پیشنهاد می شود. به صورت صنعتی از این گیاه در فرموله کردن ماست ها استفاده شود. با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی که گیاه پنیرک دارد پیشنهاد می شود در سایر بخش های صنایع غذایی نیز تحقیقاتی در زمینه کاربرد آن به عنوان یک نگهدارنده طبیعی صورت گیرد.

تاثیر غلظت های متفاوتی از پودر پنیرک در خواص فیزیکیوشیمیایی، میکروبی و حسی ماست مورد مطالعه قرار گیرد. بررسی و استفاده از سایر گیاهان دارویی در فرموله کردن ماست با توجه که ایران کشوری پوشیده از پوشش های گیاهی است. انجام دادن تحقیقات مشابهی بر روی تاثیر اسانس و عصاره این گیاه در صنعت ماست و فرآورده های

Reference

1. Yousefi M, Soharian N. The article is the flavor of yogurt and the factors affecting its production. Semnan University of Medical Sciences. 2018.
2. Kumar P, Mishra HN. Yoghurt powder: A review of process technology, storage and utilization. Food Bioprod Process. 2004;82(C2):133-42.
3. Mobaraki E, Nakhai Moghadam T, Golmakani M. Milk and dairy products as functional foods. In: The 22nd National Congress of Iran Food Science and Technology; 2014. p. 20-24.
4. Gasparetto JC, Martins CAF, Hayashi SS, Otuky MF, Pontarolo R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: A millennial herbal medicine. 2011.
5. Ahwazi M, Rizvan Aghdam A, Habibi Khaniani B. Seeds of medicinal plants (morphology, physiology, and medicinal properties). Tehran: Academic Jihad Publications; 2010. p. 131-202.
6. Zahouri. Encyclopaedia of Medicinal Plants. 2nd ed. Tehran: Tahsin Publications; 2019.
7. Tabaraki R, Yosefi Z, Gharneh HAA. Chemical composition and antioxidant properties of *Malva sylvestris* L. Agric Sci Res J. 2012;8:59-68.
8. Iran Institute of Standards and Industrial Research. National Standard of Iran No. 2852: Milk and its products – Determination of acidity and pH – Test method. 2012.
9. Iran Institute of Standards and Industrial Research. National Standard of Iran No. 695: Milk and its products – Yogurt – Characteristics and test methods. 2003.
10. Panesar PS, Shinde CH. Effect of storage on syneresis, pH, *Lactobacillus acidophilus* count, *Bifidobacterium bifidum* count of Aloe vera fortified probiotic yoghurt. J Dairy Sci Technol. 2011;4:17-23.
11. Del Nobile MA, Gammariello D, Conte A, Attanasio M. A combination of chitosan, coating, and modified atmosphere packaging for prolonging Fior di Latte cheese shelf life. Carbohydr Polym. 2009;78(1):151-6.
12. Anonymous. British Standard for Milk and milk products – Sensory analysis Part 2: Recommended methods for sensory evaluation. BS ISO 22935-2. 2009.
13. Safari N, Fazel M, Jihad M. The effect of wild garlic powder on physicochemical properties of stirred yogurt. Iran J Food Sci Technol. 2017;14:335-44.

14. Zare F, Boye J, Orsat V, Champagni C, Simpson B. Microbial, physical, and sensory properties of yogurt supplemented with lentil flour. *Food Res Int*. 2011;44:2482–8.
15. Faraji N, Alizadeh M, Almasi H, Pirsa S, Fraji S. Evaluation of physicochemical and sensory properties of probiotic yogurt enriched by Iranian shallot nanoemulsion containing omega-3 fatty acid. *FSCT*. 2020;17(100):77–101.
16. Grossi A, Yazidi Z, Ahmadi J. Optimizing yogurt enriched with phytosterols to reduce cholesterol. *J Food Sci Ind*. 2018;7(2):156–63.
17. Vahedi N, Mazaheri M. Optimizing the formulation of concentrated fruit yogurt and checking its quality during shelf life. In: *Proceedings of the 18th National Conference of Food Sciences and Industries*; Mashhad. 2017.
18. Shahsavari H, Bolandi M, Baghaei H. Evaluation of physicochemical and sensory properties of probiotic yogurt enriched by Iranian shallot nanoemulsion containing omega-3 fatty acid. *FSCT*. 2019;16(89):263–73.
19. Kanani B, Khosrow Shahi Asl A, Alizadeh M, Pour Ahmad R. Enrichment of probiotic yogurt with nettle extract, chamomile, and mint essential oils and its effect on yogurt acidity during storage. In: *Proceedings of the 22nd National Congress of Food Science and Industry*; Urmia University. 2013.
20. Heidari M, Jihadi M, Fazel M, Ghasemi Peru N. An investigation on the effect of addition of *Amaranthus cruentus* powder on quality properties of yogurt. *Iran J Food Sci Technol*. 2017;14:271–84.
21. Hedayat Saatloo A, Khosrow Shahi A, Zomorodi S. Production of functional fruit yogurt from buffalo milk by adding mallow powder (*Malva sylvestris*). *J Innov Food Sci Technol*. 2024;16(2):77–89.
22. Esfandiari H, Moslehishad M. Evaluation of physicochemical, sensory, and rheological properties of stirred yogurt fortified with rice bran and lettuce extract during shelf life. *FSCT*. 2019;16(90):245–58.
23. Schneeberger SJ, Madgwick N, Schotter L, Rohrs Ameen U, Kasozi G. Shelf life extension for yogurt production in circumstances of regular power outages: Eritrean yogurt study. *J Food Sci Nutr Ther*. 2024;10(1):1–8.
24. Shirani Bidabadi Kh. Investigation of the minimum inhibitory concentration and minimum bactericidal concentration of *Malva sylvestris* extracts and their interaction on some pathogenic bacteria in vitro. 2021;112(18):69–79.
25. Mansoori N, Moghaddam M, Kazemi F, Bahreini M, Aroie H. Influence of different concentrations of ethanolic extract of seven medicinal plants on three bacteria strains. *J Sch Med Shahid Beheshti Univ Med Sci*. 2018;41(4):236–43.
26. Eghbal H, Mohammadi A, Mohammad Nejad Khiavi N, Ahmadi Sabegh M, Jahani N. Comparison of the antibacterial properties of essential oils of *Malva sylvestris* and *Salvia officinalis* on common bacteria of oral infection with chlorhexidine mouthwash. *J Mash Dent Sch*. 2021;45(3):217–29.
27. Salimi M, Ebrahimi A, Shujaei Asadieh Z, Sa'idehkordi SS. Extraction and identification of chemical compounds of celeriac. *Med Aromat Plants Iran*. 2010;26:147–56.
28. Simsek B, Sagdic O, Ozcelik S. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the storage of Ayran produced with different spices. *J Food Eng*. 2007;78(2):676–80.
29. Zarali M, Sadeghi A, Jafari SM, Sadeghi Mahoonak A, Ebrahimi M. Evaluation of antimicrobial and probiotic properties of the predominant LAB isolated from fermented

- germinated clover seed. Iran J Food Sci Technol. 2022;19(123):299–15.
30. Jafarpour D, Ataei P. Isolation and identification of mould contaminating UF cheeses in Fasa city. Iran J Food Sci Technol. 2022;18(121):107–16.
31. Tehrani M, Vahidi N. Optimizing the formulation of ordinary fruit yogurt and checking its quality during storage time. In: The 17th National Congress of Iranian Food Industries; 2019.
32. Javidi Y, Goli M. Investigation of physicochemical and microbial properties of low-fat yogurt enriched with whey protein concentration, milk protein concentration, and wheat psyllium fiber. Iran J Food Sci Technol. 2021;18(112):247–60.
33. Montville TJ, Matthews KR. Principles which influence microbial growth, survival, and death in foods. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. 1997. p. 13–29.
34. Alizadeh Behbahani B, Noshad M. Isolation and identification of Lactobacillus strains from Behbahan local cheeses and investigation of technological and antimicrobial properties of these strains against food pathogens. 2021;16(1):133–42.
35. Behzadi Rad A, Salehi Sirjani M, Madani M. In vitro inhibitory effects of Rhus coriaria aqueous and alcoholic extracts on Candida albicans. Complement Med J Fac Nurs Midwifery. 2015;5(1):1105–12.

ارزیابی خصوصیات ضد میکروبی عصاره میخک، عصاره دارچین و اسید استیک بر علیه سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری و تعیین اثرات سینرژیستی آن

عاطفه بزرگی^{۱*}، مهدی شریفی سلطانی^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد بابل، بابل، ایران

۲. دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از گیاهان دارویی از زمان‌های گذشته برای درمان انواع بیماری‌های گوناگون مورد توجه بوده است که از این بین، بیماری‌های عفونی اهمیت والایی داشته‌اند. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره گیاهان دارچین و میخک و عصاره اسید استیک بر دو نوع از میکروارگانیسم‌های عفونی انسان شامل سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری بوده است.

مواد و روش‌ها: عصاره میخک، عصاره دارچین و اسید استیک با درصد غلظت‌های مختلف تهیه و در ۱۸ گروه تیمار مختلف بررسی شدند. خصوصیات ضد میکروبی در هر یک از این گروه‌های تیمار بر علیه سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری مورد مطالعه قرار گرفت.

یافته‌ها: عصاره دارچین در غلظت ۳۹/۰۶ میلی گرم در میلی لیتر و ۳۰/۴۲ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار رشد سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری شد. عصاره میخک در غلظت ۱۵/۲۱ میلی گرم در میلی لیتر و ۷/۶۱ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار رشد سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری شد. اسید استیک در غلظت ۳/۸۲ میلی گرم در میلی لیتر و ۱/۷۱ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار رشد سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری شد. نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از مطالعه نشان داد که خصوصیت ضد میکروبی به ترتیب برتری برای اسید استیک، عصاره میخک و عصاره دارچین بر علیه سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری بوده است. همچنین مشخص شد که استفاده توأمان از این سه ماده ضد میکروب در همه موارد باعث افزایش قدرت ضد میکروبی نشده و در برخی موارد اثرات افزایشی و یا آنتاگونیستی را نشان داده است. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان با توجه به ماهیت غذا بهترین نوع ترکیب را با حداکثر کارایی در نظر گرفت.

کلمات کلیدی: سالمونلا/انتریتیدیس، شیگلا فلکسنری، دارچین، میخک، اسید استیک

Evaluation of antimicrobial properties of clove extract, cinnamon extract and acetic acid against *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri* and determining its synergistic effects

Atefeh Bozorgi^{1*}, Mehdi Sharifi Soltani²

1. Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Babol Branch, Babol, Iran.

2. Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Chalus branch, Chalus, Iran

Introduction: The medicinal plants to treat various diseases has been of interest since the past, among which infectious diseases have been of great importance. The purpose of this study was to investigate the antimicrobial properties of clove plant extract and cinnamon extract and acetic acid on two types of human infectious microorganisms, including *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*.

Methods: clove extract, cinnamon extract and acetic acid were prepared with different concentration percentages and were evaluated in 18 different treatment groups. Antimicrobial properties studied in these treatment groups against *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*.

Results: Cinnamon extract at 39.06 mg/ml and 30.42 mg/ml inhibited the growth of *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*, respectively. Clove extract at a concentration of 15.21 mg/ml and 7.61 mg/ml inhibited the growth of *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*, respectively. Acetic acid at a concentration of 3.82 mg/ml and 1.71 mg/ml inhibited the growth of *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri*, respectively.

Conclusion: The results of the study showed that acetic acid, clove extract and cinnamon extract were superior against *Salmonella enteritidis* and *Shigella flexneri* respectively. It was also found that the combined use of these three antimicrobial substances did not increase the antimicrobial power in all cases and showed additive or antagonistic effects in some cases. According to the results of this research, the best type of combination with maximum efficiency can be considered according to the nature of the food.

Key words: *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*, cinnamon, cloves, acetic acid

مقدمه

علم شناسائی و استفاده از گیاهان دارویی قدمت طولانی دارد و استفاده از این گیاهان از اصلی ترین راهکارهای درمان بیماری‌ها، زخم‌ها و آسیب‌های گوناگون وارده به بدن انسان بوده است. با توجه به پیشرفت سریع و روزافزون علم و تکنولوژی ترکیبات شیمیایی جایگزین این داروهای گیاهی شدند اما امروزه بسیاری از دانشمندان به استفاده مجدد از داروهای گیاهی روی آورده‌اند. در حال حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی، ضد سرطانی و ضد قارچی گیاهان منشأ بسیاری از پژوهش‌ها بوده است (۱) *سالمونلا* باکتری میله‌ای شکل، گرم منفی، بی‌هوازی اختیاری و فاقد اسپور از خانواده آنتروباکتریاسه است که از نظر اندازه متفاوت است (۲). این باکتری مسبب ایجاد بیماری سالمونلوز می‌باشد که یکی از بیماری‌های عمده حاصل از مواد غذایی است و منجر به نگرانی‌هایی در سطح بهداشت عمومی است (۳). از بین سروتیپ‌های مختلف *سالمونلا*، سروتیپ‌های *سالمونلا اینتریتیدس* و *سالمونلا تیپی موربوم* در مقام اول مسمومیت‌های غذایی قرار دارند (۴). شیگلاها، باسیل‌های گرم منفی، غیر هاگدار و غیر متحرک از خانواده آنتروباکتریاسه هستند که از نظر ژنتیکی و فنوتیپی قرابت نزدیکی با *اشریشیا کولای* و گونه‌های جنس *سالمونلا* دارند (۵). شیگلا فقط در انسان و نخستین‌سانان بیماریزا بوده اما در سایر جانوران بیماریزایی

ندارد. این باکتری موجب اسهال خونی در انسان می‌شود (۶). میخک با نام علمی *سیزگیوم آروماتیکوم* یکی از قدیمی ترین گیاهان دارویی جهان است که همچنان در صنعت پزشکی و دارویی کاربرد دارد که در حال حاضر در کشورهای هند، اندونزی، ماداگاسکار، زنگبار، پاکستان، ویتنام و سریلانکا برداشت می‌شود (۲۹،۳۶ و ۷). ماده موثره اسانس میخک، اوژنول است که به دلیل خصوصیات ضد میکروبی نمایانگر این ویژگی در اسانس و عصاره میخک می‌باشد (۸). در تحقیق Mounika و همکاران که در سال ۲۰۲۰ انجام شد خصوصیات ضد میکروبی اسانس میخک در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. در این تحقیق مشخص شد که غلظت ۱۵ و ۱۸ میلی گرم در میلی لیتر اسانس میخک باعث مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولای* شده است (۹). در پژوهش دیگری که در سال ۲۰۱۹ بر روی خصوصیات ضد میکروبی اسانس میخک هندی انجام شد، تایید گردید که اسانس میخک بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کولای*، *لیستریا مونوسیتوژنز* و *سالمونلا تیفیموریوم* خاصیت ضد میکروبی دارد ولی این خصوصیت در غلظت‌های مختلف اسانس متفاوت است (۱۰). دارچین با نام علمی *سینامونیوم کاسیا* به عنوان گیاه دارویی و ادویه‌ای بوده است که کاربردهای فراوانی در آشپزی و شیرینی‌پزی دارد و در هندوستان و چین می‌روید (۳۰). اسانس دارچین در بسته‌بندی مواد غذایی مورد استفاده بوده است و نشانگر خصوصیات ضد میکروبی می‌باشد (۱۱). در پژوهشی عصاره روغنی دارچین با غلظت ۰/۴٪ علیه *سالمونلا اینتریتیدس* استفاده شد و حاکی از کاهش فعالیت میکروبی علیه این باکتری بوده است (۱۲). در پژوهش‌های متعددی ذکر شده که عصاره روغنی گیاهان میخک و دارچین دارای اثرات ضد میکروبی علیه پاتوژن‌های غذازاد (Food-Borne) می‌باشد (۱۶-۱۳، ۷) همچنین در پژوهشی در سال ۲۰۲۱ نشان داده

نویسنده مسئول: استادیار، دانشگاه آزاد

اسلامی واحد بابل

آدرس الکترونیک:

soso_dp@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۲/۲۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

بر این باکتری‌ها بوده است (۲۲). در پژوهشی دیگر مشخص گردید استیک اسید در مقایسه با سیتریک اسید و لاکتیک اسید، بیشترین فعالیت ضد میکروبی را علیه گونه‌های شیگلا سونی، شیگلا بویدی، شیگلا فلکسنری و شیگلا دیسنتریا دارد که در این مطالعه از غلظت ۰/۵٪ از استیک اسید استفاده شد (۲۳). همچنین در مطالعه دیگری میزان ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از استیک اسید به تنهایی و یا همراه با مالیک اسید علیه سالمونلا استفاده شد و نشان داد بیشترین فعالیت میکروبی مربوط به زمانی است که استیک اسید همراه با مالیک اسید استفاده شده است (۲۴). در مطالعه Cosansu و همکاران، سینه و ران مرغ آغشته به سالمونلا/انتریتیدیس و همکاران، سینه و ران مرغ آغشته به سالمونلا/انتریتیدیس $(4-5 \log (MPN)/cm^2)$ شده و سپس در استیک اسید ۱ و ۲٪ غوطه ور شد و کاهش بار آلودگی میکروبی را نشان داد (۲۵). در این پژوهش ما به بررسی و تعیین خصوصیات ضد میکروبی عصاره دارچین، عصاره میخک و استیک اسید بر علیه سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری پرداخته و ارزیابی خصوصیات سینرژیستی ضد میکروبی استفاده توامان عصاره میخک، عصاره دارچین و اسید استیک را بر ضد سالمونلا/انتریتیدیس و شیگلا فلکسنری بررسی کردیم.

شد که عصاره روغنی میخک و دارچین منجر به کاهش کلونیزه شدن باکتری سالمونلا می‌شود (۱۷). در پژوهش دیگری که به صورت درون تنی علیه پاتوژن‌های غذایی به واسطه حضور میخک و دارچین انجام گرفت نشان از عملکرد موثر این دو گیاه دارویی علیه فعالیت میکروبی بوده است (۱۸). استیک اسید جز اسیدهای کربوکسیلیک می‌باشد و در نامگذاری آیوپاک به اتانویک اسید معروف است و دارای فرمول شیمیایی CH_3COOH می‌باشد (۱۹). این اسید در صنعت غذا، تحت کد افزودنی E260 به عنوان تنظیم اسیدیته و به عنوان چاشنی استفاده می‌شود (۲۰). اسید استیک به عنوان یک ماده افزودنی در مواد غذایی نظیر سس کچاپ، سرکه، سس سالاد، میوه های کنسرو شده، انواع سس، مایونز، خردل و غذاهای دریایی استفاده می‌شود. این اسید به طور گسترده در سایر مواد غذایی مانند لبنیات، شیر و پنیر، مرغ و گوشت به کار می‌رود (۲۱). در پژوهشی که بر روی خصوصیات ضد میکروبی اسید استیک انجام گرفت، مشخص شد که باکتری‌های باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا دیزانتریه و سالمونلا تیفی به استفاده از اسید استیک حساس بودند و این اسید نمایانگر اثرات ضد میکروبی

مواد و روش ها

فعال سازی باکتری‌های سالمونلا/انتریتیدیس و

شیگلا فلکسنری

مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند تا فعال شوند. تیمارهای مورد مطالعه بر اساس جدول ۱ تهیه شد که ترکیبی از عصاره میخک، عصاره دارچین و اسید استیک بوده است (جدول ۱).

باکتری سالمونلا/انتریتیدیس (ATCC ۱۳۰۷۶) و باکتری شیگلا فلکسنری (ATCC ۱۲۰۲۲) پس از تهیه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی شهریار کرج، به آزمایشگاه میکروبی‌شناسی دانشگاه بابل منتقل شد و برای دو مرتبه متوالی در محیط نوترینت برات کشت داده شدند و به

جدول ۱. تیمارهای مطالعه

تیمار	میخک %	دارچین %	اسید استیک %
۱	۱۰۰	۰	۰
۲	۸۰	۲۰	۰
۳	۶۰	۴۰	۰
۴	۶۰	۲۰	۲۰
۵	۴۰	۴۰	۲۰
۶	۵۰	۵۰	۰
۷	۰	۱۰۰	۰
۸	۲۰	۸۰	۰
۹	۴۰	۶۰	۰
۱۰	۲۰	۶۰	۲۰
۱۱	۰	۰	۱۰۰
۱۲	۰	۲۰	۸۰
۱۳	۲۰	۰	۸۰
۱۴	۲۰	۲۰	۶۰
۱۵	۰	۴۰	۶۰
۱۶	۴۰	۰	۶۰
۱۷	۵۰	۰	۵۰
۱۸	۰	۵۰	۵۰

آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد باکتری (MIC)

شدند و به هر لوله ۱۰ لاندا از سوسپانسیون نیم مک فارلند *سالمونلا انتریتیدیس* اضافه شد. پس از مخلوط کردن محتویات لوله اول، مقدار ۱ میلی لیتر از این لوله به لوله دوم منتقل شد و این کار تا لوله ۱۱ ادامه یافت. لوله شماره ۱۱ در حکم شاهد بود و به آن استوک تیمار اضافه نشد. در انتها لوله‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت

برای تعیین حداقل غلظت متابولیت که باعث مهار رشد باکتری شده بود به روش ۱۱ لوله عمل شد. برای این کار ابتدا سوسپانسیون میکروبی از باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* با غلظت معادل کدورت نیم مک فارلند تهیه شد. ۱۱ لوله آزمایش تهیه شد که هر لوله حاوی ۱ میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی برات بوده است. سپس لوله‌ها شماره گذاری

انکوبه شدند. لوله ای که در آن کدورت ناشی از رشد دیده نشد به عنوان غلظت ممانعت از رشد در نظر گرفته شد. این عمل برای باکتری شیگلا فلکسنری نیز به طور جداگانه انجام گرفت.

تعیین اثرات برهمکنشی

و در ادامه برای تعیین شاخص FIC از رابطه ۳ استفاده شد.
رابطه ۳:

FIC Index: FIC A + FIC B.

یا

FIC Index: FIC A + FIC B + FIC C.

تفسیر نتایج طبق جدول ۲ عمل شد (۳۷).

برای تعیین برهمکنش ضد میکروبی با استفاده از روابط ۱ و ۲ مقدار FIC هر ماده جداگانه محاسبه شد.

رابطه ۱:

FIC A: MIC of A in combination/MIC of A alone.

رابطه ۲:

FIC A: MIC of A in combination/MIC of A alone.

جدول ۲ تفسیر نتایج شاخص FIC

تفسیر	مقدار شاخص FIC
اثر سینرژیستی	کمتر از ۰/۵
اثر افزایشی	۰/۵ تا ۵
اثر آنتاگونیستی	بیش از ۴

آنالیز آماری

اطمینان ۹۵ درصد ارائه شده و نمودارها با استفاده از نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ طراحی شدند.

در این مطالعه تمامی آزمون‌ها با ۳ تکرار انجام شدند و میانگین نتایج به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۰ و آزمون واریانس یک طرفه و تست دانکن با سطح

نتایج

نتایج آزمون میکروبی MIC

طبق نتایج به دست آمده میزان MIC برای باکتری‌های شیگلا فلکسنری و سالمونلا انتریتیدیس در جدول ۳ آورده شده است.

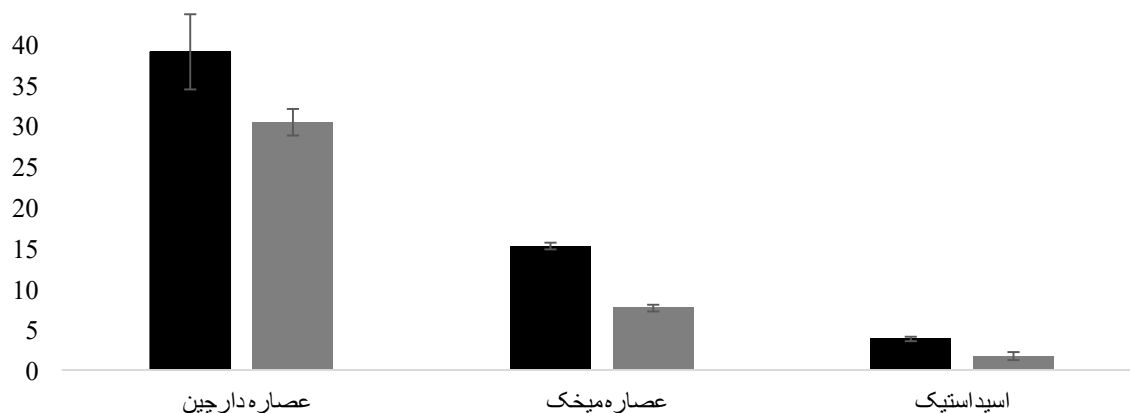
جدول ۳. نتایج آزمون میکروبی MIC

MIC		
شیگلا فلکسنری	سالمونلا انتریتیدیس	تیمار
$30/42 \pm 1/62$ Ca	$39/06 \pm 4/62$ Cb	عصاره دارچین
$7/61 \pm 0/41$ Ba	$15/21 \pm 0/41$ Bb	عصاره میخک
$1/71 \pm 0/49$ Aa	$3/82 \pm 0/27$ Ab	اسید استیک

حروف بزرگ لاتین به معنی اختلاف معنی دار در هر ستون است.
حروف کوچک لاتین به معنی اختلاف معنی دار در هر سطر است.

عصاره میخک و عصاره دارچین بود. به علاوه نتایج حاکی از آن بود که شیگلا فلکسنری نسبت به سالمونلا انتریتیدیس حساسیت بیشتری به عصاره دارچین، عصاره میخک و اسید استیک داشته است (نمودار ۱).

بر اساس نتایج مقاومت سالمونلا انتریتیدیس نسبت به اسید استیک کمتر بود و بعد آن به عصاره میخک و دارچین حساسیت داشت. همچنین در مورد شیگلا فلکسنری نیز بیشترین میزان حساسیت به ترتیب مربوط به اسید استیک،



شیگلافلکسنری ■ سالمونلا انتریتیدیس ■
 نمودار ۱. میزان MIC برای باکتریهای مورد مطالعه .

نتایج آزمون میکروبی سالمونلا انتریتیدیس

نتایج آزمون‌ها در جدول ۴ آورده شده است.

جدول ۴. نتایج آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد میکروبی سالمونلا انتریتیدیس

تیمار	MIC		اسید استیک %	دارچین %	میخک %
	Mean	SD			
۱	۱۵/۲۱	۰/۴۱	۰	۰	۱۰۰
۲	۲۷/۳۴	۱/۸۱	۰	۲۰	۸۰
۳	۳۰/۴۴	۱/۶	۰	۴۰	۶۰
۴	۷/۷۳	۰/۱۵	۲۰	۲۰	۶۰
۵	۷/۸۶	۰/۰۹	۲۰	۴۰	۴۰
۶	۷/۹۸	۰/۳۴	۰	۵۰	۵۰
۷	۳۹/۰۶	۴/۶۲	۰	۱۰۰	۰
۸	۱۹/۵۳	۱/۷۸	۰	۸۰	۲۰
۹	۱۵/۲۱	۰/۸۱	۰	۶۰	۴۰
۱۰	۱۱/۷۱	۱/۹	۲۰	۶۰	۲۰
۱۱	۳/۸۲	۰/۱۵	۱۰۰	۰	۰

۲/۴۳	۰/۲۷	۸۰	۲۰	۰	۱۲
۱/۱۹	۰/۰۷	۸۰	۰	۲۰	۱۳
۴/۰۵	۰/۱۷	۶۰	۲۰	۲۰	۱۴
۳/۹	۰/۲۴	۶۰	۴۰	۰	۱۵
۳/۷۵	۰/۱۷	۶۰	۰	۴۰	۱۶
۵/۴۵	۰/۱۲	۵۰	۰	۵۰	۱۷
۵/۶۲	۰/۱۱	۵۰	۵۰	۰	۱۸

نتایج آزمون میکروبی شیگلا فلکسنری

نتایج آزمونها در جدول ۵ آورده شده است.

جدول ۵ نتایج آزمون حداقل غلظت ممانعت از رشد میکروبی شیگلا فلکسنری

Mean	MIC SD	اسید استیک. %	دارچین. %	میخک. %	تیمار
۷/۶۱	۰/۴۱	۰	۰	۱۰۰	۱
۱۱/۵۱	۳/۷۱	۰	۲۰	۸۰	۲
۳۰/۴۲	۱/۶۲	۰	۴۰	۶۰	۳
۷/۶۱	۰/۲۱	۲۰	۲۰	۶۰	۴
۷/۹۱	۰/۱۹	۲۰	۴۰	۴۰	۵
۱۶/۳۱	۰/۷۹	۰	۵۰	۵۰	۶
۳۰/۴۲	۱/۶۲	۰	۱۰۰	۰	۷
۲۶/۵۳	۷/۴۳	۰	۸۰	۲۰	۸
۱۹/۸۷	۷/۶۱	۰	۶۰	۴۰	۹
۷/۹۸	۰/۳۴	۲۰	۶۰	۲۰	۱۰
۱/۷۱	۰/۴۹	۱۰۰	۰	۰	۱۱
۳/۳	۰/۳۷	۸۰	۲۰	۰	۱۲

۱/۹۹	۰/۰۸	۸۰	۰	۲۰	۱۳
۳/۸۲	۰/۱۵	۶۰	۲۰	۲۰	۱۴
۲/۴۳	۰/۲۷	۶۰	۴۰	۰	۱۵
۱/۹۷	۰/۰۵	۶۰	۰	۴۰	۱۶
۱/۹۱	۰/۰۷	۵۰	۰	۵۰	۱۷
۲/۳۶	۰/۳۲	۵۰	۵۰	۰	۱۸

تعیین برهمکنش ضد میکروبی

نتایج برهمکنش ضد میکروبی سالمونلا انتریتیدیس

صورت افزایشی بوده است بجز تیمار شماره ۱۰ که آنتاگونیست بوده است.

نتایج آنالیز داده‌ها برای تعیین برهمکنش ضد میکروبی باکتری سالمونلا انتریتیدیس در جدول ۶ نشان داده شده است که در همه موارد تیمارها برهمکنش ضد میکروبی به

جدول ۶ نتایج برهمکنش ضد میکروبی سالمونلا انتریتیدیس

تیمار	میخک FIC	دارچین FIC	اسید FIC	FICindex	برهمکنش ضد میکروبی
۱	۱/۷۹	۰/۶۹	-	۲/۴۸	افزایشی
۲	۲	۰/۷۷	-	۲/۷۷	افزایشی
۳	۰/۵	۰/۱۹	۲/۰۲	۲/۷۱	افزایشی
۴	۰/۵۱	۰/۲	۲/۰۵	۲/۷۶	افزایشی
۵	۰/۵۲	۰/۲	-	۰/۷۲	افزایشی
۶	۱/۲۸	۰/۵	-	۱/۷۸	افزایشی

۷	۱	۰/۳۸	-	۱/۸۳	افزایشی
۸	۰/۷۶	۰/۲۹	۳/۰۶	۴/۱۱	آنتاگوتیست
۹	-	۰/۰۶	۰/۶۳	۰/۶۹	افزایشی
۱۰	۰/۰۷	-	۰/۳۱	۰/۳۸	افزایشی
۱۱	۰/۲۶	۰/۱	۱/۰۶	۱/۴۲	افزایشی
۱۲	-	۰/۰۹	۱/۰۲	۱/۱۱	افزایشی
۱۳	۰/۲۴	-	۰/۹۸	۱/۲۲	افزایشی
۱۴	۰/۳۵	-	۱/۴۲	۱/۷۱	افزایشی
۱۵	-	۰/۱۴	۱/۴۷	۱/۶۱	افزایشی

نتایج برهمکنش ضد میکروبی شیگلا فلکسنری

۱۰ برهمکنش ضد میکروبی به صورت آنتاگونیست بوده است و در سایر تیمارها به صورت افزایشی بوده است.

نتایج آنالیز داده‌ها برای تعیین برهمکنش ضد میکروبی باکتری شیگلا فلکسنری در جدول ۷ نشان داده شده است و حاکی از آن بوده است که در تیمارهای شماره ۳، ۴، ۵، ۸ و

جدول ۷ نتایج برهمکنش ضد میکروبی باکتری شیگلا فلکسنری

تیمار	میخک FIC	دارچین FIC	اسید FIC	FICindex	برهمکنش ضد میکروبی
۱	۱/۵۱	۰/۳۷	-	۱/۸۸	افزایشی
۲	۳/۹۹	۱	-	۴/۹۹	آنتاگوتیست
۳	۱	۰/۲۵	۴/۴۵	۵/۷	آنتاگوتیست
۴	۱/۰۳	۰/۲۶	۴/۶۲	۵/۹۱	آنتاگوتیست
۵	۲/۲۴	۰/۵۳	-	۲/۶۷	افزایشی
۶	۳/۴۸	۰/۸۷	-	۴/۳۵	آنتاگوتیست
۷	۲/۶۱	۰/۶۵	-	۳/۲۶	افزایشی
۸	۱/۰۴	۰/۲۶	۴/۶۶	۵/۹۶	آنتاگوتیست

۹	-	۰/۱	۱/۹۲	۲/۰۲	افزایشی
۱۰	۰/۲۶	-	۱/۱۶	۱/۴۲	افزایشی
۱۱	۰/۵	۰/۱۲	۲/۲۳	۲/۸۵	افزایشی
۱۲	-	۰/۰۸	۱/۴۲	۱/۵	افزایشی
۱۳	۰/۲۵	-	۱/۱۵	۱/۴	افزایشی
۱۴	۰/۲۵	-	۱/۱۱	۱/۳۶	افزایشی
۱۵	-	۰/۰۷	۱/۳۸	۱/۴۵	افزایشی

بحث

توامان و تکی عصاره آبی میخک و دارچین در مجاورت اسید استیک که یک اسید آلی می باشد ارزیابی شده است. در تحقیق حاضر عصاره دارچین در غلظت ۳۹/۰۶ میلی گرم در میلی لیتر و ۳۰/۴۲ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار رشد *سالمونلا انتریتیدیس* و *شیگلا فلکسنری* شد. قبلا نیز تحقیقات نشان داده شد که دارچین دارای خصوصیات ضد میکروبی است. در تحقیق اجاق و همکاران در سال ۱۳۹۱ اثر ضد باکتریایی اسانس پوست دارچین در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد و مشخص شد که حداقل غلظت بازداری اسانس دارچین در مقابل باکتری های گرم منفی ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده است (۳۱). در تحقیق عبدالله زاده و همکاران در سال ۱۳۹۶، فعالیت ضد باکتریایی اسانس دارچین علیه *لیستریا مونوسیتوزنز* مطالعه شد که نتایج اثر ضد میکروبی آن را نشان داد (۳۲). خصوصیات ضد میکروبی اسانس و عصاره دارچین در پژوهش های متعددی بررسی شد و در همه موارد نتایج همراستا با نتایج تحقیق حاضر بوده است (۳۳). عصاره میخک در غلظت ۱۵/۲۱ میلی گرم در میلی لیتر و ۷/۶۲ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار

افزایش نگرانی مردم و مراجع بهداشتی از نگهدارنده های شیمیایی باعث شد تا صنعت غذا به دنبال جایگزین های طبیعی آن برود. استفاده از اسانس و عصاره گیاهی در غذا ایراداتی دارد که مهمترین آن احتمال واکنش با ترکیبات اصلی موجود در غذا اعم از اسید، نمک، چربی و پروتئین مواد غذایی می باشد (۱). با توجه به این مهم که باکتری هایی اعم از *سالمونلا انتریتیدیس* و *شیگلا فلکسنری* از عمده باکتری های سمومیتزا در مواد غذایی بوده و می توانند اثرات جبران ناپذیری را در فرد درگیر ایجاد کند، این پژوهش در راستای حذف و کاهش فعالیت این دو باکتری در صنعت مواد غذایی کوشیده است. از بین گیاهان دارویی مختلف دارچین و میخک را به علت دارا بودن محتوای ضد میکروبی گوناگون مورد بررسی قرار گرفتند. دارچین دارای مواد ضد میکروب متعددی است که از آن جمله می توان به آلدئید سینامیک، فنل ها، مخصوصا اوژنول همراه با فلاندرن، سافرول و به مقدار کمتر فورفورول اشاره کرد (۱۶ و ۲۶). میخک نیز ترکیباتی دارد که مسئول خصوصیت ضد میکروبی هستند مانند اوژنول، اوژنول استات و هپتاکوزان (۱۶). در این تحقیق استفاده

داشتند. بنابر نتایج این پژوهش می توان بهترین نوع ترکیب را با حداکثر کارایی با توجه به ماهیت ماده غذایی در نظر گرفت. در مجموع با استناد به نتایج به دست آمده از این تحقیق می توان در آینده خصوصیات ضد میکروبی و برهم کنش ضد میکروبی سایر اسیدهای آلی و خصوصیات ضد میکروبی و برهم کنش ضد میکروبی ترکیبات ضد میکروب طبیعی بر سایر میکروب های مهم در صنعت غذا و خصوصیات ضد میکروبی و برهم کنش ضد میکروبی ترکیبات طبیعی با نکه- دارنده های شیمیایی را مورد مطالعه قرار داد تا بتوان بهترین روش ها و ماده های موثر در کاهش بار میکروبی غذا را بدست آورد.

Reference

1. Pradhan S, Huidrom P. Antimicrobial properties and phytochemical analysis of some medicinal plants: A review. *Inter J Sci Res.* 2024;13(1):508-11.
2. Lee KM, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control.* 2015;47:264-76.
3. Johnson R, Mylona E, Frankel G. Typhoidal Salmonella: Distinctive virulence factors and pathogenesis. *Cellular Microbiol.* 2018;20(9):e12939.
4. Kenney LJ. The role of acid stress in Salmonella pathogenesis. *Curr Opin Microbiol.* 2019;47:45-51.
5. Lampel KA, Formal SB, Maurelli AT. A brief history of Shigella. *EcoSal Plus.* 2018;8(1):14-7.
6. Schnupf P, Sansonetti PJ. Shigella pathogenesis: New insights through advanced methodologies. *Microbiol Spectrum.* 2019;7(2):7-2.
7. Maggini V, Semenzato G, Gallo E, Nunziata A, Fani R, Firenzuoli F. Antimicrobial activity of Syzygium aromaticum essential oil in human health treatment. *Molecules.* 2024;29(5):999.

رشد *سالمونلا انتریتیدیس* و *شیگلا فلکسنری* شد. در همین راستا نتایج تحقیق Hu و همکاران حاکی از آن بود که خصوصیات ضد میکروبی اسانس میخک را نشان داد و می توان به عنوان ماده ضد میکروب در غذا استفاده کرد که به وسیله آن عمر ماندگاری محصول را افزایش داد (۲۷). مشابه همین ادعا در تحقیق دیگری نیز ذکر شد. در این تحقیق اسانس میخک بر علیه باکتری های گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفت و مشخص شد که تقریباً تمامی باکتری های مورد مطالعه به اسانس میخک حساس هستند (۲۸). اسید استیک در غلظت ۳/۸۲ میلی گرم در میلی لیتر و ۱/۷۱ میلی گرم در میلی لیتر به ترتیب باعث مهار رشد *سالمونلا انتریتیدیس* و *شیگلا فلکسنری* شد. در مطالعه ای مشخص شده بود که باکتری های *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شیگلا دیزانتریه* و *سالمونلا تیفی* به اسانس گیاهان دارویی حساس هستند ولی استفاده از اسید استیک باعث تقویت اثرات ضد میکروبی اسانس شده بود (۲۲). نتایج به دست آمده از این تحقیق نشان داد که عصاره دارچین، عصاره میخک و اسید استیک بر روی باکتری های *سالمونلا انتریتیدیس* و *شیگلا فلکسنری* اثر ضد میکروبی دارند که این خصوصیت ضد میکروبی به ترتیب برای اسید استیک، عصاره میخک و عصاره دارچین بوده است. همچنین مشخص شد که استفاده توأمان از این سه ماده ضد میکروب همیشه باعث افزایش قدرت ضد میکروبی نشده و در برخی موارد اثرات افزایشی و در برخی دیگر اثرات آنتاگونیستی داشته است. برای مثال در تیمار شماره ۱۰ (۲۰٪ عصاره میخک، ۶۰٪ عصاره دارچین و ۲۰٪ اسید استیک) برای *سالمونلا انتریتیدیس* حالت آنتاگونیستی داشت و تیمارهای شماره ۳ (۶۰٪ عصاره میخک و ۴۰٪ عصاره دارچین)، تیمار شماره ۴ (۶۰٪ عصاره میخک، ۲۰٪ عصاره دارچین و ۲۰٪ اسید استیک)، تیمار شماره ۵ (۴۰٪ عصاره میخک، ۴۰٪ عصاره دارچین و ۲۰٪ اسید استیک)، تیمار شماره ۸ (۲۰٪ عصاره میخک و ۸۰٪ عصاره دارچین) و تیمار شماره ۱۰ (۲٪ عصاره میخک و ۶۰٪ عصاره دارچین و ۲۰٪ اسید استیک) برای *شیگلا فلکسنری* حالت آنتاگونیستی

16. Kaur M, Sharma S, Kalia A, Sandhu N. Essential oils and their blends: mechanism of antibacterial activity and antibiofilm potential on food-grade maize starch packaging films. *Inter Microbiol.* 2024;1-18.
17. Lang M, Montjarret A, Duteil E, Bedoux G. *Cinnamomum cassia* and *Syzygium aromaticum* essential oils reduce the colonization of *Salmonella Typhimurium* in an in vivo infection model using *Caenorhabditis elegans*. *Molecules.* 2021;26(18):5598.
18. Banik A, Abony M, Zerín T, Datta S. Antibacterial activity of *Allium sativum*, *Syzygium aromaticum*, and *Cinnamomum zeylanicum* against food borne pathogens in vitro. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 2018;13:68-73.
19. Wang B, Shao Y, Chen F. Overview on mechanisms of acetic acid resistance in acetic acid bacteria. *World J Microbiol Biotechnol.* 2015;31(2):255-63.
20. Gomes RJ, de Fatima Borges M, de Freitas Rosa M, Castro-Gómez RJH, Spinosa WA. Acetic acid bacteria in the food industry: systematics, characteristics and applications. *Food Technol Biotech.* 2018;56(2):139-41.
21. Matsushita K, Toyama H, Tonouchi N, Okamoto-Kainuma A. Acetic acid bacteria. *Ecol Physiol.* 2016;22-5.
22. Hashemi SMB, Jafarpour D, Gholamhosseinpour A. Antimicrobial activity of *Carum copticum* and *Satureja khuzestanica* essential oils and acetic acid in vapor phase at different relative humidities and temperatures in peanuts. *J Food Processing Preserv.* 2022;46(2):e16269.
23. In YW, Kim JJ, Kim HJ, Oh SW. Antimicrobial activities of acetic acid, citric acid and lactic acid against *Shigella* species. *J Food Safety.* 2013;33(1):79-85.
24. Olaimat AN, Al-Holy MA, Abu Ghoush MH, Al-Nabulsi AA, Qatatsheh AA, Shahbaz HM, Holley RA. The use of malic and acetic acids in washing solution to control *Salmonella* spp. on chicken breast. *J Food Sci.* 2018;83(8):2197-2203.
8. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF, Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol.* 2017;43(6):668-83.
9. Mounika AMA, Sushma MSM, Sidde LSL, Malathi SMS, Rajani KRK. In vitro evaluation of antimicrobial activity of clove buds (*Eugenia aromatica*). *Inter J Indigenous Herbs Drugs.* 2020;25-33.
10. Radünz M, da Trindade MLM, Camargo TM, Radünz AL, Borges CD, Gandra EA, Helbig E. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chem.* 2019;276:180-6.
11. Matan N, Rimkeeree H, Mawson AJ, Chompreeda P, Haruthaithanasan V, Parker M. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. *Int J Food Microbiol.* 2006;107(2):180-5.
12. Tsai HC, Sheng L, Zhu MJ. Antimicrobial efficacy of cinnamon oil against *Salmonella* in almond-based matrices. *Food Control.* 2017;80:170-5.
13. Al Bayati MHM, Cengiz MF, Kitiş YE, Çınar O. Comparison of antimicrobial activities of oregano, lavender, sage, anise and clove extracts obtained by supercritical fluid carbon dioxide extraction and essential oils obtained by hydrodistillation. *J Essen Oil Res.* 2024;1-13.
14. Burin RCK, Silva JA, Nero LA. Influence of lactic acid and acetic acid on *Salmonella* spp. growth and expression of acid tolerance-related genes. *Food Res Inter.* 2014;64:726-32.
15. Iseppi R, Truzzi E, Sabia C, Messi P. Efficacy and synergistic potential of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) and clove (*Syzygium aromaticum* L. Merr. & Perry) essential oils to control food-borne pathogens in fresh-cut fruits. *Antibiotics.* 2024;13(4):319.

27. Hu Q, Zhou M, Wei S. Progress on the antimicrobial activity research of clove oil and eugenol in the food antiseptic field. *J Food Sci.* 2018;83(6):1476-83.
28. Kammon A, Almaeyoufi A, Asheg A. In vitro antimicrobial activity of clove oil against gram-negative bacteria isolated from chickens. *Appro Poult Dairy & Vet Sci.* 2018;6(2):33-5.
29. زرین کمر ف. بررسی آناتومی تیره میخک (Caryophyllaceae) در ارسباران، شمال غرب ایران. *مجله گیاهشناسی ایران.* ۱۳۸۰؛ ۹(۱):۹۳-۱۰۲.
۳۰. محمدی فر ش. خاستگاه، تاریخچه و مسیر تجارت دارچین. *تاریخ علم.* ۱۳۹۰؛ ۹(۹):۳۷-۵۱.
۳۱. اجاق س، رضایی م، رضوی س، حسینی س. مطالعه اثر ضد باکتریایی اسانس پوست دارچین (Cinnamomum zeylanicum) در شرایط آزمایشگاهی در برابر پنج باکتری عامل فساد غذایی. *علوم و صنایع غذایی ایران.* ۱۳۹۱؛ ۹(۳۵):۶۷-۷۶.
۳۲. عبدالله زاده ا، اجاق س، حسینی ه، قائمی ع، ایراجیان غ. ارزیابی کمی و کیفی فعالیت ضدباکتریایی اسانس دارچین و نانوذرات اکسید روی علیه لیستریا مونوسیتوژنز. *علوم و فنون شیلات.* ۱۳۹۶؛ ۷(۱):۴۹-۵۵.
۳۳. شفق اصل س، نوری زاده ع، قاسمی گرمی ک، مالوفی ن. مقایسه تاثیر عصاره های آبی و الکلی دارچین و زردچوبه بر رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط آزمایشگاهی. *دانشگاه علوم پزشکی سبزوار.* ۱۳۸۴؛ ۱۲(۳):۱۷-۲۱.
۳۴. مشاک ز، مرادی ب، مرادی ب. اثر ترکیبی اسانس دارچین و آویشن شیرازی بر رشد *Bacillus cereus* در یک مدل غذایی. *گیاهان دارویی.* ۱۳۹۱؛ ۱۱(۴۲):۶۲-۷۳.
۳۵. نوشیروانی ن، قنبرزاده ب، رضایی مکرم ر، هاشمی م. خواص ضد میکروبی، ضد اکسایشی و فیزیکی فیلم های بر پایه کیتوزان-کربوکسی متیل سلولز-اسید اولئیک حاوی اسانس دارچین. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران.* ۱۳۹۷؛ ۱۳(۱):۵۲-۴۱.
۳۶. بندیان ل، مقدم م، بحرینی م. بررسی اثر ضدباکتریایی و خاصیت سینرژیستی عصاره اتانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، مریم گلی بنفش (*Froriepia subpinnata*) و اناریجه (*Salvia verticillata*) بر باکتری های عامل پوسیدگی سبزیجات. *میکروبیولوژی مواد غذایی.* ۱۴۰۰؛ ۸(۱):۴۵-۵۷.
۳۷. بصیری اصفهانی ش، بیدی ب، اسدی م، رحیمی نژادرنجبر م. بررسی آرایه شناسی جنس *Acanthophyllum* از تیره میخک در ایران. *مجله گیاهشناسی ایران.* ۱۳۹۰؛ ۱۷(۱):۲۴-۳۹.

راهکاری نوین برای صرفه‌جویی در آب و افزایش تولید برنج: مهندسی ژنتیک با ژن‌های *OsNAC5* و *EPSPS*

سید محمد موسوی پاکزاد^۱، الهه معتمد^۱، نسرین سلطانی^۱، محدثه محسن‌پور^۲، علی اکبر عبادی^۳ و مطهره محسن‌پور^{۱*}

۱. بخش مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران_شمال، تهران، ایران

۳. موسسه تحقیقات برنج کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رشت، ایران

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از روش‌های علمی برای حل مشکلات مرتبط با علف‌های هرز در کشت برنج می‌تواند روش‌های زراعی را متحول کند، به طوری که نیاز به غرقابی و سیستم‌های کرت‌بندی حذف شود و هزینه‌های تولید به طور قابل توجهی کاهش یابد. این مطالعه بر استفاده از فناوری‌های پیشرفته تمرکز دارد که با ترکیب ژن‌های تحمل به علف‌کش و ژن‌هایی که تحمل به خشکی یا افزایش عملکرد را فراهم می‌کنند، انجام می‌شود.

مواد و روش‌ها: برای دستیابی به این هدف، یک سازه ژنی چندگانه طراحی شد که ژن تحمل به علف‌کش را در کنار ژن *OsNAC5*، مرتبط با تحمل به خشکی، بهبود عملکرد و تغییر ساختار ریشه، در بر داشت. توالی کدکننده ژن *OsNAC5* بهینه‌سازی کدونی شده و تحت کنترل پیش‌بر *RCc3* و پایان‌بر *17hsp* قرار گرفت و همراه با کاست ژنی *EPSPS* در ناحیه T-DNA یک وکتور مبتنی بر *Agrobacterium* همسانه‌سازی شد. سازه ژنی حاصل با استفاده از *Agrobacterium tumefaciens* به برنج منتقل شد و مراحل انتخاب و باززایی به‌طور مستمر انجام گرفت.

یافته‌ها: آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از آغازگرهای مختص ژن و سازه، حضور تراژن‌ها را در گیاهان باززایی‌شده در محیط انتخابی تأیید کرد. از این فرآیند، شش رخداد مستقل از انتقال سازه نو ترکیب موسوم به *pUHERN5* به دست آمد. این رخدادها با استفاده از واکنش PCR معکوس برای تفکیک رخداد‌های مستقل و تعیین محل الحاق تراژن در گیاهان مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: توسعه برنج با قابلیت مصرف کمتر آب گامی مهم در جهت مواجهه با محدودیت‌های اقلیمی و منابع کشور است و نقشی کلیدی در حفظ امنیت غذایی و دستیابی به خودکفایی دارد. استفاده از این فناوری‌ها می‌تواند به پایداری تولید برنج در ایران کمک کرده و آن را در برابر چالش‌های محیطی مقاوم‌تر سازد.

واژه‌های کلیدی: مهندسی ژنتیک برنج، *OsNAC5*، *EPSPS*، انتقال ترکیبی ژن‌ها، کاهش مصرف آب

A Novel Approach for Water Conservation and Yield Enhancement in Rice: Genetic Engineering with *OsNAC5* and *EPSPS* Genes

Seyyed Mohammad Mousavi pakzad¹, Elahe Moatamed¹, Nasrin Soltani¹, Mohaddeseh Mohsenpour², Aliakbar Ebadi³, Motahhreh Mohsenpour^{1*}

1. Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

2. Department of Microbiology, Faculty of Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

3. Rice Research Institute of Iran (RRII), Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO) Rasht, Iran

Abstract

Introduction: Utilizing scientific approaches to address weed-related challenges in rice cultivation could revolutionize farming methods, eliminating the need for flooded fields and plot-based systems while significantly reducing production costs. This study focuses on leveraging advanced technologies by combining herbicide tolerance genes with genes conferring drought tolerance or yield improvement.

Methods: To achieve this, a multigenic construct was designed, incorporating a herbicide tolerance gene alongside *OsNAC5*, a gene associated with drought tolerance, improved yield, and root architecture modification. The coding sequence of *OsNAC5* was codon-optimized and placed under the control of the RCc3 promoter and tahsp17 terminator, alongside an *EPSPS* gene cassette within the T-DNA region of an *Agrobacterium*-based vector. The resulting genetic construct was introduced into rice using *Agrobacterium tumefaciens*, followed by continuous selection and regeneration processes.

Results: Polymerase chain reaction (PCR) analysis using gene- and construct-specific primers confirmed the presence of transgenes in regenerated plants grown on selective media. Six independent transformation events of the recombinant construct, recombinant pUHERN5, were obtained. These events were further characterized by inverse PCR to distinguish individual events and identify transgene insertion sites.

Conclusion: The development of these transgenic rice lines represents a significant step toward addressing the country's climatic and resource constraints, supporting food security and self-sufficiency. The adoption of such technologies could contribute to the sustainability of rice production in Iran, ensuring resilience against environmental challenges.

Keywords: Rice Genetic Engineering, *EPSPS*, *OsNAC5*, Combined Gene Transfer, Reduced Water Use

مقدمه

عصر مهندسی ژنتیک به مفهوم عصر استفاده از روش‌های زیست‌شناسی مولکولی برای بهبود صفات و ویژگی‌های موجوداتی است که در کشاورزی، پزشکی و محیط زیست استفاده می‌شوند. استفاده بهینه از آب در کشور ایران که از نظر اقلیمی دارای وضعیت خشک تا نیمه خشک است از اهمیت ویژه‌ای در گسترش و توسعه فعالیت‌های کشاورزی برخوردار است. مبارزه با علف هرز در مزارع برنج هزینه‌برترین بخش تولید این محصول استراتژیک است. در حال حاضر برای مبارزه با علف هرز اقدامات پرهزینه‌ای انجام می‌شود، مانند لایروبی انهار (برای تقلیل جمعیت بذر علف هرز باقی مانده از سال قبل)، کرت بندی (برای نگهداشتن آب)، غرقاب کردن زمین، تهیه نشا و نشاکاری (لازمه کشت غرقابی است)، استفاده از علف‌کش اختصاصی، و جین دست. طغیان علف هرز می‌تواند موجب خسارت جبران ناپذیری به زراعت برنج شود. این خسارت ممکن است تا ۸۰٪ هم برسد. بنابراین چنانچه بتوان معضل علف‌هرز را به نحو مطلوبی حل کرد می‌توان تحولی در روش کشت برنج ایجاد کرد که نیازمند غرقابی و کرت‌بندی مزارع برنج نباشد. با توجه به معضل خشکی در کشور و محدودیت آب از یک طرف و تولید برنج با سیستم زراعی متداول در ایران (غرقابی) که نیازمند آب فراوانی است از طرف دیگر، ایجاد واریته‌های متحمل به خشکی برای نیل به خودکفایی در این محصول ضروری است. کشت مستقیم برنج راه خوبی برای

صرفه‌جویی در مصرف آب است. مهمترین چالش در این سیستم کشت، کنترل علف‌های هرز است. روش‌های سنتی کنترل علف‌های هرز در برنج شامل وجین دستی است، اما به دلیل کمبود نیروی کار در زمان بحرانی وجین و افزایش هزینه‌های نیروی کار، این روش با مشکلاتی همراه است و در سطح زیاد جوابگو نیست. علف‌کش‌ها نقش کلیدی در کنترل علف‌های هرز دارند و امروزه به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱).

برنج از جنبه فیزیولوژیک نیاز چندانی به آب ندارد. دو دلیل اصلی برای تولید غرقابی برنج عنوان شده است. دلیل اول کنترل علف هرز از طریق غرقابی و کشت نشایی است (۴-۲) و دلیل دوم خنثی کردن pH خاک است (۴). در واقع چنانچه برنج این دو مشکل را نداشته باشد کشت غیر غرقابی آن هم از جنبه کیفی (عطر و طعم) و هم از جنبه کمی تولید برتری خواهد داشت. ایجاد ارقام مهندسی شده متحمل به علف‌کش گلیفوسیت با انتقال ژن *EPSPS* که در مقایسه با علف‌کش‌های رایج، ایمن و کاراست قدم اول در کاهش مصرف آب در کشت برنج خواهد بود. دربرنج ۱۴۰ ژن *NAC* (NAM-ATAF-CUC) ردیابی شده است و تحقیقات نشان داده‌اند که ۱۸ مورد آنها در شرایط استرس القاء می‌شوند. گزارش‌ها نشان می‌دهد بیان در سطح زیاد *OsNAC ۵* قطر ریشه برنج را افزایش داده و منجر به تحمل خشکی و افزایش عملکرد دانه در مزرعه می‌شود (۵). بیان بالای تنظیم‌کننده رونویسی *OsNAC ۹* و *OsNAC ۵* قطر بافت آثرانشیم و استل ریشه در رقم *Nipponbare* را افزایش داده و ریشه‌های سبک و قطورتری تولید می‌کند. میزان محصول نهایی در این گیاهان در شرایط تنش خشکی بین ۲۰ تا ۷۰٪ در مقایسه با شاهد افزایش نشان داده است (۷و۶). همچنین بیش بیان ژن *OsNAC ۵*، تحمل به خشکی، شوری و دمای پایین در گیاهان تراریخته را افزایش می‌دهد (۸). تاکاساکی و همکاران گزارشی با بیش بیان *OsNAC ۵* که یک عامل رونویسی است، عملکرد این ژن را در تحمل به خشکی هم با روش خاموشی ژن توسط آران‌ای مداخله‌گر (RNAi) و هم با استفاده از بیش بیان آن در آرآبیدوپسیس و برنج تراریخته مورد

نویسنده مسئول: استادیار، بخش مهندسی

ژنتیک و ایمنی زیستی پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی کرج، ایران

آدرس الکترونیک:

mthrrm@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

در برنج را بدون ایجاد نقایص در رشد بهبود می‌بخشد (۸ و ۱۰). علاوه بر این بیان *OsNAC5*، با افزایش قطر ریشه برنج، سبب افزایش مقاومت به خشکی و افزایش بازده محصول در مزرعه می‌شود (۶). تاکنون ژن‌های مختلفی برای تغییر ساختار ریشه برنج مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۴-۱۱، ۵). بهبود سیستم ریشه و توانایی جذب آب بالا می‌تواند کلیدی برای توسعه ارقام برنج مناسب برای سیستم‌های کشاورزی مبتنی بر صرفه‌جویی آب باشد. هدف از این تحقیق انتقال ژن‌های *EPSPS* و *OsNAC5* ایجادکننده تحمل به علف‌کش و تحمل به خشکی به منظور صرفه‌جویی در مصرف آب و افزایش عملکرد در کشت برنج است.

میلی‌گرم بر لیتر اسپکتینومایسین و ۱۰۰ میلی‌گرم بر لیتر استرپتومایسین رشد داده شد. اثبات تراریختی پس از استخراج پلاسمید از کلونی‌های حاصل، با استفاده از هضم آنزیمی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام گرفت. کلیه مراحل همسانه‌سازی و آنالیزهای مولکولی با استفاده از دستورالعمل‌های سمبروک و همکاران (۱۹۸۹) انجام شد (۱۶). پلاسمید نوترکیب حاصل پس از تایید، به روش آن و همکاران (۱۹۸۶) به *Agrobacterium* سویه EHA۱۰۵ منتقل شد (۱۷).

مدت یک ساعت درون انکوباتور تاریک ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد تا برای انتقال ژن آماده شود. سپس حدود ۵ میکرولیتر از محلول *Agrobacterium* حاوی پلاسمید روی ریزنمونه‌ها چکانیده شد. ریزنمونه‌ها حدود ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور تاریک تلقیح شدند. پس از انجام هم‌کشتی با *Agrobacterium*، ریزنمونه‌ها به محیط کشت استراحت منتقل شدند و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و نور مداوم به مدت ۵ روز قرار داده شد. پس از رشد کالوس‌ها به اندازه مناسب در محیط استراحت، آنها به محیط کشت انتخابی حاوی هیگرومایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند.

بررسی قرار دادند. بیش بیان *OsNAC5* تحت کنترل پیشبرهای مختص ریشه در گیاه برنج، تحمل به خشکی و شوری را در طول مرحله رشد رویشی بهبود داد و مهم‌تر اینکه بیش بیان این ژن در ریشه به طور معنی‌داری تحمل به خشکی را در مرحله باردهی از طریق رشد ریشه‌های طویل با افزایش عملکرد دانه افزایش داد. ژن *OsNAC5* همراه با ABA نقش مهمی در حرکت دوباره Fe، Zn و آمینواسیدها از برگ به بذرها دارد (۹). بیش بیان *OsNAC5* در گیاهان برنج منجر به انباشت پرولین و قندهای محلول و همچنین مقدار کمتر MDA (Malondialdehyde) و H_2O_2 می‌شود. این تغییرات متابولیکی گیاهان را از کاهش آب و آسیب اکسیداتیو در شرایط تنش محافظت می‌کنند. بنابراین، *OsNAC5* تحمل به تنش

مواد و روش‌ها

ساخت سازه چند ژنی حاوی ژن‌های *EPSPS* و *NRT*

طراحی سازه‌های ژنی با استفاده از نرم افزار Vector NT۱ (Invitrogen) انجام شد. واکنش اتصال ابتدا در حامل همسانه‌سازی تحت پیشبر مختص ریشه RCc۳ در مورد ژن *OsNAC5* بهینه‌سازی شده کدونی (۱۵) انجام و سپس در حامل دوگانه مختص انتقال ژن با واسطه *Agrobacterium* حاوی ژن نشانگر انتخابی مقاومت به هیگرومایسین قرار داده شد. مخلوط اتصال به سلول‌های مستعد تهیه شده از *E. coli* سویه XL۱-Blue منتقل شد و روی محیط انتخابی LB حاوی ۵۰

مواد گیاهی و انتقال ژن

بذور برنج رقم هاشمی (دریافت شده از موسسه تحقیقات برنج رشت) برای انتقال ژن مورد استفاده قرار گرفتند. دو تا سه روز قبل از انجام هم‌کشتی، باکتری بر روی محیط کشت LB همراه با آنتی‌بیوتیک‌های مناسب (۷۵ میلی‌گرم در لیتر ریف‌آمپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین و ۵۰ میلی‌گرم در لیتر اسپکتینومایسین) کشت خطی شد. یک ساعت قبل از انجام هم‌کشتی با *Agrobacterium*، حدود یک لوپ پُر *Agrobacterium* از محیط LB برداشته و درون محیط تلقیح حاوی استوسیرینگون سوسپانسیون شد. چگالی نوری (OD_{600nm}) باکتری روی ۰/۳ تنظیم شد. محلول تلقیح به

منتقل شدند. جزئیات بهینه‌سازی کشت بافت و انتقال ژن و محیط‌های کشت در "دستورالعمل فنی بازرایی بذر رسیده برنج با هدف انتقال ژن توسط آگروباکتریوم" با شماره فروست ۶۴۱۹۵، در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی توسط مجری و همکاران به چاپ رسیده است (۳۴).

تفکیک رخدادهای و تعیین محل الحاق تراژن در ژنوم برنج با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز معکوس بهینه شده در پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی (۱۸) انجام شد. باند حاصل توالی‌یابی شد و تحت آنالیز بیوانفورماتیک برای تعیین دقیق محل الحاق قرار گرفت.

گندم) در ناحیه T-DNA سازه آگروباکتریومی است که این کاست‌های ژنی در خلاف جهت کاست ژنی مقاومت به هیگرومایسین قرار دارند (شکل ۱). سازه چند ژنی حاصل می‌تواند با استفاده از آگروباکتریوم برای تحمل به علف‌کش و بهبود ساختار ریشه و عملکرد در گیاهان به ویژه در تک لپه‌ای‌ها مورد استفاده قرار گیرد.

انتقال گیاهان به یوشیدا مورد استفاده قرار گرفت. انتقال گیاهچه‌های کامل آنها به محلول یوشیدا انجام شد. پس از استقرار گیاهچه‌های باززا شده در محلول یوشیدا به مدت یک ماه، این گیاهان آمادگی انتقال به خاک را پیدا کردند و تحت شرایط کنترل شده در گلخانه تراریخته پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی تا مرحله بذرگیری و انجام آنالیزهای تکمیلی نگهداری شدند.

کالوس‌های مقاوم جنین‌زا در محیط کشت انتخابی به محیط کشت پیش بازرایی منتقل و ۱۵ روز در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کالوس‌های مناسب دارای نقاط سبز رنگ در محیط کشت پیش بازرایی انتخاب و به محیط بازرایی و سپس به ترتیب به محیط یوشیدا و گلدان

آنالیزهای مولکولی

گیاهانی که در کلیه مراحل بازرایی در محیط انتخابی حاوی هیگرومایسین زنده مانده و رشد کردند پس از استخراج دی‌ان‌ای ژنومی با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی مختص ژن، مختص سازه و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG1۰۰) به عنوان ژن کنترل داخلی آنالیز شدند.

یافته‌ها

طراحی و ساخت سازه‌ها

قرار گرفتن کاست ژنی *OsnAC5* (بهینه‌سازی کدونی شده بر اساس نتایج قبلی (۱۹) در کنار کاست ژنی *EPSPS* در ناحیه T-DNA سازه آگروباکتریومی با هضم آنزیمی و PCR تایید شد. سازه نو ترکیب حاصل موسوم به pUHERN5 حاوی ژن *EPSPS* تحت پیش‌سبر بیوبی‌کوئیتین و پایلنبر NOS و *OsnAC5* تحت پیش‌سبر RCc3 و پایلنبر Tahsp17 (از منشأ

انتقال ژن

کالوس‌هایی که به احتمال تراژن‌ها را دریافت کرده بودند در محیط انتخابی حاوی ۵۰ میلی گرم در لیتر هیگرومایسین دوام آورده و شروع به رشد کردند و همچنین کالوس‌هایی که به عنوان شاهد غیرتراریخته در کنار کالوس‌های تراریخته احتمالی قرار گرفتند از بین رفتند. به تدریج روند سبز شدن و بازرایی کالوس‌های جنین‌زا آغاز و تولید گیاهچه کردند و سپس گیاهچه‌های مستقل در محیط ریشه‌زایی، ریشه‌دار شدند. آنتی‌بیوتیک هیگرومایسین در تمامی مراحل تا قبل از

آنالیزهای مولکولی

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز چندگانه مختص ژن و سازه
آنالیز PCR با استفاده از آغازگرهای مختص سازه و ناحیه‌ای از ژنوم برنج (RG100) به عنوان شاهد داخلی برای گیاهان تراریخته احتمالی که در مراحل انتخابی زنده مانده و باززاشده بودند، انجام شد. مشاهده باند حدود ۱۶۰۰ bp که ژن EPSPS را از ناحیه کدکننده پپتید نشانه کلروپلاستی تا پایانبند NOS تکثیر می‌کند، حضور اولیه ژن را در گیاهان تراریخته احتمالی

شناسایی محل الحاق تراژن‌ها در ژنوم برنج رخداد حاصل از سازه سه ژنی

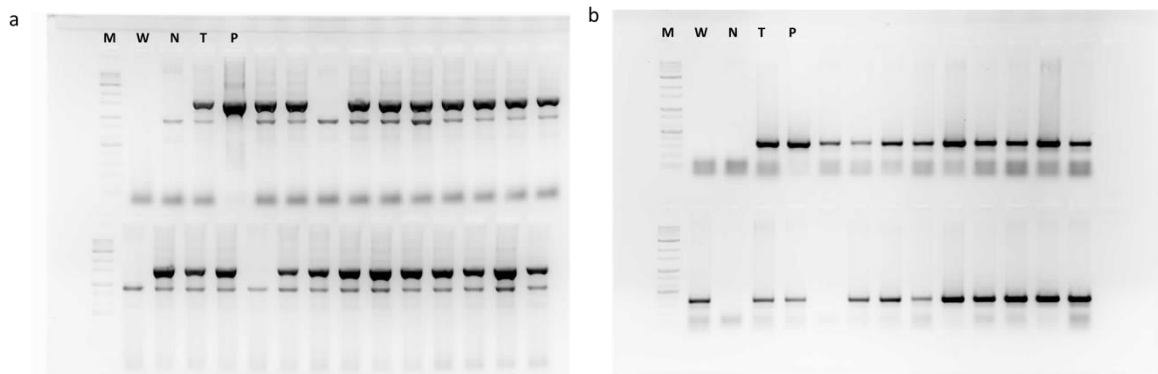
نتایج واکنش PCR معکوس تفکیک رخدادهای مورد بررسی را اثبات کرد (شکل ۱-۳). محل الحاق تراژن در پنج رخداد از شش رخداد حاصل از انتقال سازه pUHERN5 که هر دو ژن EPSPS و OsNAC5 را دریافت کرده بودند تعیین شد. آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داد در کروموزوم‌های شماره ۴،

اثبات کرد (شکل ۱-۲). به منظور طراحی آغازگرهای مناسبی که بتوان با استفاده از آنها بین تراژن و ژن مشابه داخلی تمایز قائل شد، آغازگرهای OsNAC5 پس از هم ردیفی توالی بهینه‌سازی شده کدونی با توالی اولیه طوری طراحی شدند که آغازگر دارای نوکلئوتید متفاوت از نوکلئوتیدهای تشکیل دهنده ژن داخلی در انتهای ۳' باشد (شکل ۲-ب).

۶، ۹ و در دو مورد کروموزوم شماره ۸ محل الحاق ناحیه T-DNA بودند که در سه رخداد در جهت مرز راست (RB) به مرز چپ (LB) و در دو رخداد به صورت مرز چپ به مرز راست الحاق صورت گرفته بود. نمای شماتیک و لوکوس ژنی محل الحاق رخدادها در شکل ۲-ب نشان داده شده است.

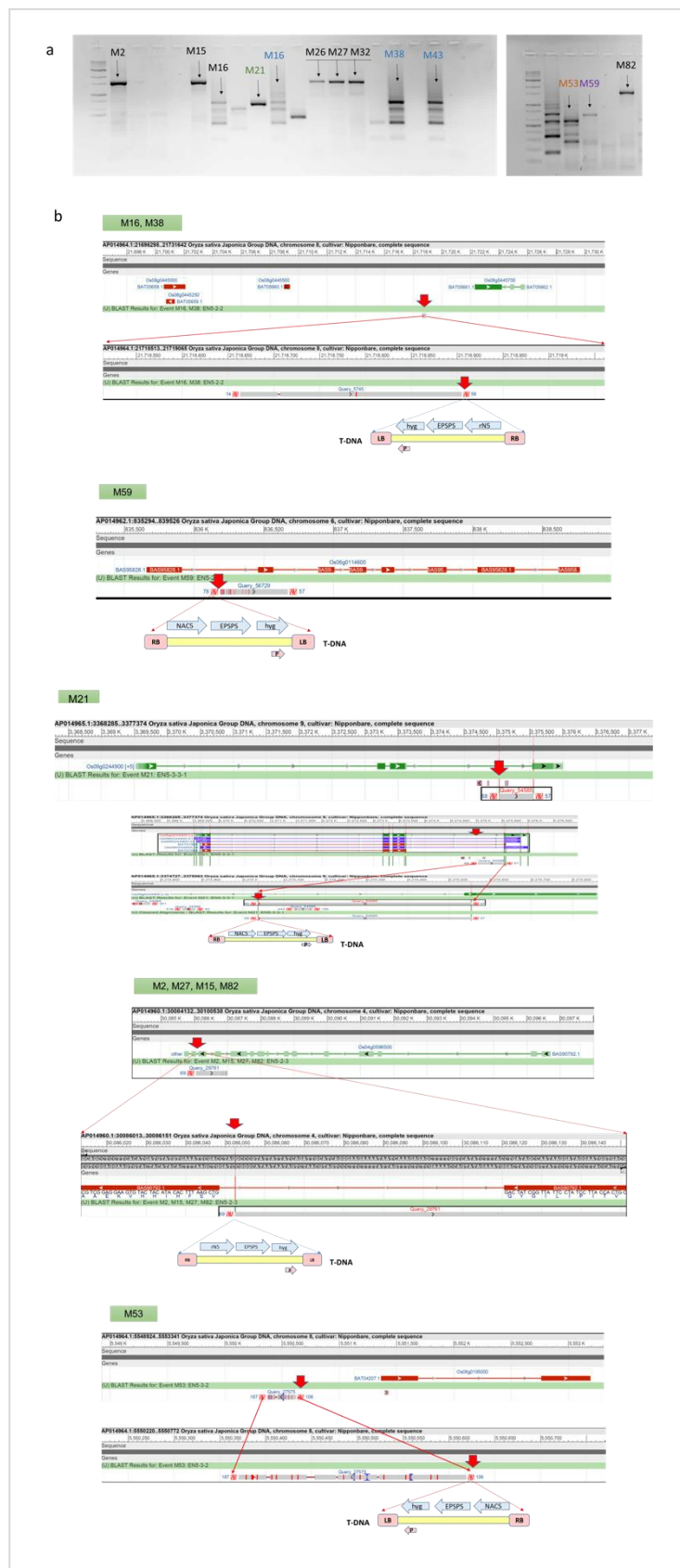


شکل ۱. نمای شماتیک ناحیه T-DNA سازه‌های نو ترکیب pUHERN5 طراحی و ساخته شده در این تحقیق.



شکل ۲. نتایج آنالیز واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مختص سازه برای تعدادی از لاین‌های برنج حاصل از انتقال سازه pUHERN5.

a. نتایج PCR چندگانه با استفاده از آغازگرهای مختص سازه (Gt-F و NOS-R) باند مورد انتظار ۱۶۱۷bp را در لاین‌های برنج تاریخته نشان داد و به صورت همزمان نمونه‌ها باند حدود ۹۵۰bp مربوط به قطعه‌ای از ژنوم برنج (RG1۰۰) را نیز به عنوان کنترل داخلی نشان دادند؛ b. استفاده از آغازگرهای مختص ژن *O5NAC5* باند مورد انتظار ۳۵۷bp را در لاین‌های برنج تاریخته نشان داد.



شکل ۳. نتایج PCR معکوس برای اثبات تفکیک رخدادهای حاصل از انتقال سازه نو ترکیب pUhErN5.

a. تفکیک رخدادهای برنج به روش SUN-iPCR؛ b. تعیین محل الحاق تراژن.

M، نشانگر اندازه وزن ملکولی (۱ Kb Plus-Biofact company)؛ W، کنترل بدون الگو (آب)؛ N، گیاه شاهد غیرتراریخته به عنوان کنترل منفی؛ P، پلاسمید pUhErN5 (کنترل مثبت)؛ T، گیاه تراریخته (حاوی ژن منفرد به دست آمده از طرح) به عنوان کنترل مثبت؛ سایر چاهک‌ها گیاهان نسل T2 حاصل از انتقال سازه نو ترکیب pUhENRT.

جدول ۱. رخدادهای حاصل از سازه نو ترکیب pUhErN5.

محل الحاق T-DNA	کد رخداد	رخداد	سازه	کد تراریختی
	۰۶-E-rN5-۰۱	۱	pUhErN5	M۰۰۴
	۰۶-E-rN5-۰۱	۱	pUhErN5	M۰۰۷
	۰۶-E-rN5-۰۱	۱	pUhErN5	M۰۲۵
	۰۶-E-rN5-۰۱	۱	pUhErN5	M۰۶۰
Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۱۶
	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۲۳
	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۳۳
Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۳۸
Chr.۸: ۲۱۷۱۸۹۰۴	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۴۳
	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۴۴
	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۴۷
	۰۶-E-rN5-۰۲	۲	pUhErN5	M۰۸۶
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲ RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۰۲
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۱۵
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۲۶
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۲۷
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۳۲
Chr.۴: ۳۰۰۸۶۰۵۲ RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۳	۳	pUhErN5	M۰۸۲
Chr.۶: ۸۳۶۱۸۸, RB/LB	۰۶-E-rN5-۰۴	۴	pUhErN5	M۰۵۹
	۰۶-E-rN5-۰۵	۵	pUhErN5	M۰۲۰
Chr۸: ۵۵۵۰۶۱۹LB/RB	۰۶-E-rN5-۰۶	۵	pUhErN5	M۰۵۳
	۰۶-E-rN5-۰۶	۶	pUhErN5	M۰۱۲
Chr۹: ۳۳۷۵۰۳۶	۰۶-E-rN5-۰۶	۶	pUhErN5	M۰۲۱

اثبات شد. الگوی بلندی PCR معکوس نیز تفکیک این دو رخداد را نشان داده بود. این در حالی است که یکسان بودن الگوی بانندی مشابه گیاهان دارای کد تراریختی M۰۱۶، M۰۳۸ و M۰۴۳ که بر اساس اطلاعات مراحل انتقال ژن نیز یک رخداد در نظر گرفته شده بودند دستبندی آنها به عنوان رخداد شماره ۲ را با اطمینان اثبات کرد. نتایج آنالیز

رخدادهای حاصل در جدول ۱ خلاصه شده‌اند و خالص‌سازی آنها در حال انجام است. محل الحاق تراژن‌ها در دو رخداد (رخدادهای شماره ۲ و ۵) حاصل که در کروموزوم شماره ۸ و هر دو در جهت LB به RB الحاق شده بودند، نواحی بین ژنی تعیین شد. محل الحاق این دو رخداد حدود ۱۶ هزار باز با یکدیگر اختلاف داشت و بنابراین مستقل بودن آنها با اطمینان

رخدادهای شماره ۴ و ۶ نیز در ناحیه اینترونی ژن‌هایی در کروموزوم شماره ۶ و ۹ الحاق شده اند. چندین مشاهده الحاق در ناحیه اینترونی و عدم تاثیر آن در رشد و باروری گیاهان حاصل می‌تواند اینطور تفسیر شود که ژن موجود در ژنوم برنج که ناحیه T-DNA در اینترون آن الحاق می‌شود، رونویسی شده و در اسپیلیسینگ پس از حذف اینترون‌ها و از جمله اینترون حاوی T-DNA بتواند mRNA صحیح را تشکیل داده و مشکلی برای ترجمه پیش نیاید. از طرفی الحاق تراژن‌ها در یک ناحیه فعال از نظر رونویسی نیز می‌تواند جالب توجه باشد.

بیوانفورماتیک و الگوی بانندی گیاهان دارای کد تراژیختی M۰۰۲، M۰۱۵، M۰۲۶، M۰۲۷، M۰۳۲ و M۰۸۲ را که حضور تراژن‌ها را در لوکوس یکسانی از کروموزوم شماره ۴ به صورت LB به RB نشان می‌دادند نیز باعث شد علاوه بر اطلاعات انتقال ژن با اطمینان بتوان این گیاهان را به عنوان رخداد شماره ۳ دسته بندی کرد. این لوکوس (۳۰۰۸۶۰۵۲) در اینترون سیزدهم ژنی به نام

Os۰۴t۰۵۹۶۵۰۰۰۰۲: Translation elongation factor EFTu/EF1A , C-terminal domain containing protein

بررسی ایمنی پروتئین حاصل از تراژن NAC5

توالی با یک آلرژن دانه گرده منطبق شد (شکل ۴-b). آنالیز کل توالی نیز شباهت بیش از ۵۰ درصد به آلرژن‌ها نشان نداد. این ژن در تحقیق حاضر تحت پیشبر اختصاصی ریشه منتقل شده است و انتظار بر این است در سایر بافت‌های گیاهی بیان نشود.

توالی پپتیدی OsNAC5 مورد استفاده در این تحقیق با طول ۳۲۹ اسید آمینه در پایگاه AllergenOnline مورد بررسی قرار گرفت. آنالیز ۲۵۰ قطعه ۸۰ اسیدآمینه‌ای در کل توالی این پروتئین شباهت بالای ۳۵٪ با هیچ آلرژنی نشان نداد (شکل ۴-a). ولی آنالیز ۳۲۲ قطعه پپتید ۸ اسیدآمینه‌ای این

a

80mer Sliding Window Search Results

Database	AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)
Input Query	>query mecggalqlppgfrfhptddelvmmylcrkcgglplaapviaevdlykfnpwdlperamg gekewyffsprdrkypngqrpnrnaagtgywkatgatkpvgspravaikkalvfayagkppk gvktnwimheyrladvdrsaarklsksshnlrlddwvlcriynkkgvierydtvdage dvkpaaaaaaakggrigggggaaamkvelsdygfydqepesemlcfdrsgsadrdsmp htdssgsehvlspsspddfpgggdhdyaesqpsggcgwpgvdwaavgdgfvldsslf elpspaafsraagdgaafgdmfty1qkpf
Length	329
Number of 80 mers	250
Number of Sequences with hits	0

No Matches of Greater than 35% Identity Found

AllergenOnline Database v21 (February 14, 2021)

b

>query

number of 8mer = 322

Number of Sequences with at least one 8mer match = 1

▶ GI: **332205751** Hits: **1** -- Def: **pollen allergen Sec c 5 [Secale cereale]**

شکل ۴. نتایج پایگاه AllergenOnline برای بررسی احتمال آلرژی‌زایی پروتئین حاصل از تراژن NAC5.

محصول نیاز به آزمایشات مزرعه‌ای و بررسی دقیق فنوتیپ ریشه در مقایسه با شاهد در آزمایشات تکمیلی و به ویژه بررسی تحمل به خشکی خواهند داشت.

ممکن است منجر به کاهش کیفیت محصول شود. به علاوه این روش‌ها زمان‌بر و پرهزینه هستند. در پی انتقال دو ژن در تحقیق حاضر به رقم تجاری برنج هاشمی که مرغوبیت بالایی از نظر عطر و طعم دارد، انتظار بر این است که گیاهان تراریخته حاصل از نظر بازارپسندی، مانند همتای غیرتراریخته خود باشند. به منظور تایید این مساله، آزمایش‌های اینهمانی و بررسی صفات کیفی پس از خالص‌سازی انجام خواهد شد. همچنین بررسی‌های ایمنی‌زیستی تضمین بهره‌برداری از فواید قطعی بیوتکنولوژی مدرن و مدیریت آثار جانبی احتمالی کاربرد این فناوری را در پی داشته و استفاده از مزایای مهندسی ژنتیک در جهت امنیت غذایی را در پی دارد (۳۳). در این تحقیق دو ژن کاندید موثر در تحمل به علف‌کش و تحمل به خشکی به برنج رقم هاشمی منتقل شد. تاکنون انتقال همزمان این دو ژن گزارش نشده است. چنانچه بتوان معضل علف‌هرز را در مزارع برنج به نحو مطلوبی حل کرد می‌توان تحولی در روش کشت برنج ایجاد کرد که نیازمند غرقابی و کرت‌بندی مزارع برنج نباشد. مهندسی ژنتیک از فناوری‌های ارزشمند برای حل معضل علف‌هرز، بهبود عملکرد، بهبود جذب عناصر غذایی است. امید است پژوهش حاضر گام اولیه موثری جهت تولید گیاهان برنج متحمل به علف‌کش به منظور کاهش مصرف آب در کشاورزی و بهبود عملکرد در کشور باشد.

استفاده از پیشبر مختص ریشه برای جلوگیری از اثرات ناخواسته بیان دائمی ژن *OsNAC5* بر محصول، مطلوب خواهد بود. تایید تحمل به علف‌کش، بهبود صفات ریشه و اثر آنها بر عملکرد

بحث

تولید و استفاده از سازه‌های چندژنی برای ایجاد گیاهان تراریخته در مراحل آزمایشگاهی در گیاهانی چون برنج، توتون، پنبه، گوجه فرنگی، گندم، سویا و جلبک در ایران انجام شده است (۲۰-۲۵). ایرانیان در تولید برنج تراریخته پیشتاز بوده‌اند (۲۶) و (۲۷). همچنین انتقال ژن *DRO1* در کنار ژن‌های *OsNAC5* و *OsEXPA1* (۱۵) و نیز انتقال ژن *PSTOL1* و *OsDRO1* (۲۸) برای بهبود ساختار ریشه، تحمل به خشکی و بهبود جذب عناصر غذایی گیاه برنج و نیز انتقال دو ژن *OsCKX4* و *OsDRO1* (۲۹) در کشور تا مرحله گلخانه‌ای انجام شده است. انتقال همزمان ژن‌های *PSTOL1*، *OsCKX4* و *OsNAC5* نیز به همین منظور گزارش شده است (۳۰). برای بهبود صفات مختلف در گیاهان انتقال همزمان چندین ژن دارای اهمیت است و روش موثری است که می‌تواند اصلاح صفات مورد نظر را تسهیل کرده و زمان رسیدن به هدف مورد نظر برای بهبود صفات گیاهان و اصلاح آنها را کاهش دهد. در گزارش Ye و همکاران (۲۰۰۰)، انتقال همزمان سه ژن دخیل در سنتز ویتامین آ به برنج منجر به افزایش ارزش غذایی آن و تولید این ویتامین در آندوسپرم برنج شد (۳۱). همچنین انتقال همزمان دو ژن دخیل در بهبود فرایند بیوسنتز لیگنین در درختان جنگلی موجب افزایش کارایی این سیستم در درختان شد (۳۲). استفاده از روش‌های اصلاح سنتی در محصولات زراعی، به دلیل انتقال تعداد زیادی از ژن‌های نامطلوب به همراه ژن مورد نظر،

نتیجه گیری

مهندسی ژنتیک، ژن های *EPSPS* و *OsNAC5* به برنج رقم هاشمی منتقل شدند که یک رقم که دارای محبوبیت و متناسب با ذائقه ایرانی و بازارپسند در ایران است. ژن *EPSPS* به گیاه توانایی مقاومت در برابر علف کش گلیفوسیت را می دهد و به کاهش استفاده از علف کش های مضر و پرهزینه کمک می کند. ژن *OsNAC5* نیز در تحمل به خشکی و بهبود ساختار ریشه نقش دارد. سازه های نو ترکیب این ژن ها با پیش بر یو بی کویتین و پایان بر Tahsp17 در ناحیه T-DNA سازه آگروباکتریومی طراحی و به برنج منتقل شدند. گیاهان حاصل می توانند به کاهش نیاز به کشت غرقابی کمک کنند.

برنج، به عنوان یکی از محصولات استراتژیک کشاورزی، نقش حیاتی در امنیت غذایی ایران دارد. اما محدودیت های منابع آبی، خشکی و تغییرات اقلیمی، تولید پایدار این محصول را با چالش های جدی مواجه کرده است. روش سنتی تولید برنج که بر پایه کشت غرقابی استوار است، نیازمند مصرف بالای آب بوده و دلایل اصلی آن شامل کنترل علف های هرز و خنثی سازی pH خاک است. این در حالی است که برنج از نظر فیزیولوژیکی نیازی به این حجم آب ندارد. تغییر روش کشت برنج از غرقابی به کشت مستقیم به عنوان راهکاری مؤثر برای کاهش مصرف آب و بهبود بهره وری مطرح است. این تحقیق بر ایجاد ارقام برنج تراریخته با تحمل به علف کش و تحمل به خشکی متمرکز بود. با استفاده از

تشکر و قدردانی

تجربیات ارزشمند خود را بی دریغ در اختیار قرار دادند علو درجات این استاد گرانقدر را از درگاه پروردگار علیم مسئلت داریم.

بدین وسیله از پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی به دلیل حمایت مالی در قالب طرح تحقیقاتی شماره ۹۸۰۱۰-۱۹-۰۱-۰۵-۰۵ تقدیر و تشکر می شود. همچنین با گرامیداشت یاد و خاطره استاد بزرگوار جناب آقای دکتر قره یاضی که

Reference

- Dehghannezhad H, Zaefarian F, Abbasi R, Nouralizadeh Otahgsara M. weed management methods in direct-seeded rice (*Oryza sativa* L.). J Crop Prod [Internet]. 2023;16(4):21–40. Available from: https://ejcp.gau.ac.ir/article_6784.html
- Bayer DE, Hill JE, Seaman DE. Rice (*Oryza sativa*). In: Principles of Weed Control in California Fresno, CA: California Weed Conf. 1985. p. 262–8.
- Monaco TJ, Weller SC, Ashton FM. Weed science: principles and practices. John Wiley & Sons; 2002.
- Sahrawat KL. Soil fertility in flooded and non-flooded irrigated rice systems. Arch Agron Soil Sci. 2012;58(4):423–36.
- Wu W, Cheng S. Root genetic research, an opportunity and challenge to rice improvement. F Crop Res. 2014;165:111–24.
- Jeong JS, Kim YS, Redillas MCFR, Jang G, Jung H, Bang SW, et al. OsNAC5 overexpression enlarges root diameter in rice plants leading to enhanced drought tolerance and increased grain yield in the field. 2013;10:101–14.
- Redillas MCFR, Jeong JS, Kim YS, Jung H, Bang SW, Choi YD, et al. The overexpression of OsNAC9 alters the root

- architecture of rice plants enhancing drought resistance and grain yield under field conditions. *Plant Biotechnol J*. 2012;10(7):792–805.
8. Takasaki H, Maruyama K, Kidokoro S, Ito Y, Fujita Y, Shinozaki K, et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor OsNAC5 regulates stress-inducible genes and stress tolerance in rice. *Mol Genet Genomics*. 2010;284(3):173–83.
 9. Sperotto RA, Ricachenevsky FK, Duarte GL, Boff T, Lopes KL, Sperb ER, et al. Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta*. 2009;230(5):985–1002.
 10. Song S-Y, Chen Y, Chen J, Dai X-Y, Zhang W-H. Physiological mechanisms underlying OsNAC5-dependent tolerance of rice plants to abiotic stress. *Planta*. 2011;234(2):331–45.
 11. Arai-Sanoh Y, Takai T, Yoshinaga S, Nakano H, Kojima M, Sakakibara H, et al. Deep rooting conferred by DEEPER ROOTING 1 enhances rice yield in paddy fields. *Sci Rep*. 2014;4:5563.
 12. Rogers ED, Benfey PN. Regulation of plant root system architecture: Implications for crop advancement. *Curr Opin Biotechnol* [Internet]. 2015;32(Figure 1):93–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2014.11.015>
 13. Zhang T-Q, Chen Y, Liu Y, Lin W-H, Wang J-W. Single-cell transcriptome atlas and chromatin accessibility landscape reveal differentiation trajectories in the rice root. *Nat Commun*. 2021;12(1):1–12.
 14. Kawai T, Shibata K, Akahoshi R, Nishiuchi S, Takahashi H, Nakazono M, et al. WUSCHEL-related homeobox family genes in rice control lateral root primordium size. *Proc Natl Acad Sci*. 2022;119(1):e2101846119.
 15. Zandi M, Hosseini R, Mohsenpour M, HOSSEINI SG, Ghareyazie B. Transformation of DRO1, OsNAC5, OsEXPA8 genes in order to improve rice root architecture modification and improved drought tolerance in rice. 2019;
 16. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press; 1989.
 17. An G, Watson BD, Chiang CC. Transformation of tobacco, tomato, potato, and Arabidopsis thaliana using a binary Ti vector system. *Plant Physiol*. 1986;81(1):301–5.
 18. Chamani Mohasses F, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Entesari M, Bidadi H, Molaahmad Nalouisi A, et al. Efficient genetic transformation of rice using Agrobacterium with a codon-optimized chromoprotein reporter gene (ChromoP) and introducing an optimized iPCR method for transgene integration site detection. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*. 2024;156(1):5.
 19. Chamani Mohasses F, Solouki M, Ghareyazie B, Fahmideh L, Mohsenpour M. Correlation between gene expression levels under drought stress and synonymous codon usage in rice plant by in-silico study. *PLoS One*. 2020;15(8):e0237334.
 20. Mohammadzadeh N, Tohidfar M, Mohsenpour M. Agrobacterium-Mediated Transformation of Wheat (*Triticum Aestivum*) Using Chitinase and Glucanase Genes. 2010;
 21. Raufi A, Tohidfar M, Soluki M, Mohsenpour M. Isolation and Cloning of Two Genes from PR1 Family and

- Construction of Treble Plasmids Containing 3 Groups of Genes for Producing Transformed Plants Resistant to Fungal Diseases. *J Agric Biotechnol*. 2012;3(2):27–46.
22. Mohsenpour M, Tohidfar M, Jelodar NB, Jouzani GS. Designing a new marker-free and tissue-specific platform for molecular farming applications. *J Plant Biochem Biotechnol*. 2015;24(4).
 23. Mohkami A, Marashi H, Shahriary Ahmadi F, Tohidfar M, Mohsenpour M. Evaluation of Agrobacterium-mediated Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* using a Synthetic amorpho-4, 11-diene Synthase Gene. *J Cell Mol Res*. 2015;7(1):53–8.
 24. Mohsenpour M, Tohidfar M. Genetic Engineering of Plant Nuclear Genome for Specific gene Expression in Chloroplast Using Design and Transformation of Hybrid Sigma Factor. *Crop Biotechnol*. 2011;
 25. Saboori-Robat E, Solouki M, Habashi AA, Moshenpour M, Emamjomeh A. Design and construction of two-genes construct consists of 11 kDa delta zein and EPSPS genes in order to transform soybean to improve the methionine content and induce resistance to glyphosate herbicide. *Crop Biotechnol*. 2019;9(27):69–77.
 26. Ghareyazie B, Alinia F, Menguito CA, Rubia LG, De Palma JM, Liwanag EA, et al. Enhanced resistance to two stem borers in an aromatic rice containing a synthetic cryIA(b) gene. *Mol Breed*. 1997;3(5):401–14.
 27. Bennett J, Cohen MB, Katiyar SK, Ghareyazie B, Khush GS. Enhancing insect resistance in rice through biotechnology. *Adv insect Control role transgenic plants*. 1997;75–93.
 28. Kazemi M, Ghorbanzadeh Z, Pourhang L, Mousavi pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Rice genetic engineering using transformation of Deeper Rooting1 and Phosphorus-Starvation Tolerance1 genes. *Agric Biotechnol J* [Internet]. 2022;14(1):1–20. Available from: https://jab.uk.ac.ir/article_3211.html
 29. Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamoti M, Pourhang L, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Identification and investigation of DRO1 gene in rice cultivar Hashemi and its simultaneous transfer with OsCKX4 gene to improve root structure. *Crop Biotechnol* [Internet]. 2022;11(36):49–62. Available from: https://cropbiotech.journals.pnu.ac.ir/article_8590.html
 30. Pourhang L, Ghorbanzadeh Z, Kazemi Alamoti M, Mousavi Pakzad SM, Moatamed E, Mapar M, et al. Multi-gene transformation evaluation of a serine/threonine protein kinase with a gene from the cytokinin oxidase/dehydrogenase family and a transcription factor induced under stress from the NAM-ATAF-CUC family to rice. *Modares J Biotechnol*. :0.
 31. Ye X, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, et al. Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* (80-). 2000;287(5451):303–5.
 32. Li L, Zhou Y, Cheng X, Sun J, Marita JM, Ralph J, et al. Combinatorial modification of multiple lignin traits in trees through multigene cotransformation. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(8):4939–44.
 33. Mohsenpour M, Kahak S, Ghareyazie B.

Genetic Engineering and Food Security.
Strateg Res J Agric Sci Nat Resour
[Internet]. 2018;3(2):195–208. Available
from:

http://srj.asnr.ias.ac.ir/article_112926.htm
1

34. https://agrilib.areeo.ac.ir/book_11874.html

بررسی ساختار تشریحی اندام های رویشی و زایشی در گیاه لیف (*Luffa cylindrica L.*)

سایه جعفری^{۱*}، معصومه ماهوت فروشها^۲

۱. دانشیار زیست شناسی گیاهی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

۲. دانشجوی دکترای زیست شناسی تکوینی گیاهی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae Juss*) شامل گونه‌های متنوعی است که در اکوسیستم‌های گرمسیری و نیمه‌گرمسیری پراکنده‌اند و به دلیل ویژگی‌های تشریحی و کاربردهای دارویی و صنعتی مورد توجه قرار دارند. گیاه لیف (*Luffa cylindrica*)، یکی از اعضای برجسته این تیره، به دلیل استفاده از فیبر میوه در صنایع آرایشی و درمان بیماری‌هایی مانند تب، آسم و مشکلات گوارشی اهمیت زیادی دارد. این پژوهش به بررسی مراحل تکوین اندام‌های رویشی (ریشه، ساقه، برگ و دم‌برگ) و زایشی (گرده و تخمک) این گونه پرداخته است.

مواد و روش‌ها: نمونه‌برداری از بخش‌های مختلف گیاهان انجام و در فیکساتور الکل گلیسرین نگهداری شد و پس از انجام برش دستی با روش رنگ‌آمیزی مضاعف کارمن زاجی و آبی متیلن رنگ‌آمیزی شد. همچنین، نمونه‌های مرستم راس ساقه و غنچه گل در FAA تثبیت و پس از برش‌گیری با میکروتوم و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، از نمونه‌های مناسب عکس‌برداری شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که ریشه و ساقه ساختارهای چندلایه‌ای شامل اپیدرم، پوست و استوانه مرکزی دارند و برگ‌ها با مزوفیل نردبانی و اسفنجی و دم‌برگ‌ها با هیپودرم کلانشیمی مشخص می‌شوند. همچنین، آرایش دسته‌های آوندی دوطرفه در ریشه و ساقه و مزوفیل پشتی-شکمی در برگ، تطابق‌های قابل توجهی با سایر اعضای این تیره نشان داد، هرچند تفاوت‌هایی در تعداد دسته‌های آوندی ساقه و دم‌برگ مشاهده شد. در بخش زایشی، تکوین گرده شامل تقسیم میوز سلول مادر میکروسپور و تشکیل دانه‌های گرده دوکیسه‌ای است. تکوین تخمک نیز از نوع تک‌پوششی و خمیده (anatropous) است و سلول تخم‌زا در مرکز کیسه جنینی تشکیل می‌شود.

نتیجه‌گیری: این یافته‌ها علاوه بر ارائه اطلاعات ارزشمند درباره ساختار و تولیدمثل *L. cylindrica*، تنوع ساختاری و کارکردی قابل توجه در تیره کدوئیان را نشان می‌دهد. این نتایج می‌توانند در طبقه‌بندی دقیق‌تر، درک روابط فیلوژنی، ارتقای بهره‌وری کشاورزی، بهبود تولید محصولات دارویی و حفظ تنوع زیستی نقش مؤثری ایفا کنند.

کلید واژه: تیره کدوئیان، *Luffa cylindrica*، تکوین گرده و تخمک، ساختار تشریحی

Anatomical Study of Vegetative and Reproductive Organs in Tori (*Luffa cylindrica* L.)

Sayeh Jafari^{1*}, Masomeh mahootforoshha²

1. Associate Professor of Plant Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch
2. Ph.D. student in Plant Developmental Biology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

Abstract

Introduction: The *Cucurbitaceae* family (Juss) consists of diverse species in tropical and subtropical ecosystems. It is of significant interest due to their anatomical characteristics and medicinal and industrial applications. *Luffa cylindrica*, a prominent member of this family, is highly valued for its fruit fiber, which is used in cosmetic products, and its medicinal properties in treating diseases such as fever, asthma, and digestive issues. This study investigates the development stages of this species' vegetative (root, stem, leaf, and petiole) and reproductive (pollen and ovule) organs.

Methods: Samples from various plant parts were collected and preserved in a glycerin alcohol fixative. After manual sectioning, the samples were stained (double-staining method, carmine red—methylene blue). Apical meristems and flower buds were fixed in FAA, sectioned with a microtome, and stained (hematoxylin-eosin).

Results: The results showed that the root and stem have multi-layered structures, including the epidermis, cortex, and central cylinder. The leaves exhibited palisade and spongy mesophyll, and the petioles showed a characteristic hypodermal collenchyma. The vascular bundles in the root and stem were arranged in a collateral pattern. The leaf had dorsoventral mesophyll, which displayed notable similarities with other family members. However, differences in the number of vascular bundles in the stem and petiole were observed. In the reproductive organs, pollen development includes the meiotic division of the microsporocyte and the formation of a bicellular pollen grain. Ovule development was anatomic and unilayered, with the egg cell forming at the center of the embryo sac.

Conclusion: These findings not only provide valuable information about the structure and reproduction of *Luffa cylindrica*, but also highlight significant structural and functional diversity within the Cucurbitaceae. These results could be significant in more accurate classification, understanding phylogenetic relationships, enhancing agricultural productivity, improving medicinal product production, and preserving biodiversity.

Key Words: Anatomical structures, *Cucurbitaceae*, *Luffa cylindrica*, Pollen and ovule development

مقدمه

به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد آن، کشت و استفاده از این گیاه در نواحی گرم و مرطوب، از جمله در مناطق شمالی و جنوبی ایران، گسترش یافته است. تاریخچه کشت *Luffa cylindrica* نشان می‌دهد که این گیاه در مناطق مختلفی از جمله چین، هند، آمریکای مرکزی، شمال آفریقا و جنوب شرقی آسیا رشد می‌کند (۳). ویژگی‌های گیاه شناسی این گیاه عبارت است از: ساقه دراز، گره‌دار و به ارتفاع ۵ متر با مقطع ۵ ضلعی. برگ‌ها متناوب، ساده، لوب‌دار و بدون گوشوارک هستند. گل‌ها در این جنس درشت، زرد رنگ و بر دو نوع نر و ماده است که روی یک پایه قرار دارند. میوه لیف استوانه‌ای، گوشت‌دار و به رنگ سبز است که طول آن ۲۵-۵۰ سانتی‌متر و عرض آن ۵-۸ سانتی‌متر است (۳). تحقیقات مختلفی در مورد ساختار تشریحی کدوئیان (*Cucurbits*) انجام شده است، که بیشتر آن‌ها پیش از سال ۱۹۴۰ بوده‌اند (۴). مطالعات مقایسه‌ای و سیستماتیک در مورد ساختار تشریحی اندام‌های گیاهی مختلف (ریشه، ساقه و برگ) گونه‌ها این تیره توسط Ikechukwu و Ndukwu (۵)، Ajuru و Okoli (۶)، Okoli و Ndukwu (۷)، Agbagwa (۸)، Sävulescu و Hoza (۹)، Mohammed و همکاران (۱۰)، Selvaraj و همکاران (۱۱)، Francis و Vieira (۱۲)، و همکاران (۱۳)، Luchian و Teodosiu (۱۴)، Ekeke و Agogbua (۱۵) da Silva و همکاران (۱۶) انجام شده است. همچنین اهمیت علمی و کاربردی چندین گونه از تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) توسط نویسندگان مختلفی نشان داده شده است. ساختار تشریحی و ریخت‌شناسی اندام‌های رویشی برخی جنس‌های مهم این تیره و اهمیت آن‌ها (۶)، آناتومی پیچک‌ها و دم‌میوه در شناسایی گونه‌های کدوئیان (۱۵)، ساختار تشریحی دم‌برگ و ساقه گونه‌های *Momordica* (۱۸)، از جمله این مطالعات هستند که تغییرات قابل توجه ساختار تشریحی بخش‌های مختلف گیاه را جهت شناسایی

تیره‌ی کدوئیان (*Cucurbitaceae Juss*)، تیره‌ای بزرگ و ناهمگن است که به‌طور گسترده‌ای در سطح جهان پراکنش یافته‌اند. این تیره در اکوسیستم‌های مختلفی از جمله مناطق گرمسیری و نیمه‌گرمسیری وجود دارد (۱). لیف با نام علمی *Luffa cylindrica L.* که به این تیره تعلق دارد، یکی از گیاهان مهم با خواص دارویی و کاربردهای صنعتی است که در سراسر دنیا یافت می‌شود و معمولاً به عنوان "tori" شناخته می‌شود. این گیاه به دلیل میوه‌ای غنی از فیبر که برای تولید لیف مورد استفاده قرار می‌گیرد، به عنوان یک گیاه فیبری شناخته می‌شود. لیف تهیه شده از میوه استوانه‌ای و اسفنجی این گیاه که دراز و پیچان است، خواص درمانی و محافظتی بسیاری برای پوست دارد و برای برداشتن سلول‌های مرده پوست و تحریک جریان خون زیر پوست به کار می‌رود و قدمت آن به عنوان یک ابزار ماساژ به دوران باستان برمی‌گردد. همچنین فیبر این گیاه از ظرفیت بالای جذب آب برخوردار است و در تسکین دردهای مفصلی و روماتیسمی، بهبود جریان خون، برداشتن سلول‌های مرده پوست و شادابی پوست موثر است (۲ و ۳). از دیگر خواص درمانی آن در طب سنتی می‌توان به استفاده از آن در درمان طیف وسیعی از بیماری‌ها از جمله تب، تشنج، گرفتگی عضلات، کزاز، آسم و مشکلات گوارشی اشاره نمود. همچنین، مغز دانه این گیاه خاصیت ضدانگلی و بادشکن دارد و در کاهش علائم بیماری‌هایی مانند اسهال خونی و سکسکه مؤثر است.

نویسنده مسئول: دانشیار زیست شناسی

گیاهی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه

آزاد اسلامی واحد تهران شمال

آدرس الکترونیک:

jafarisayeh@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

می‌توانند به بهینه‌سازی شرایط کشت، بهبود تولید متابولیت‌های ثانویه و پرورش گیاهانی با مقاومت بیشتر نسبت به شرایط محیطی و بیماری‌ها کمک کنند. در نتیجه، توسعه چنین تحقیقاتی می‌تواند به تقویت کشاورزی پایدار و حفظ تنوع زیستی کمک شایانی نماید. به همین دلیل پژوهش کنونی به بررسی و مقایسه مراحل تکوین اندام‌های رویشی و زایشی این گیاه دارویی پرداخته است.

است، نگهداری شدند. پس از برش‌گیری، نمونه‌ها با روش رنگ‌آمیزی مضاعف با کارمن زاجی و آبی متیلن رنگ‌آمیزی شدند و پس از بررسی، از نمونه‌های مناسب با فتومیکروسکوپ (Nikon) عکس‌برداری شد. نمونه‌های مریستم راس ساقه و غنچه‌ی گل در مرحل مختلف در تثبیت‌کننده FAA قرار گرفتند و برای برش میکروتوم (مدل ۴۰۶۰ Biocut) آماده شدند. پس از برش‌گیری و رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین، از نمونه‌های مناسب عکس‌برداری شد. عکس‌برداری در دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال و در محل آزمایشگاه محمودیه انجام شد.

سلولی تشکیل شده است. استوانه مرکزی شامل یک دایره محیطی و دسته‌های آوندی است. این دسته‌های آوندی به شکل یک حلقه آرایش یافته و توسط یک لایه منفرد از سلول‌های پارانشیمی با دیواره‌های نازک، به صورت یک در میان با سلول‌های آندودرم و متناظر با عناصر پروتوگزیم قرار دارند. مقطع عرضی ساقه در این گیاه دایره‌ای و موج

گونه‌های کدوئیان نشان می‌دهند. از دیدگاه تکوینی و تشریحی، مطالعه بر روی گیاهان دارویی نظیر *Luffa cylindrica* اهمیت زیادی در درک فرآیندهای رشد و توسعه اندام‌های گیاه و همچنین نقش کلیدی در توسعه دانش گیاه‌شناسی و بهره‌وری کشاورزی دارند. مطالعات تکوینی به بررسی مراحل رشد گیاه، از جنین تا بلوغ، کمک کرده و به فهم چگونگی تعاملات ژنتیکی و محیطی در تشکیل ساختارهای گیاهی یاری می‌رساند. این مطالعات

مواد و روش ها

بذرها بعد از تهیه از موسسه اصلاح و تهیه بذر و نهال اصفهان با قارچ‌کش بنومیل در غلظت ۲ گرم ماده مؤثره در کیلوگرم بذر ضدعفونی گردیدند. سپس بذرها با آب شست‌وشو داده شدند و به مدت ۴ روز در آب خیس‌انده شدند. در آغاز فصل بهار، بعد از شخم زدن زمین، بذرها با چهار تکرار و با رعایت فاصله مناسب کشت گردیدند. آبیاری زمین با استفاده از سیستم قطره‌ای انجام شد. برای این منظور، ظروف پلاستیکی به حجم ۲۰ لیتر تهیه شد. بذور بعد از ۱۴ تا ۲۲ روز جوانه زدند. از قسمت‌های مشخصی از ساقه (بخش میانی بین میانگه‌ی سوم و چهارم) و برگ، دمبرگ و ریشه‌ی گیاهان نمونه‌برداری انجام شد و در فیکساتور الکل گلیسیرین که برای برش‌های دستی نیاز

نتایج

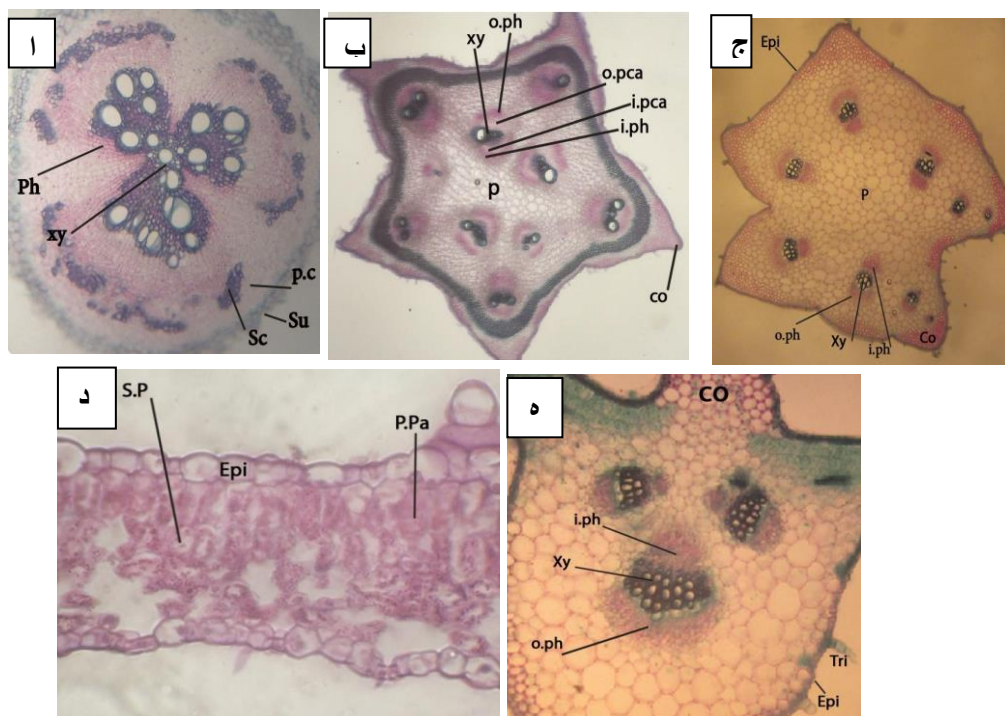
نتایج حاصل از بررسی‌های تشریحی اندام‌های

رویشی

ساختار تشریحی ریشه (شکل ۱-۱) از خارج به داخل شامل اپیدرم (یک ردیف سلول‌های پارانشیمی با دیواره‌های نازک)، پوست (لایه‌هایی از سلول‌های پارانشیمی با دیواره‌های نازک و فضای بین سلولی فراوان) تشکیل می‌شود. درونی‌ترین لایه پوست (آندودرم)، استوانه مرکزی را احاطه کرده و از سلول‌های پارانشیمی فاقد فضا‌های بین

است. ساختار درونی ساقه شامل بخش‌های زیر است (شکل ب-۱): اپیدرم، که بیرونی‌ترین لایه بوده و از سلول‌های پارانشیمی با دیواره‌های نازک و مترکم تشکیل شده و فاقد فضای بین‌سلولی است. لایه بعدی، هیپودرم، شامل چند لایه کلانشیم از نوع گوشه‌دار است که نقش حفاظتی ایفا می‌کند و در زیر نواحی برجسته قرار دارد. همچنین، در زیر نواحی فرورفته اپیدرم، تعدادی کمتر از چند لایه سلول‌های پارانشیمی وجود دارد که دارای کلروپلاست بوده و به همین دلیل فعالیت فتوسنتزی انجام می‌دهند. پوست، که در زیر هیپودرم واقع شده است، از چند لایه سلولی تشکیل شده و اطراف استوانه مرکزی را احاطه می‌کند. آندودرم، درونی‌ترین لایه پوست، از یک لایه تک‌ردیفی ساخته شده است. استوانه مرکزی شامل دایره محیطی، دسته‌های آوندی و بافت زمینه‌ای مغزی است. دسته‌های آوندی در دو حلقه ۵ تایی بیرونی و درونی آرایش یافته‌اند. دایره محیطی از چند لایه سلول‌های اسکلرانشیمی تشکیل شده و به شکل یک نوار پیوسته در آمده است. در دم‌برگ (شکل ج-۱)، بخش‌های زیر مشاهده می‌شوند: اپیدرم، که یک لایه مترکم از سلول‌های بدون فضای بین‌سلولی است و در بین آنها روزنه‌ها قرار دارد. هیپودرم، شامل چند لایه سلول کلانشیمی از نوع گوشه‌دار است که به طور گسسته در زیر اپیدرم واقع شده‌اند. پوست نیز از سلول‌های

پارانشیمی با دیواره‌های نازک تشکیل شده است. استوانه مرکزی شامل دسته‌های آوندی است که به ترتیب از خارج به داخل عبارتند از: آبکش بیرونی، کامبیوم بیرونی، بافت چوب، کامبیوم درونی (با تعداد لایه‌های کمتر نسبت به کامبیوم بیرونی) و آبکش درونی (با وسعتی کمتر از آبکش بیرونی). بررسی ساختار تشریحی برگ (شکل د-۱) نشان می‌دهد که برگ دارای سطح پشتی و شکمی است و ساختار زیر را شامل می‌شود: اپیدرم دو لایه، یکی بر روی سطح پشتی (اپیدرم فوقانی) و دیگری بر روی سطح شکمی (اپیدرم تحتانی). هر دو لایه از یک ردیف سلول‌های پارانشیمی با دیواره‌های نازک تشکیل شده‌اند. بافت مزوفیل شامل سلول‌های پارانشیمی نردبانی و اسفنجی است. سلول‌های پارانشیم نردبانی که در زیر اپیدرم فوقانی قرار دارند، استوانه‌ای شکل بوده و فضای بین‌سلولی اندکی دارند و حاوی کلروپلاست هستند. زیر این سلول‌ها، بافت پارانشیم اسفنجی یا حفره‌ای با فضای بین‌سلولی بیشتر قرار دارد و در مقایسه با سلول‌های پارانشیم نردبانی، تعداد کلروپلاست در این سلول‌ها کمتر است. دسته‌های آوندی به طور یکنواخت در بافت مزوفیل پراکنده شده‌اند، که شامل رگبرگ میانی بزرگ و رگبرگ‌های کوچکتر است (شکل ه-۱).



شکل ۱-۱، مقطع عرضی ریشه؛ ب، ساقه، و ج، دمبرگ، (رنگ آمیزی با کارمن زاجی و سبز متیل)؛ د، برگ (×۴) (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-اٹوزین)؛ ه، رگبرگ میانی لیف (×۴) رنگ آمیزی با کارمن زاجی و سبز متیل لیف (×۴)
 Su: چوب پنبه ، p.c: پارانشیم پوست ، Sc: اسکلرانسیم ، xy: بافت چوب ، ph: بافت آبکش ، Epi: اپیدرم ، Co: کلانشیم ، O.Ph: آبکش خارجی ، o.pca: پروکامبیوم بیرونی، i.pca: پروکامبیوم داخلی، i.ph: آبکش داخلی، Tri: کرک، P.Pa: پارانشیم نرده‌ای ، Sp: پارانشیم اسفنجی

قسمت انتهایی (تونیکا و کورپوس) از دو ردیف سلول فشرده و منظم در ناحیه تونیکا و توده‌ای از سلول‌های چندوجهی در ناحیه کورپوس تشکیل شده است که به تشکیل قله مریستم کمک می‌کنند. منطقه جانبی (حلقه بنیادی)، این بخش با سلول‌های کوچک و فعال، برگ‌های متقابل را در گیاه تولید می‌کند و نقش مهمی در ایجاد بنیان برگی دارد. ناحیه مریستم مغزی، سلول‌های این ناحیه واکوئلی و با رنگ‌پذیری کمتر هستند و در زیر کورپوس قرار دارند.

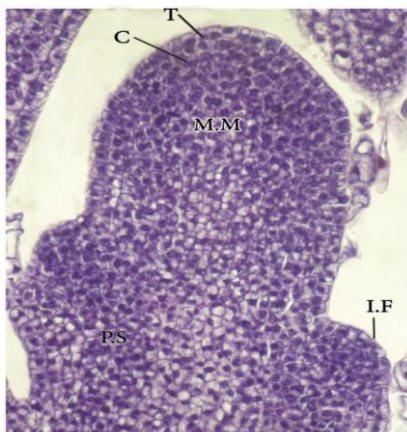
رنگ‌پذیری بیشتر نسبت به مریستم رویشی مشاهده می‌شوند. این بخش می‌تواند به‌عنوان مریستم هاگزا در نظر گرفته شود و قسمت‌های زیرین آن که رنگ‌پذیری کمتری دارند، به عنوان مریستم نهنجی شناخته می‌شوند.

ساختمان مریستم نخستین ساقه (شکل ۲) لیف مشابه تیپ رایج دولپه‌ای‌ها است و از دو بخش اصلی تونیکا و کورپوس تشکیل شده است. در زیر این ساختار، مریستم مغزی و حلقه بنیادی با سلول‌های کوچک و رنگ‌پذیر قرار دارند. پارانشیم این بخش به صورت لوب‌دار است و حفرات بزرگی میان سلول‌ها مشاهده می‌شود. مریستم رویشی راس ساقه در انتهای ساقه قرار گرفته و برگ‌های در حال تشکیل اطراف آن مشاهده می‌شوند و شامل سه بخش اصلی است:

بررسی ساختار تشریحی و تکوین مریستم زایشی

و تشکیل اجزاء گل

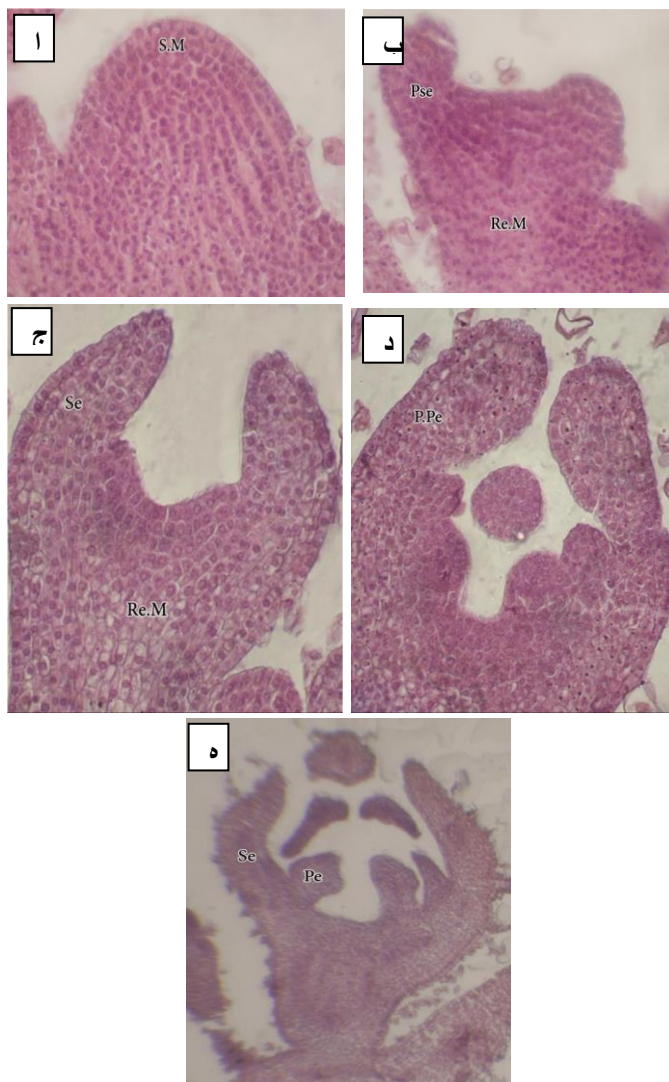
برش‌های گرفته شده از مریستم زایشی (شکل ۱-۳) نشان می‌دهند که این مریستم حجیم و برآمده است. رنگ‌پذیری آن در بخش‌های جانبی و انتهایی تقریباً یکنواخت بوده و در راس مریستم، چند لایه از سلول‌های متراکم با



شکل ۲. مریستم راس ساقه (×۱۰)، (رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-اُوزین)، T: تونیکا، C: کورپوس، M.M: مریستم مغز، I.F: بنیان برگی، I.r: حلقه بنیادی

در مراحل کمی پیشرفته تر، به دنبال فعالیت بخش بسیار حاشیه‌ای، پریموردیوم‌های مادگی یا پرچم تشکیل می‌شوند، اگرچه در این مرحله تشخیص آنها امکان‌پذیر نیست. آخرین مرحله تکوین مریستم زایشی به گل، کاسبرگ‌ها و گلبرگ‌ها در حلقه داخلی کاملاً مشخص هستند. بخش‌های حاشیه‌ای مریستم هاگزا، اجزاء زایای گل (پرچم یا مادگی) را تشکیل می‌دهند (شکل د و ه-۳) که در برش طول غنچه، اجزای گل به خوبی مشخص است (شکل ۴-۱)

مریستم هاگزا فعالیت خود را آغاز کرده و در قسمت‌های حاشیه‌ای شروع به تولید پریموردیوم‌های کاسبرگی می‌کند (شکل ب-۳) در مرحله بعد، با ادامه فعالیت این مریستم، پریموردیوم‌های کاسبرگی به کاسبرگ تبدیل می‌شوند و نسبت به مرحله قبل، طولی‌تر می‌شوند. در این مرحله، کاسبرگ‌ها دارای سلول‌های همگن هستند و سلول‌های بخش حاشیه‌ای و مرکزی مریستم هاگزا نیز در حال تقسیم و فعالیت می‌باشند (شکل ج-۳).



شکل ۳. ا، برش طولی مریستم زایشی ($\times 10$) رنگ آمیزی با هماتوکسیلین، ائوزین. ب-ه تکوین مریستم زایشی و تشکیل اجزاء گل رنگ آمیزی با هماتوکسیلین ، ائوزین

مریستم نهنجی (Re.M) ، پریموردیوم کاسبرگ (P.Se) ، کاسبرگ (Se) ، پریموردیوم گلبرگ (P.Pe) ، گلبرگ (Pe).

تکوین دانه گرده

به صورت واحد درمی آیند. دیواره بساک از بخش های زیر تشکیل شده است: اپیدرم بیرونی ترین لایه است. لایه مکانیکی لایه بعدی است که از یک لایه سلولی تشکیل شده است. لایه میانی پس از لایه مکانیکی قرار دارد و شامل ۲ یا ۳ لایه سلولی است.

بساک بخشی از پرچم یا اندام زایشی نر گیاه است و دارای ساختار دو لبی یا دوخانه ای است که از طریق یک رابط به هم متصل می شوند. هر لب از دو گیسسه گرده یا میکروسپورانژیوم تشکیل شده است. در زمان بلوغ، به دلیل تخریب بافت حدواسط، دو میکروسپورانژیوم هر لب

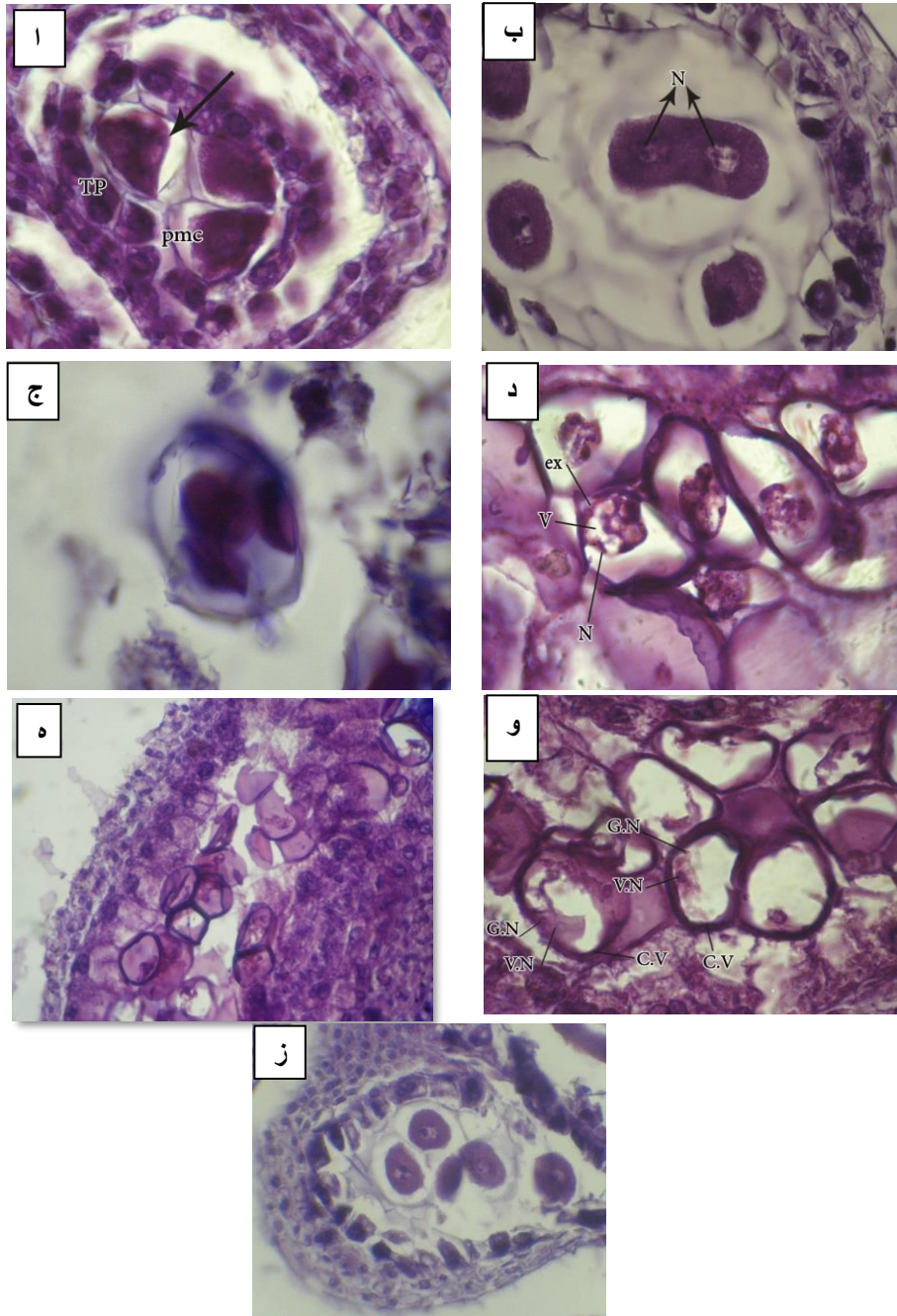


شکل ۴. ا، برش طولی غنچه نر گل لیف در مراحل ابتدایی رشدو نمو (×۱۰)؛ ب، برش طولی بساک جوان با سلولهای مادر گرده (pmc) (×۱۰۰). Se: کاسبرگ، Pe: گلبرگ، St: پرچم

کرده تشکیل شده است، به طوری که هسته در حاشیه سلول قرار گرفته است (شکل د-۵).

در شکل ه-۵، میکروسپور جوان در حال نزدیک شدن به لایه مغذی ترشچی و تغذیه از آن دیده می شود. لازم به ذکر است که لایه مغذی در لیف از نوع تاپی ترشچی تشخیص داده شده است، زیرا دانه گرده به سوی دیواره بساک حرکت کرده و پس از اتصال به آن تغذیه می کند. پس از تشکیل میکروسپور جوان، هسته آن به سرعت وارد تقسیم میتوزی شده و گرده جوان دو هسته ای می شود: یکی هسته زایشی و دیگری هسته رویشی. در این مرحله، سلول ها دانه گرده جوان نامیده می شوند (شکل و-۵). در طول این تغییرات، سلول های تاپی در جای خود باقی مانده و با ترشحات خود به تغذیه و تکوین دانه های گرده کمک می کنند. در این مرحله، در دیواره بساک، سلول های لایه مکانیکی و در سطح آن آثار سلول های اپیدرمی دیده می شوند در نهایت در شکل ز-۵ دانه گرده قابل مشاهده است.

تاپتوم یا لایه مغذی آخرین لایه است که از یک لایه واحد با سلول هایی با سیتوپلاسم متراکم و هسته های واضح تشکیل شده است. تصویر ۴-ب، برش طولی بساک جوان را نشان می دهد که در آن سلول های مادر گرده در حال تشکیل هستند. سلول های لایه مغذی لایه مشخص را تشکیل می دهند که در این گونه بیضی شکل و دو هسته ای هستند. شکل ا-۵، مراحل اولیه میوز را نشان می دهد که در آن سلول های مادر گرده توسط کالوز محصور شده اند. این سلول ها بزرگ، چندوجهی، و دارای هسته و هستک بزرگی هستند. در این مرحله، سلول های لایه تاپی از لایه میانی فاصله گرفته و سلول های لایه میانی دوکی شکل با هسته های حجیم دیده می شوند در شکل ب-۵، سلول های مادر گرده پس از گذراندن میوز ۱، تقسیم شده و با گذراندن میوز ۲ به مرحله تتراد می رسند. وجود دیواره ویژه ای در اطراف هر مجموعه تتراد به وضوح قابل مشاهده است (شکل ج-۵). تترادها به صورت همزمان تفکیک شده و میوسپور به میکروسپور جوانی تبدیل می شود که از یک هسته بزرگ و یک واکوئل که بخش عمده سلول را اشغال

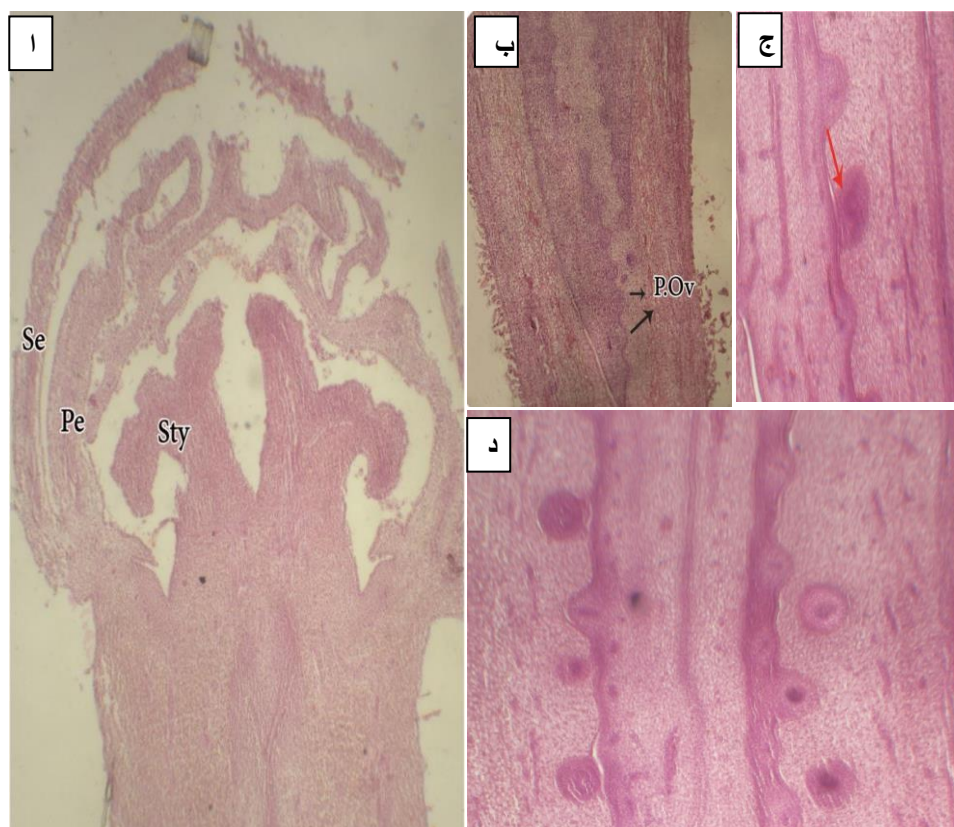


شکل ۵. ا، سلول مادر گرده در ابتدای میوز ۱ (۲) محتویات هسته برای تقسیم پراکنده شده است، شکل بخشی از سلول‌های لایه مغذی را نیز نشان می‌دهد (سلول‌های درشت با هسته و هستک‌های درشت)؛ ب: سلول مادر گرده بلافاصله بعد از میوز ۱، در یک سلول دو هسته (N) مشخص است (دیداد) (۱۰۰×)؛ ج، دیواره کالوزی (S.W) در اطراف ۴ سلول ۲ کروموزومی حاصل از تقسیم میوز در سلول مادر گرده و تشکیل تتراد (۱۰۰×)؛ د: میکروسپیور جوان با یک هسته (N) و واکوتل و واکوتل (V) (۱۰۰×)؛ ه: اتصال دانه‌های گرده به دیواره بساک و میکروسپیور جوان که در حال نزدیک شدن به دیواره بساک است (۱۰۰×)؛ و، دانه گرده دارای سلول‌زایشی با هسته متراکم (G.N) و هسته رویشی (V.N) و دیواره نازک پکتوسلولزی بین آنها (۱۰۰×)، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین؛ ز، دانه‌های گرده (۴۰×) رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین-ائوزین، Epi= اپیدرم، ex= اگزین، pme = سلول‌های مادر گرده یا مادر میکروسپیور

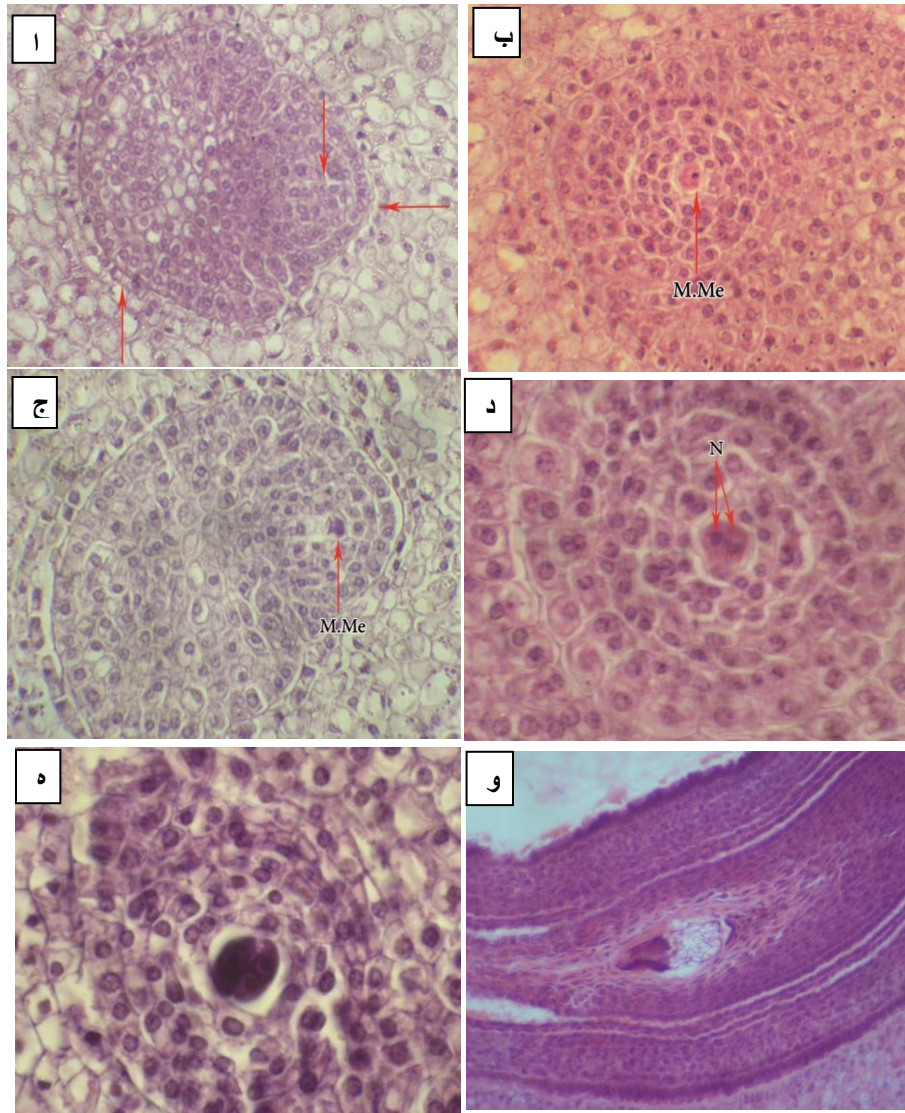
تکوین تخمک

(نوکلئوس) متشکل از سلول‌های پارانشیمی با هسته مشخص (بافت خورش) و لایه‌های تشکیل‌دهنده پوسته‌های تخمکی قابل مشاهده‌اند. با تمایز یکی از سلول‌های بافت خورش، سلول مادر مگاسپور ایجاد می‌شود (شکل ۱ و ب-۷) سلول سپس طویل شده و نسبت به سایر سلول‌های بافت خورش بیشتر متمایز می‌شود (شکل ب-۷). این سلول پس از گذراندن میوز به سلول مگاسپور تبدیل می‌شود که سه مرحله تقسیم میتوز را پشت سر می‌گذارد (شکل ج-۷) اولین تقسیم میتوز مگاسپور در شکل د-۷ مشاهده می‌شود و سپس تتراد قابل مشاهده است (شکل ه-۷) و تحولات این سلول‌ها در نهایت به تشکیل کیسه رویانی منجر می‌شود (شکل و-۷).

شکل ۱-۶ برش طولی غنچه‌ی ماده گیاه لیف در مراحل ابتدای رشد و نمو را نشان می‌دهد. مراحل تکوین تخمک که در این پژوهش مشاهده شد، شامل موارد زیر است: در تخمدان‌های بسیار جوان، برآمدگی‌های اولیه به شکل پریموردیوم‌های تخمکی از سلول‌های جدار تخمدان شروع به تشکیل می‌کنند (شکل ب-۶). سپس با تقسیمات سلولی، این پریموردیوم‌ها رشد کرده و به تدریج به تخمک‌های دارای کیسه رویانی تکوین می‌یابند (شکل ج-۶) تخمک‌ها از طریق پایه تخمک (بند) به جدار تخمدان در محل جفت متصل‌اند و تحولات این سلول‌ها در نهایت تخمک نابالغ را ایجاد می‌کند. شکل د-۶ برش طولی تخمک نابالغ را نشان می‌دهند. داخل تخمک، بافت مغذی



شکل ۶، برش طولی غنچه ماده گل لیف در مراحل ابتدای رشد و نمو (×۱۰) رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین؛ ب، تشکیل پریموردیوم‌های تخمکی در تخمدان‌های بسیار جوان (×۴) رنگ‌آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین؛ ج، تخمک‌های دارای کیسه رویانی که به وسیله‌ی بند به جدار تخمدان در محل جفت، متصل‌اند. (۷:×۴)؛ د، تخمک‌های در حال تکوین به حالت واژگون (×۱۰)
Se: کاسبرگ، Pe: گلبرگ، Sty: خامه، P.ov: پر



شکل ۷. مراحل متفاوتی از تکوین تخمک قابل تشخیص هستند: ا: تخمک بسیار جوان که در آن، محل بند (↑)، بافت خورش (↓) و لایه‌های تشکیل دهنده پوسته‌های تخمکی (←)، قابل تشخیص هستند. ب: مشخص شدن سلول مادر مگاسپور (↑) که از تمایز یکی از سلول‌های بافت خورش ایجاد شده است. ج: رشد بیشتر سلول مادر مگاسپور (↑) و تمایز مشخص‌تر آن از سایر سلول‌های خورش. د: هسته‌های هاپلوئید قابل تشخیص می‌باشند. ه: مرحله تتراد. (×۱۰۰). رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین؛ و: تشکیل کیسه رویانی (×۱۰۰)، رنگ آمیزی با هماتوکسیلین و ائوزین. M.Me: سلول مادر مگاسپور؛ N: هسته

بحث

گونه‌های مختلف، ویژگی‌های آناتومیکی ریشه تطابق‌های جالبی با عملکرد آن‌ها دارد (۱۰). مطالعات بر روی گونه‌های تیره کدوئیان نشان داده است که ریشه‌ها عموماً رشد اولیه را با وجود اپیدرم، کلانشیم، پوست، آندودرم،

مطالعات مربوط به ساختارهای تشریحی ریشه، ساقه و برگ در گونه‌های تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) از جمله *Luffa cylindrica* اطلاعات ارزشمندی در زمینه سیستماتیک و طبقه‌بندی این گیاهان ارائه می‌دهد. در

دایره محیطیه و دسته‌های آوندی نشان می‌دهند (۱۰). از این جهت گیاه لیف تفاوتی با سایر اعضای این تیره ندارد. اپیدرم در این گیاه همانند بسیاری از جنس‌های این تیره، از یک لایه تشکیل شده است. در ریشه‌ی اعضای این تیره، تنوعی در ساختار دسته‌های آوندی مشاهده می‌شود. همانطور که در این مطالعه نشان داده شد، در ریشه گیاه لیف دسته‌های آوندی به صورت دوطرفه (bicolateral) و با آرایش حلقوی قرار دارند که از این جهت با گونه‌های دیگر این جنس مانند و *Luffa aegyptiaca* (۱۰) و گونه‌های دیگری از این تیره مانند *Cucumis sativus* مشابه است (۱۰) اما در سایر گونه‌ها، ساختار پیچیده‌تری وجود دارد. به عنوان مثال ریشه‌های نمونه‌های *C. pepo*، *Citrullus lanatus* و *Citrullus colocynthis* Mill. یک استوانه مرکزی چهاربخشی نشان می‌دهند (۱۹)، این ساختار برای استوانه آوندی ریشه‌ها در تیره‌ی کدوئیان رایج‌تر است، اما گونه‌های برخی جنس‌ها مثل جنس *Momordica* L. ریشه‌های پنج‌بخشی یا شش‌بخشی را نشان می‌دهند. *Cucumis myriocarpus* Naudin ریشه‌ی سه‌بخشی داشت (۱۹). مقطع عرضی ساقه در اعضای مختلف این تیره از بیضوی تا دایره‌ای و موج‌دار گزارش شده است (۱۶). در گونه لیف مورد مطالعه در این پژوهش مقطع عرضی ساقه، دایره‌ای است، اما در گونه دیگری از این جنس *Luffa acutangula* (L.) Roxb. (۱۱) مقطع عرضی ساقه به شکلی بیضوی و موج‌دار گزارش شده است. در ساقه نیز گیاهان مختلف این تیره تنوعی از نظر ضخامت کلانشیم، ساختار حلقه‌های آوندی و وجود سلول‌های اسکلرانشیمی نشان می‌دهند (۱۰). دسته‌های آوندی ساقه در این تیره معمولاً دوگانه (bicollateral) هستند که در تیره‌های سیب‌زمینیان (Solanaceae) و مرکبیان (Asteraceae) نیز مشاهده شده‌اند (۲۰، ۲۱ و ۲۲). دسته‌های آوندی ساقه در اکثر گونه‌ها در دو حلقه قرار گرفته‌اند. حلقه بیرونی شامل دسته‌های معمولاً کوچکتری است که در زوایای ساقه قرار دارند. حلقه داخلی شامل

دسته‌های معمولاً بزرگتری است که با دسته‌های حلقه بیرونی به صورت متناوب قرار گرفته‌اند. که در این مطالعه نیز وجود دسته‌های آوندی ساقه در دو حلقه مورد تایید قرار گرفته است. در حالیکه در این گونه، در هر حلقه ۵ دسته آوندی مشاهده شد، در گونه دیگری از این جنس *Luffa acutangula* (L.) Roxb. ۶ دسته در دایره بیرونی و ۳ دسته در دایره داخلی مشاهده شد (۱۱) که بیانگر وجود تفاوت میان گونه‌های مختلف این جنس از نظر تعداد دسته‌های آوندی در هر حلقه می‌باشد. اما در برخی از اعضای این تیره نیز وجود یک حلقه دسته‌های آوندی در ساقه گزارش شده است مانند *Cucurbita moschata* (۱۱). در سایر گونه‌های این جنس که در مطالعه Mohammad و همکاران (۱۰) مقایسه شده‌اند، ۱۰ دسته آوندی به صورت دو حلقه‌ی ۵ تایی آرایش یافته‌اند همچنان که در گیاه لیف در پژوهش کنونی نیز مشاهده شده است. از ویژگی‌های دیگر این گیاه وجود دایره محیطیه اسکلرانشیمی می‌باشد که در گونه‌های *Cucurbita* نیز گزارش شده است و به صورت یک غلاف پیوسته اسکلرانشیمی ظاهر می‌شود (۱۶). آناتومی ساقه در گیاه لیف مورد مطالعه در این پژوهش حضور کلانشیم زاویه‌دار و پارانشیم مغزی با سلول‌های دیواره نازک را نشان می‌دهد که در نمونه‌های گیاه *C. pepo* نیز گزارش شده است (۱۶). وجود کلانشیم در ساقه به طور متداول در گونه‌های خانواده کدوئیان دیده می‌شود (۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲). بر اساس مطالعات صورت گرفته در این تیره، آناتومی برگ نیز با توجه به حضور کرک‌های غده‌ای و غیرغده‌ای، ساختار روزنه‌ها و نحوه‌ی قرارگیری دسته‌های آوندی تفاوت‌هایی در گونه‌های مختلف نشان می‌دهد. همچنین، بررسی‌ها نشان داده‌اند که پارانشیم نردبانی و اسفنجی در مزوفیل برگ برخی گونه‌های دیگر خانواده به ویژه *Cucumis* و *Cucurbita* از نظر تعداد لایه‌های سلولی متفاوت هستند (۱۱). برگ‌ها معمولاً در همه گونه‌ها دارای یک لایه سلول‌های اپیدرمی در هر دو سطح بالایی و

دمبرگ‌هایی با شکل محدب در سمت شکمی و با طرح مثلثی در سمت پشتی توصیف شده‌اند. Vieira و همکاران (۱۳) مشاهده کردند که دمبرگ *Luffa cylindrica* (L.) *M. Roem* دارای طرحی گرد با دو برجستگی در سمت شکمی است که با پژوهش ما در مورد لیف همخوانی دارد. تعداد دسته‌های آوندی در دمبرگ ویژگی مهمی در تمایز گونه‌های این تیره است. به عنوان مثال، Okoli و Ajuru (۶) تعداد ۶-۱۸ دسته آوندی دوطرفه را در دمبرگ *M. charantia* توصیف کرده‌اند. علاوه بر این، مطالعات دیگر ۵-۷ دسته آوندی دوطرفه در ناحیه مرکزی و دو دسته آوندی دوطرفه را توصیف کرده‌اند (۲۵). در این پژوهش نیز گیاه لیف دارای ۷ دسته آوندی دو طرفه در ناحیه مرکزی دمبرگ و دو دسته آوندی کوچک در ناحیه کناری می‌باشد. با این وجود تعداد دسته‌های آوندی دو طرفه در دمبرگ این گونه در مطالعه Vieira و همکاران (۱۳)، ۱۱ دسته گزارش شده است که ۹ دسته آن در ناحیه مرکزی دمبرگ قرار دارند. Mohammad و همکاران (۱۰) تعداد هفت دسته آوندی دوطرفه را در گونه‌های جنس‌های *Citrullus Schrad. ex Eckl. and Zeyh.* و *Luffa Mill.* و چهار دسته آوندی را در *Cucurbita L.* گزارش کردند. Okoli و Ajuru (۶) تعداد هشت دسته آوندی دوطرفه را در *Cucumis melo*، چهار عدد در *Cucurbita moschata* و دو عدد در *Cucumeropsis mannii* شناسایی کردند. در تیره کدوئیان، معمولاً بساک‌ها دوکیسه‌ای هستند (۲۸). اما در نتایج پژوهش کنونی بساک‌های چهار کیسه‌گرده‌ای در مرحله بلوغ مشاهده شد. وجود بساک‌های چهار کیسه‌ای پیشتر نیز در گونه *Luffa echinata* (۲۹) و گونه‌های دیگری از این تیره مانند *Zehneria bodinieri* (۳۰) نیز گزارش شده است. به طور کلی تنوع در تعداد کیسه‌های گرده یک بساک در این تیره دیده می‌شود به طوری که حتی در گیاهانی مانند *Cucumis leiospermus* و *Solena (=Melothria leiosperma)*

پایینی هستند، و هر دو سطح برگ دارای کرک است. مزوفیل پشتی شکمی ویژگی رایج نمونه‌ها بود که با الگوی توصیف شده برای این خانواده مطابقت دارد (۲۳). Moura و همکاران (۲۴) و Ajuru و Okoli (۶) وجود مزوفیل پشتی شکمی با ۲-۳ لایه پارانشیم نردبانی را در *C. melo*، *moschata* و *C. manii* مشاهده کردند. Sa و همکاران (۲۵) مزوفیل پشتی شکمی با یک لایه پارانشیم نردبانی را برای *M. charantia* توصیف کردند. بافت‌های کلانشیمی در خط میانی سطح بالایی رگبرگ اصلی دیده می‌شوند. دسته‌های آوندی در برگ دوگانه (bicollateral) هستند و بسته به جنس‌ها به روش‌های مختلفی قرار گرفته‌اند. تعداد دسته‌های آوندی همچنین در پهنک برگ گونه‌های *Cucurbitaceae* متفاوت است. Ajuru و Okoli (۶) هشت دسته آوندی دوطرفه در *Cucumis melo*، چهار دسته در *Cucurbita moschata* و دو دسته در *Cucumeropsis mannii* شناسایی کردند. Mohammed و همکاران (۱۰) گزارش کردند که در گونه‌های *Citrullus* و *Cucurbita* هفت دسته آوندی دوطرفه، در *Cucumi* سه دسته و در *Luffa aegyptiaca* چهار دسته وجود دارد. تنوع تعداد دسته‌های آوندی درون نمونه‌های مختلف یک گونه نیز مشاهده می‌شود. به عنوان مثال در حالیکه بر اساس مطالعه Vieira و همکاران (۱۳)، تنها یک دسته آوندی جانبی در پهنک برگ *L. cylindrica* شناسایی شد، نتایج پژوهش ما بیانگر وجود ۳ دسته آوندی دو طرفه بود. با اینکه وجود دسته‌های آوندی دوطرفه در این خانواده معمول است (۲۳)، دسته‌های آوندی هم‌جانب در برگ‌های *M. charantia* (۲۵)، و *B. alba* (۲۶) نیز مشاهده شده است. در مورد دمبرگ، مطالعاتی که گونه‌های تیره کدوئیان را در برمی‌گیرند، تفاوت‌های قابل توجهی در شکل آن نشان داده‌اند *Sechium edule*. شکلی زاویه‌دار با فرورفتگی برجسته در سمت شکمی دارد (۱۶). در *M. charantia* (۲۵) و *Momordica tuberosa Cogn* (۲۷)

مانند *Momordica cymbalaria* (= *Luffa tuberosa*) (۳۷)، هر سه نوع جهت‌گیری تترادهای میکروسپور (چهاروجهی، صلیبی و هم‌راستا) مشاهده شده‌اند. دانه‌های گرده در اکثر گیاهان تیره کدوئیان در مرحله دو سلولی از بساک آزاد می‌شوند (۲۸) که از این نظر، گیاه لیف نیز به شیوه رایج در این تیره عمل کرده است. با این حال، در *Cucumis leiospermus* (= *Melothria leiosperma*) و *Diplocyclos palmatus* (= *Bryonopsis laciniosa*) دانه‌های گرده در مرحله سه سلولی آزاد می‌شوند (۳۳). در گیاه لیف تخمدان تحتانی، دو برچه‌ای و تک‌حفره‌ای با تمکن جداری است. تخمک‌ها آویخته، دوپوششی و دارای هسته ضخیم هستند. پس از تشکیل سلول مادر مگاسپور، دو آغازیه پوسته‌ای ظاهر می‌شوند. پوسته خارجی ضخیم و بزرگ بوده، در حالی که پوسته داخلی دو لایه‌ای است. بر اساس مطالعات انجام شده ضخامت پوسته خارجی می‌تواند به ۶-۸ لایه برسد یا بین ۱۰-۸ لایه باشد (۳۱). آرکتوسپرم ماده با منشاء زیرپوستی و به صورت تک‌سلولی یا چندسلولی است (۳۱).

سلول آرکتوسپرم از طریق تقسیم پیرکلینال به سلول اولیه پاریتال خارجی و سلول مادر مگاسپور داخلی تقسیم می‌شود. سلول پاریتال با تقسیمات پیرکلینال و آنتیکلینال چندین لایه سلول (بافت پاریتال) را بالای سلول مادر مگاسپور تشکیل می‌دهد. پس از میوز، سلول مادر مگاسپور تترادی خطی از مگاسپورها تشکیل می‌دهد و انتخاب مگاسپور معمولاً به دلیل رقابت پس از میوز انجام می‌شود (۳۳). مگاسپور شالازال فعال شده و سه مگاسپور دیگر در اکثر گونه‌ها تحلیل می‌روند اما در *Citrullus colocynthis* مگاسپور اپی-شالازال فعال گزارش شده است (۳۳). Chauhan (۲۹) در *Luffa echinata* وجود سلول آرکتوسپرم دو سلولی با منشاء هایپودرمال و سلول مادر مگاسپور در حال میوز و تشکیل تریاد و تتراد مگاسپورها را مشاهده کرد.

heterophylla (= *Melothria heterophylla*) از بین سه پرچم، دو تای آنها چهارکیسه‌ای و یکی دوکیسه‌ای است (۳۰). تعداد لوب‌های بساک نیز در اعضای تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) متفاوت است (۳۱). بساک در گیاه لیف مورد مطالعه در این پژوهش دارای دو لوب است اما در گیاهانی مانند *Mukia maderaspatanus* (= *Cucumis Dactyliandra Cucurbita pepo scabrella*)، *Sicyos edulis* (= *Sechium edule*) *welwitschii* و *Momordica charantia* گونه‌های *Trichosanthes* به ترتیب ۵، ۷، ۱۲، ۱۵ و ۱۸ لوب در هر بساک گزارش شده است (۳۲). طبق گزارش‌ها، دیواره بساک‌ها به روش دولپه‌ای تشکیل می‌شود (۲۸ و ۳۳)، اما الگوی جدایش لایه‌های سلولی نیز بی‌ثبات گزارش شده است. لایه مغزی در گیاه لیف از نوع ترش‌حی تشخیص داده شد. در تمام اعضای تیره کدوئیان لایه مغزی از نوع ترش‌حی است (۲۸). سلول‌های لایه مغزی، که در یک یا دو ردیف قرار دارند، معمولاً دو هسته‌ای هستند (۲۸ و ۳۱). در برخی از گیاهان این تیره لایه مغزی تک‌هسته‌ای، دو هسته‌ای یا چند هسته‌ای گزارش شده است (۳۴) که با نتایج مطالعه کنونی همخوانی دارد. در این مطالعه نیز لایه مغزی با بیش از یک هسته علاوه بر لایه مغزی تک هسته‌ای مشاهده شد. تقسیمات میوز II در سلول‌های مادر میکروسپور به‌طور همزمان اتفاق می‌افتد اما گاهی غیرهمزمان است (۳۵). که بر اساس نتایج مطالعه کنونی همزمانی تقسیمات این سلول‌ها مورد تایید قرار گرفته است. تنوع در تعداد و اندازه هستک‌های هسته میکروسپور در *Luffa echinata* گزارش شده است (۲۹). در گیاه لیف مورد مطالعه در این پژوهش تترادهای میکروسپور به صورت چهاروجهی مرتب می‌شوند که در این تیره رایج است (۲۸)، اما آرایش چهاروجهی یا صلیبی میکروسپورها در *Luffa echinata* گزارش شده است (۲۹). تترادهای هم‌راستا (*isobilateral*) در گیاهانی مانند *Cucumis melo var. agrestis* مشاهده شده است (۳۶) و همچنین در گیاهانی

نتیجه گیری

تفاوت‌هایی بین گونه‌های مختلف مشاهده شد. همچنین، بساک‌های چهارکیسه‌ای و دولپه‌ای در گیاه لیف مورد بررسی قرار گرفت که با برخی دیگر از اعضای این خانواده مشابه است. این نتایج تنوع ساختاری و کارکردی قابل توجه در تیره کدوئیان را نشان می‌دهد و می‌تواند در طبقه‌بندی دقیق‌تر و درک روابط فیلوژنی این گروه گیاهان نقش مؤثری ایفا کند.

نتایج این پژوهش تأیید می‌کند که گیاه لیف (*Luffa cylindrica*) از نظر ویژگی‌های تشریحی ریشه، ساقه، برگ، دمبرگ، و بساک تطابق‌های جالبی با سایر اعضای تیره کدوئیان (*Cucurbitaceae*) نشان می‌دهد، در عین حال که تفاوت‌های مهمی را نیز به نمایش می‌گذارد. ساختار ریشه، ساقه و برگ این گونه از جمله آرایش دسته‌های آوندی دوطرفه در ریشه و ساقه، و وجود مزوفیل پشته‌ای شکمی در برگ، با الگوهای رایج در این تیره مطابقت دارد. اما در تعداد دسته‌های آوندی در ساقه و دمبرگ،

Reference

- Xu Z, Chang, L. Cucurbitaceae. In: Identification and Control of Common Weeds. Springer Singapore, Singapura. 2017.
- Azeez MA, Bello OS, Adedeji AO. Traditional and Medicinal Uses of *Luffa cylindrica*: a Review. J Med Plants Stud. 2013; 1(5):102-11.
- Mozaffarian V. Identification of Medicinal and Aromatic Plants of Iran. Tehran, Farhang Moaser, 2013.
- Schaefer H, Renner SS. Cucurbitaceae. In: Kubitzki, K. (eds) Flowering Plants. Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants, vol 10. Springer, Berlin, Heidelberg. 2010.
- Ikechukwu OA, Ndukwu BC. The Value of Morpho-Anatomical Features in the Systematics of *Cucurbita* L. (*Cucurbitaceae*) species in Nigeria, Afr. J. Biotechnol, 2004; 3(10): 541-546.
- Ajuru MG, Okoli BE. Comparative Vegetative Anatomy of Some Species of the 640 Family Cucurbitaceae Juss in Nigeria, Res. J. Bot., 2013; 8(1): 15-23
- Okoli BE, Ndukwu BC. Studies on Nigerian *Cucurbita moschata*. Nig. J. Bot., 1992; 5; 18-26.
- Agbagwa IO, Ndukwu BC. The value of morpho-anatomical features in the systematics of *Cucurbita* L. (*Cucurbitaceae*) species in Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2004; 3(10): 541-6.
- Săvulescu E, Hoza G. Research Results Regarding the Anatomy of *Momordica charantia* L. 641 species Lucr. St. USAMV Bucuresti, Seria B, 2010; 4; 694-700.
- Mohammed IA, Abdel Gabbar Guma N. Anatomical Diversity Among Certain Genera of Family Cucurbitaceae. Int. j. res. stud. Biosci, 2015; 3(6); 85-91.
- Selvaraj N, Vasudevan A, Manickavasagam M, Ganapathi A. In vitro organogenesis and plant formation in cucumber. Biologia plantarum. 2006; 50:123-6.
- Wahua C, Francis OV. Proximate and Morpho-Anatomical Properties of *Luffa cylindrica* (L.) Rox. (*Cucurbitaceae*). Greener J. Biol. Sci., 2024; 14(1): 28-33
- Vieira LEB, Sá RD, Randau KP. Anatomical and Histochemical Characterization of Leaves of *Luffa cylindrica* (L.) M. Roem. Pharmacog J. 2019;11(3):511-4.
- Luchian V, Teodosiu G. Research Results Regarding the Anatomy of Some Medicinal Plants of Cucurbitaceae.

- Scientific Papers. Series B, Horticulture, 2019; LXIII (1): 635-641.
15. Ekeke C, Agogbua JU. Morphological and Anatomical Studies on *Trichosanthes cucumerina* L.(Cucurbitaceae). Int. J. Plant Soil Sci, 2018; 25(6): 1-8.
 16. da Silva HCC, dos Santos Magalhães C, Randau KP. Comparative Morphoanatomic and Histochemical Characterization of *Cucurbita pepo* L. specimens. Flora, 2024; 315: 152510.
 17. Ekeke C, Agogbua J, Okoli BE. Comparative Anatomy of Tendril and Fruit Stalk in Cucurbitaceae Juss. from Nigeria. Int. J. Biol. Chem. Sci. 2015; 9(4):1875– 1887.
 18. Aguoru CU, Okoli BE. Comparative stem and petiole anatomy of West African species of *Momordica* L (Cucurbitaceae). Afr. J. Plant Sci., 2012; 6(15): 403-409.
 19. Burrows GE, Shaik RS. Comparative Developmental Anatomy of the Taproot of the Cucurbitaceous vines *Citrullus colocynthis* (perennial), *Citrullus lanatus* (annual) and *Cucumis myriocarpus* (annual). Aust. J. Bot., 2014; 62: 537–545.
 20. Yang SZ, Chen PH, Chen JJ. Stem cambial variants of selected Cucurbitaceae plants in Taiwan. Taiwania. 2023;68(2):241-9.
 21. Lekhak MM, Gondaliya AD, Yadav SR, Ghane SG, Rajput KS. Stem and root anatomy of *Zanonia indica* L.(Cucurbitaceae) and significant adaptations of the aerial roots. IAWA Journal. 2024; 3:(1):1-9.
 22. Fahn, A., Plant Anatomy. 4th Ed. New York: Pergamon, 1990; 588p.
 23. Metcalfe CR, Chalk L. Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy With Note On Economic Uses. Oxford, Clarendon. 1950
 24. Moura MD, Zerbini FM, Silva DJ, Queiroz MA. Reação de acessos de *Cucurbita* sp. ao Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV). Horticultura Brasileira. 2005;23:206-10.
 25. Sá RD, Cadena MB, Padilha RJR, Alves LC, Randau KP. Anatomical Study and Characterization of Metabolites in Leaves of *Momordica charantia* L. Pharmacogn. J., 2018; 10 (5): 823–826.
 26. Rus L, Ielciu II, Păltinean R, Vlase L, Ștefănescu C, Crișan G. Morphological and Histo-Anatomical Study of *Bryonia alba* L.(Cucurbitaceae). Not Bot Horti Agrobo. 2015; 18:43(1).
 27. Kumar P, Bilakanti L. Pharmacognostical studies on tubers of *Momordica tuberosa* Cogn., Cucurbitaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2010;20:07-11.
 28. Davis GL. Systematics embryology of Angiosperms. John Wiley & Sons Inc., New York, 1966.
 29. Chauhan SVS. Micro- and megasporogenesis in *Luffa echinata* Roxb. Agra University J. Res. (Sci.), 1970; 19: 37–42.
 30. Yao H, Lelong Y, Yanyan C, Zhihu M, Yongping Z, Chuntao Q. Improvement of embryo rescue efficiency in haploid melon (*Cucumis melo* L.) via irradiated pollen pollination. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). 2024; 159(2):36.
 31. Singh D. Cucurbitaceae. In: Comparative Embryology of Angiosperms. Bull. Indian Nat. Sci. Acad., 1970; 41: 212-219
 32. Tian S, Zhang Z, Qin G, Xu Y. Parthenocarpy in cucurbitaceae: advances for economic and environmental sustainability. Plants. 2023; 2, 12(19):3462.
 33. Johri BM, Ambegaokar KB, Srivastava PS. Comparative Embryology of Angiosperm Vol. 1 & 2 Springer-Verlag, Berlin, 1992.
 34. Zhou Y, Gao S, Zhang X, Gao H, Hu Q, Song Y, Jiao Y, Gao H. Morphology and biochemical characteristics of pistils in the staminate flowers of yellow horn during selective abortion. Australian journal of botany. 2012; 16, 60(2):143-53.
 35. Goffinet MC. 23 Comparative Ontogeny of Male and Female Flowers of *Cucumis*

- sativus*. Biology and Utilization of the Cucurbitaceae. 2019; 15:288.
36. Nguyen ML, Huyen TN, Trinh DM, Voronina AV. Association of bud and anther morphology with developmental stages of the male gametophyte of melon (*Cucumis melo L.*). Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2022; 26(2):146.
37. Sarada D, Pullaiah T. Embryology of *Luffa tuberosa*. Phytomorphology, 1985; 35: 47-52.

بررسی تاثیر کوکتل فازی علیه سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک

بهزاد همتی^{۱*}، مریم صادقیانی^۲

۱. دانشیار مرکز تحقیقات میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران

۲. دانش آموخته گروه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج، البرز، ایران

چکیده

امروزه با افزایش مقاومت باکتریهای بیماری زا به انواع آنتی بیوتیک ها و گسترش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک و بالارفتن درصد مرگ و میر حاصل از آنها یافتن راهکارهای نوین برای مقابله با سویه های مقاوم بسیار ضروری به نظر میرسد. یکی از این راهکارها استفاده از کوکتل های فازی مجموعه ای متشکل از دو یا چند باکتریوفاز می باشد که به طور اختصاصی و بدون آسیب به سلول های بدن میزبان انسانی یا حیوانی باعث از بین بردن باکتریهای عامل عفونت میگرددند.

زمینه و اهداف: هدف این مطالعه جداسازی و بررسی تاثیر باکتریوفازهای لیتیک علیه سودوموناس آئروژینوزا/ از فاضلاب بیمارستانی است.

مواد و روش ها: در این مطالعه نمونه فاضلاب از ورودی فاضلاب یکی از بیمارستانهای واقع در شهرستان کرج گرفته و به آزمایشگاه تحقیقاتی دانشگاه منتقل شد پس از تهیه کوکتل فازی از دو سویه سودوموناس آئروژینوزای ATCC ۲۷۸۵۳ و RTCC ۱۴۷۴ استفاده شد با روشهای کشت دولایه و Spot test و مشاهده پلاک و هاله های شفاف در محیط حضور باکتریوفاز و حساسیت باکتری مورد نظر به باکتریوفاز اثبات و با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تصویر برداری انجام گردید.

یافته ها: مشاهده با میکروسکوپ الکترونی حضور دو فاز با اندازه های حدود ۵۰ و ۸۰ نانومتر اثبات گردید که با خصوصیات دو خانواده از فازها به نام تکتی ویریده و سیستوویریده مطابقت داشت.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت هر دو سویه باکتری به آنتی بیوتیک ها میتوان برای از بین بردن باکتری بیماری زا و مقاوم به آنتی بیوتیک سودوموناس آئروژینوزا/ از این فازها استفاده نمود.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا/ باکتریوفاز لیتیک کوکتل فازی سویه های مقاوم

Investigating the effect of phage cocktail against antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

Behzad Hemati^{1*}, Maryam Sadeghiani²

1. Associate Professor of Biotechnology Research Center, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz, Iran

2. Graduated from the Department of Microbiology, Islamic Azad University, Karaj Branch, Alborz

Abstract

Introduction: Today, with the increase in the resistance of pathogenic bacteria to all kinds of antibiotics and the spread of antibiotic-resistant strains and the increase in the percentage of deaths resulting from them, it seems very necessary to find new solutions to deal with resistant strains. One of these solutions is the use of phage cocktails (a collection of two or more bacteriophages) that specifically and without harming the cells of the human or animal host body cause the destruction of the bacteria causing the infection. The aim of this study is to isolate and investigate the effect of lytic bacteriophages against *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater.

Methods: In this study, the wastewater sample was taken from the wastewater inlet of one of the hospitals located in Karaj city and transferred to the research laboratory of the university. After preparing the phage cocktail, two strains of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and RTCC1474 were used. The presence of bacteriophage and the sensitivity of the target bacteria to bacteriophage were confirmed by two-layer culture and spot test methods and the observation of plaques and clear halos in the environment, and imaging was done using an electron microscope.

Results: The presence of two phages with the size of 50 and 80 nm was confirmed by observing with an electron microscope, which corresponded to the characteristics of two families of phages called tectoviride and cystoviride.

Conclusion: Considering the resistance of both bacterial strains to antibiotics, these phages can be used to eliminate the pathogenic and antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, lytic bacteriophage, phage cocktail, resistant strains

مقدمه

مرگ و میر می شود. در بیماران سوانح سوختگی عامل ۶۸٪ مرگ های ناشی از عفونت زخم است (۴). در طی شیوع اخیر همه گیری بیماری کووید ۱۹ در جهان حدود ۳۰٪ از بیماران مبتلا به کووید-۱۹ از عفونت های باکتریایی زمینه ای رنج می برده اند که حداقل ۱۲٪ آنها عفونت های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است (۵). استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها و مکانیسم های متعدد مقاومت دارویی توسط این باکتری، درمان *سودوموناس آئروژینوزا* را با مشکل مواجه ساخته است. امروزه اصطلاح *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو (MDR) *سودوموناس* اطلاق میشود که حداقل به ۳ نوع آنتی بیوتیک شامل آمینوگلیکوزیدها، بتالاکتام ها و فلوروکینولون ها مقاوم باشند. *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو یکی از معضلات مهم در درمان عفونت های بیمارستانی به خصوص در بخش های مراقبت های ویژه نوزادان است. از این رو استفاده از روش های جایگزین برای درمان ضروری به نظر می رسد (۴). باکتریوفاژها ویروس هایی هستند که میزبان های باکتریایی را آلوده می کنند، اندازه ی آنها بسیار کوچک و حدود ۵۰ تا ۲۰۰ نانومتر می باشد و دارای تمام ویژگی های ویروس ها هستند لذا برای تکثیر به میزبان باکتریایی نیاز دارند (۶). ویروس های ضدباکتریایی (باکتریوفاژها) یکی از عوامل مهم کنترل جمعیت باکتریایی می باشند که به طور اختصاصی به باکتری های میزبان خود حمله کرده و باعث انهدام آنها می شوند، اما بر روی سلول های انسانی یا حیوانی تاثیری نمی گذارند. تخمین زده می شود که فاژها گسترده ترین و متنوع ترین موجوداتی هستند که در کره ی زمین وجود دارند. فاژهای لیتیک درون باکتری تکثیر می یابند و تعداد زیادی فاژ تولید می شود که در نهایی موجب مرگ باکتری می شوند (۷). اولین بار باکتریوفاژها در سال ۱۸۸۶ در گزارشی از سوی Hankin معرفی شدند. Felix d Herelle با همکاری George Eliava در سال ۱۹۳۱ از فاژها جهت درمان و پیشگیری بیماری وبا استفاده نمودند، براین اساس اولین محصول فاژی علیه باکتری *ویبروکلرا* در گرجستان به صورت تجاری تولید شد (۸). فاژدرمانی در عصر حاضر در مراکز، با تمرکز بر جداسازی و نگهداری فاژها و تولید داروهای فاژی شامل: مونوفاژها که علیه باکتری های *اشرشیاکلی*، *استافیلوکوکوس*، *سودوموناس آئروژینوزا* می باشد انجام می گیرد. همچنین داروهای پلی فاژ، فاژهای علیه بیماری های قانقاریا، کزاز، مخملک، دیفتری، سیاه زخم نیز تولید می شوند.

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و پاتوژنی فرصت طلب است (۱). این باکتری اکسیداز مثبت متحرک و دارای یک تا سه فلاژله قطبی می باشد. به جز در مواقعی که در حضور نیترات رشد میکند و آن را به نیتريت احیا می کند در سایر موارد هوازی اجباری می باشد. این باکتری در محیط های کشت رنگدانه های متعددی از جمله پیوسیانین (رنگدانه آبی)، پیووردین (رنگدانه سبز)، پیوروبین (رنگدانه قرمز) و پیو ملانین (رنگدانه سیاه) را تولید می کند. کلنی های آن بوی خاص شبیه گل یاس یا انگور دارند (۲). قادر به سازگاری با شرایط محیطی نامطلوب در بدن میزبان بوده و با ترشح انواع فاکتورهای حدت باعث ایجاد عفونت و بیماری زایی می گردند (۳). در تمام محیط ها قدرت زیست داشته و عامل بسیاری از عفونت های شدید در انسان مانند اندوکاردیت مننژیت سیتی سمی و عفونت های مزمن ریه در بیماران سیستمیک فیبروزیس هستند. اگزوتوکسین A از سمی ترین پروتیین هایی است که توسط *سودوموناس آئروژینوزا* تولید و از طریق ریویزله کردن فاکتور طویل کننده (EF-۲) پروتیین سازی در سلول های یوکاریوت باعث مهار پروتیین سازی و مرگ سلول می شود. این باکتری به عنوان دومین باکتری بیماری زای رایج در جراحیها و سومین عامل شایع و متداول عفونتهای بیمارستانی بعد از *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوک اورئوس* شناخته میشود (۱). *سودوموناس آئروژینوزا* در ۱۶٪ پنومونی بیمارستانی، ۱۲٪ عفونت های مجاری ادرار، ۸٪ عفونت زخم ها و ۱۰٪ عفونت های خونی دخالت دارد. این باکتری همچنین در بیماران دارای نقص ایمنی، مانند بیماران دریافت کننده ی داروهای سرکوب کننده ایمنی، بیماران سرطانی و پیوند مغز استخوان عامل ۳۰٪ از مرگهای ناشی از سپتی سمی و پنومونی است و در پنومونی ناشی از دستگاه تهویه مکانیکی (ونتیلاتور) در ۳۸٪ از موارد موجب

نویسنده مسئول: دانشیار، مرکز تحقیقات

بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج

آدرس الکترونیک: hemati@kiaou.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۲/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

هستند به نحوی که بعد از نابود کردن باکتری‌های مضر، خود نیز از بین می‌روند (۹). با این وجود استفاده از فازها مانند هر داروی ضد باکتریایی دیگر اثرات سوئی نیز دارد. از فازها علیه پاتوژن‌های داخل سلولی مانند گونه‌های سالمونلا استفاده نمی‌شود. به علت عدم توانایی ورود فاز به سلول‌های یوکاریوتی، فاز به سلول باکتری دسترسی نخواهد داشت. اگرچه فازها پاتوژن‌های مستقیم سلول‌های یوکاریوتی نیستند، سیستم ایمنی بدن انسان می‌تواند فاز را به عنوان آنتی‌ژن‌های خارجی تشخیص دهد و تولید آنتی‌بادی‌های ضد فاز انجام شود. تجویز تیتراهای بالای فاز به بیمار ممکن است یک واکنش شدید مانند شوک آنافیلاکسی ایجاد کند، اگرچه این عوارض منفی مشاهده نشده است. توانایی فازهای لیزوژنیک در انتقال مواد ژنتیکی بیماری‌زا و مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و تولید سموم باکتریایی مانند انتروتوکسین از طریق ترانسداکشن از دیگر ویژگی‌های فاز است که ممکن است یک ضرر در فاز درمانی قلمداد شود. برای جلوگیری از این مشکل، فازهایی که لیتیک هستند در فاز درمانی ایده‌آل می‌باشند. برخلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، فازها در طیف گسترده‌ای از درجه حرارت پایدار هستند و اگر میزبان به طور مداوم در دسترس باشد، می‌توانند بدون محدودیت باقی بمانند و انتشار ناخواسته آن یک مشکل مهم ایجاد می‌کند (۹). مساله دیگری که با فاز درمانی ایجاد می‌شود اثرات احتمالی پس از لیز باکتری است. هنگامی که باکتری‌های گرم منفی لیز می‌شوند، اجزای سلولی مانند اندوتوکسین آزاد می‌شوند. این مشکل در حال حاضر در ارتباط با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های خاص نیز وجود دارد. چنانچه مقدار زیادی از اندوتوکسین در بدن آزاد شود، میتواند موجب تب یا شوک سپتیک شود، که ممکن است منجر به مرگ شود (۹).

مرکز (HLEET) در هلند با تولید محصولات فاز ی علیه عفونت های گوارشی، سپتی سمی و عفونت ریه و دستگاه ادراری پیشگیری یا درمان عفونت های پس از عمل و پس از زایمان و درمان باکتری های مقاوم به چند آنتی بیوتیک در حال فعالیت می باشد. مرکز (QAMHB) در بلژیک نیز بیشتر بر روی فازهای موثر بر زخم های سوختگی و علیه باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، آسینتوباکتریومانی، سودوموناس آئروژینوزا و انتروباکتریاسه مطالعه داشته است. دارویی که توسط این مرکز در سال ۲۰۰۷ تولید شد با نام BFC-۱ عرضه گردید. چندین مطالعه کارآزمایی بالینی در خصوص عفونت زخم و سپتی سمی در این مرکز انجام شده است. مرکز (DSMZ) در آلمان نیز مطالعات کارآزمایی بالینی جهت بررسی تاثیر فاز بر بهبودی سیستمیک فیبروزیس و تولید محصول فاز ی برای اولین بار به صورت اسپری جهت دکلنیزاسیون باکتری سودوموناس آئروژینوزا در بیماران مبتلا به برونشیت انجام داده است (۹). باکتریوفازهایی که به طور اختصاصی سودوموناس آئروژینوزا را در مورد هدف قرار می دهند. اولین بار در اواسط قرن بیستم کشف شدند که بر روی سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به آنتی بیوتیک عامل عفونت های بیمارستانی موثر واقع شد (۱۰). فازها کاملا هوشمندانه و به طور کاملا اختصاصی بر روی باکتری میزبان خود موثر بوده و تاثیر مخربی بر فلور نرمال ندارند. در حالی که آنتی‌بیوتیک‌ها بر فلور نرمال اثر مخرب داشته و عوارضی مانند عفونت ثانویه و مشکلات گوارشی را ایجاد می‌نمایند. در محل عفونت خود تکثیر شونده هستند و نیاز به تنظیم دوز ندارند. از آنجایی که خود تکثیر شونده هستند تولید این عوامل ضد باکتریایی مقرون به صرفه بوده و از نظر اقتصادی بسیار سریع و ارزان می‌باشند. فازها اثر توکسیک ندارند و خود محدود شونده

مواد و روش‌ها

مقدار ۸۰ میلی لیتر نمونه از ورودی فاضلاب یکی از بیمارستان‌های کرج گرفته و در دو ظرف پلاستیکی درب‌دار

استریل به آزمایشگاه دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج انتقال یافت.

خالص سازی نمونه فاضلاب

۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد. دو سویه ی سودوموناس *ATCC27853* و *RTCC1474* می باشند که با استفاده از روش کربی بائر مقاوم بودن این دو سویه به آنتی بیوتیک های انتخابی به اثبات رسیده و نتایج در جداول ۱ و ۲ ارائه شده است.

نمونه فاضلاب داخل شش لوله فالکون (۱۵ میلی لیتری) ریخته شد و با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی بعد از سانتریفوژ به داخل ظرف استریل سرریز شد. نمونه ی حاصل یک بار با فیلتر سرسنگی ۰/۴۵ میکرومتر و بار دوم با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر (زیر هود و نزدیک شعله و شرایط استریل) فیلتر شده، سپس در داخل یخچال و دمای

جدول ۱. نتیجه تست کربی بائر مربوط به سویه *ATCC27853*

	CP	CRO	CZ	AMC	AN	GM	SXT	CTX
قطر هاله	۲۹MM	۱۴MM	۱۱MM	۱۱MM	۱۹MM	۱۷MM	بدون هاله	۱۶MM
نتیجه	R	S	R	R	S	S	R	R

S:Sensitive

R:Resistant

جدول ۲. نتیجه تست کربی بائر مربوط به سویه *RTCC1474*

	CP	CRO	CZ	AMC	AN	GM	SXT	CTX
قطر هاله	۳۶MM	بدون هاله	بدون هاله	بدون هاله	۱۷MM	بدون هاله	بدون هاله	۱۵MM
نتیجه	S	R	R	R	S	R	R	R

S:Sensitive

R:Resistant

غنی سازی باکتریوفاز

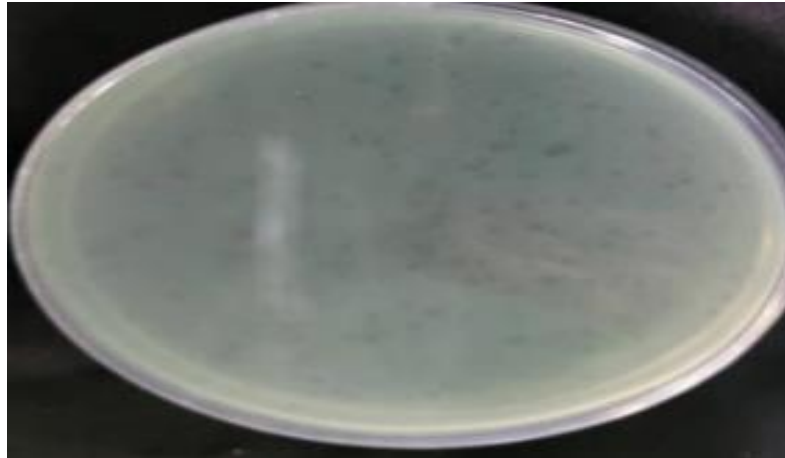
و پس از ۱۵ دقیقه محتویات آن را داخل لوله های فالکن ریخته و با دور ۱۸۰۰g به مدت نیم ساعت سانتریفوژ گردید، مایع رویی را داخل ظرف استریل ریخته و با سمپلر به داخل میکروتیوپ های دو میکرولیتری انتقال داده شد (تعداد ۲۴ میکروتیوپ)، پس از آن میکروتیوپ ها را با میکروسانتریفوژ یخچال دار با سرعت ۱۳۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ کردیم و مایع رویی را داخل ظرف استریل ریخته و ابتدا با فیلتر سرسنگی ۰/۴۵ میکرومتر و سپس با فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر گردید (۷).

۵۰ میلی لیتر از محلول خالص سازی شده ی فاضلاب را با ۵۰ میلی لیتر محیط نوترینت برات ۲X و ۱ لیتر از کشت سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری با غلظتی معادل نیم مک فارلند (کدرت نیم فارلند معادل تعداد $1/5 \times 10^8$ عدد باکتری در هر میلی لیتر می باشد) مخلوط شد، سپس چند قطره $MgSO_4$ اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شدند، بعد از خارج کردن ارلن حاوی محلول از انکوباتور، ۱۰ قطره کلروفورم به آن اضافه شد

تایید حضور فاژ از طریق کشت دولایه

وجود پلاک بررسی شد (۷). این مرحله در سه پلیت دیگر هم انجام شد با این تفاوت که از مایع فیلتر شده به مقدار ۳۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در هر کدام اضافه شد. در بررسی پلیت ها بعد از ۲۴ ساعت، در پلیت هایی که در آنها از سویه RTCC۱۴۷۴ استفاده شده بود تعداد زیادی پلاک شفاف دیده شد. همچنین از بین آنها پلاک های مربوط به غلظت ۳۰۰ میکرولیتری از همه واضح تر و به ترتیب میزان وضوح در پلیت های با غلظت مایع فیلتر شده ۴۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتری کمتر بود.

در یک لوله آزمایش استریل مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از مایع فیلتر شده و ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته سودوموناس آئروژینوزای مورد نظر که غلظت نیم مک فارلند دارد با ۲/۵ میلی لیتر نوترینت آگار (۰/۷ درصد) که در دمای ۴۵ درجه ی سانتی گراد و به حالت مایع بود مخلوط کرده و سپس آن را بر روی پلیت حاوی محیط جامد نوترینت آگار (۱/۵ درصد) ریخته و با حرکت پلیت به صورت دورانی آن را کاملا پخش کرده، سپس ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه کرده و بعد از ۲۴ ساعت از نظر



شکل ۱. ظهور پلاک ها در کشت دو لایه

تعیین اختصاصیت باکتریوفاژ با روش Spot Test

سپس آن را بر روی پلیت حاوی محیط جامد نوترینت آگار (۱/۵ درصد آگار) ریخته و پخش شد، پس از آن بسته شدن محیط رویی، از پلاک های ایجاد شده کشت آگار دولایه با آنس سوزنی برداشته

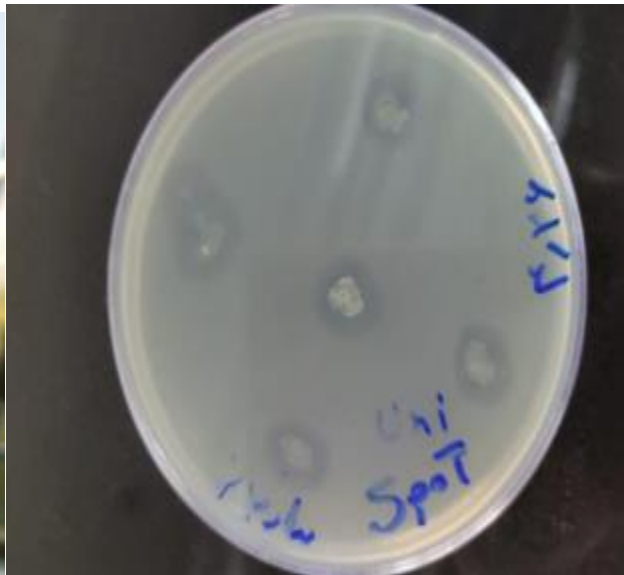
مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری با کدورت نیم مک فارلند به ۲.۵ میلی لیتر محیط نوترینت آگار (۰/۷ درصد آگار) با دمای ۴۵ درجه ی سانتی گراد اضافه کرده، خوب بهم زده و

برای افزایش قطر هاله ها تمامی مراحل کشت دولایه و اسپات تست بار دیگر با محیط لوریا برتانی انجام شد و هاله های بزرگتری به دست آمد (شکل ۴).

و به آرامی روی محیط دو لایه ی اخیر قرار داده شد و سپس با دمای ۳۷ درجه ی سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. با بررسی پلیت بعد از ۲۴ ساعت هاله های شفاف عدم رشد مشاهده شد (۷) (شکل ۳).



شکل ۳. تشکیل هاله در محیط لوریا برتانی با روش اسپات تست

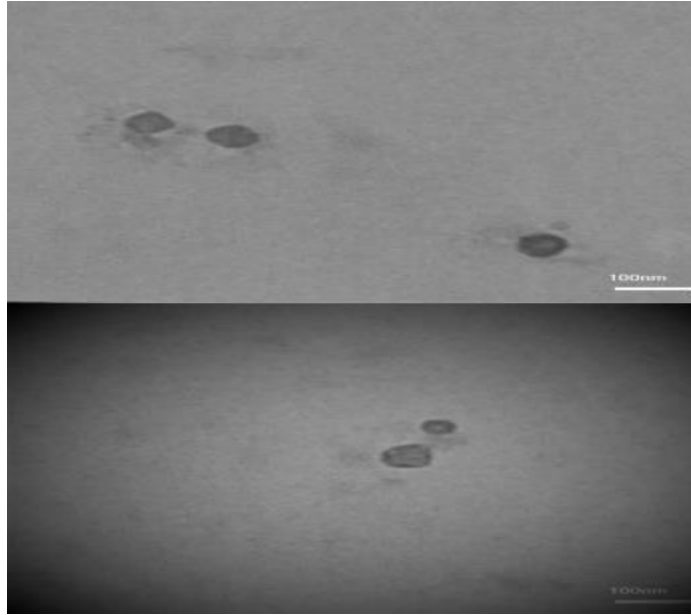


شکل ۲. شکل هاله ها در روش اسپات تست

تهیه بافر SM

با فیلتر سر سرنگی ۲۲/۰ میکرومتر فیلتر شد. محلول حاصل در ظرف استریل ریخته شد. تشخیص مورفولوژی فاز با میکروسکوپ الکترونی گزاره نمونه بر روی گرید می فرموار ۳۰۰ مش قرار داده شد و با رنگ یورانیل استات رنگ آمیزی انجام و سپس با میکروسکوپ الکترونی گزاره مشاهده شد (شکل ۵).

۵/۸ گرم بر لیتر NaCl ، ۲ گرم بر لیتر $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۵۰ میلی لیتر بر لیتر tris Hcl ۱ مولار با pH ۷.۵ مخلوط و سپس در اتوکلاو استریل شد (۱۱). ۲-۳ میلی لیتر از SM بافر حاصل را بر روی پلیت اسپات تست با محیط لوریا برتانی ریخته و ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور یخچال دار با دور ۱۰۰ در دقیقه و دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد، سپس بافر را با سمپلر جمع آوری کرده و



شکل ۴. نمایی از مورفولوژی فاژ با میکروسکوپ الکترونی

یافته‌ها

خانواده‌های تکتی ویریده و سیستم‌وپریده باشند. بنابراین کوکتل فازی شامل دو نوع فاژ لیتیک تهیه شده است که می‌توان از آن در صنایع داروسازی جهت از بین بردن سویه‌های سودوموناس *آتروژینوزای* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در زمینه‌های پزشکی و دامپزشکی استفاده نمود

وجود پلاک‌ها در کشت دولایه و همچنین هاله‌ها در روش اسپات تست نشانه وجود باکتریوفاژ لیتیک علیه دو سویه سودوموناس مورد نظر می‌باشند و طبق عکس‌های گرفته شده با میکروسکوپ الکترونی گذاره (عبوری) دو نوع فاژ جداسازی شده است که هر دو از نوع بدون دم هستند و اندازه آنها حدود ۵۰ و ۸۰ نانومتر می‌باشد و با عنایت به شکل و اندازه آنها به نظر می‌رسد متعلق به

بحث

بیوتیک‌ها باعث گرایش محققان به روشهای جایگزین برای حذف و کنترل این باکتری‌ها شده است. یکی از این روشهای جایگزین یا مکمل استفاده از باکتریوفاژها است که به منظور درمان عفونت در بسیاری از عفونتهای مقاوم به درمان به طور موفقیت آمیز مورد استفاده قرار گرفته است. این پدیده یا فاز درمانی به معنای استفاده از فازها برای درمان عفونت های ناشی از باکتریها و به خصوص استفاده از چند فاز هم زمان به صورت مخلوط که کوکتل فازی نامیده میشود برای افزایش طیف میزبان در مورد یک جنس خاص

امروزه گسترش باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک به نگرانی عمده ای تبدیل شده است (۱۲). سودوموناس اتروژینوزا یکی از عفونتهای بیمارستانی به ویژه در بخش سوختگی و گیوند محسوب می شود. این باکتری عامل اولیه عفونت های ریویدر افراد مبتلا به فیبروز سیستمیک و بیماری مزمن انسداد ریوی می باشد (۱۳). همچنین میتواند باعث بروز اسهال اپیدمیک در کودکان عفونتهای چشمی استئومیلیت عفونتهای پوستی عفونت در گوش باکتریایی، اندوکاردیت و مننژیت شود. (۱۴) عدم درمان این عفونت ها با آنتی

سویه های مقاوم باکتری سودوموناس *آنروژینوزا* داشتند و کاندیدای مناسبی برای فاز درمانی بودند (۱۲). Peng Ong و همکاران (۲۰۲۰) با جدا کردن دوفاز PAO۲ ϕ و PAO۱ ϕ و ایجاد یک کوکتل فازی برای درمان عفونت های سودوموناس *آنروژینوزا* از این کوکتل به همراه آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین و مروینم استفاده کردند و موفق به سرکوب باکتری تا ۹۶ ساعت شدند. Bing و همکاران (۲۰۲۳) توانستند فاز لیتیک H۲۲۲۰۱ علیه فاز PAO۲-philBB-PAA۱ سودوموناس *آنروژینوزا* را از آب رودخانه جداسازی کنند که فاز مذکور از خانواده کو دو ویرال میباشد (۱۷). Aliaa و همکاران (۲۰۲۳) فاز vB-PacM-PS را جداسازی کردند که بر روی بیوفیلیم حاصل از سودوموناس *آنروژینوزا* در بدن موش ها موثر بود (۱۸). در سال ۲۰۱۷، سازمان بهداشت جهانی فهرستی از پاتوژن های اولویت دار جهانی را منتشر کرد که شامل ۱۲ گونه باکتری است که بر اساس سطح مقاومت و درمان های موجود در اولویت های بحرانی، بالا و متوسط طبقه بندی شده اند. نرخ فعلی توسعه مقاومت بسیار فراتر از سطح کشف و توسعه آنتیبیوتیک است و یک چالش بهداشت عمومی جهانی را نشان میدهد. برآوردها حاکی از آن است که تا سال ۲۰۵۰ ممکن است بیش از ۱۰ میلیون نفر در سال به دلیل مقاومت ضد میکروبی جان خود را از دست بدهند. (۱۹) و این هزینه ای معادل ۱۰۰ تریلیون دلار برای اقتصاد جهان خواهد داشت و یک تهدید بزرگ برای سلامت جهانی است که میتواند بر همه افراد، صرف نظر از سن، وضعیت اجتماعی-اقتصادی، یا کشور محل زندگی آنها تأثیر بگذارد (۲۰).

علیه عفونت های مختلف باکتریایی استفاده شده است. برخلاف بیشتر آنتی بیوتیکها فازها اسلحه های هوشمندی هستند که اختصاصی عمل می کنند (۱۲). عزیزیان و همکاران در سال ۱۳۸۸ در طی تحقیقاتی در مشهد با هدف غنی سازی و جداسازی باکتریوفازهای لیتیک علیه ایزوله های سودوموناس *آنروژینوزا* مقاوم به آنتی بیوتیک تحقیقاتی را انجام دادند که نتایج حاصله نشان داد اثرات باکتریوسایدی باکتریوفازها در غلظت های بالا بسیار اثر بخش است (۱۱). Vindokumar و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از باکتریوفازهای لیتیک موشهای دچار سیتی سمی ناشی از سودوموناس *آنروژینوزا* مقاوم به چند دارو (MDR) را درمان کرده و موفق شدند آنها را از مرگ نجات دهند (۱۵). FU و همکاران (۲۰۱۰) فازهای اختصاصی سودوموناس *آنروژینوزا* را علیه بیوفیلیم ناشی از این سویه ها در کنتراهای مورد استفاده در بیمارستان مورد مطالعه قرار دادند (۱۲). Pires و همکاران (۲۰۱۱) به جداسازی و شناسایی دو فاز به برای کنترل philBB-PAP۲۱ و philBB-PAA۲ نام های فرم های پلانکتونیک و بیوفیلیم سودوموناس *آنروژینوزا* پرداختند که هر دو فاز لینیک کارایی لیز را روی فرم پلانکتونیک نشان دادند اما فاز philBB-PAA۲ در مورد تخریب بیوفیلیم موثرتر واقع شد (۱۶). زانتی و همکارانش (۲۰۱۳) فازهای سویه های بیماری زا سودوموناس *آنروژینوزا* را که به خانواده های Siphoviridae و Mauviridae تعلق داشتند، جدا کردند (۱۲). شگری و همکاران (۲۰۱۵) نیز در مطالعه ای از روش Spot Test برای جداسازی باکتریوفاز از فاضلاب بیمارستانی و شهری استفاده کردند و موفق به جداسازی و شناسایی دو باکتریوفاز شدند که به صورت مخلوط کوکتل فازی اثر باکتری کشی قوی علیه اکثر

نتیجه گیری

گردید. بنابراین تحقیق حاضر نیز با هدف جداسازی و غنی سازی و شناسایی باکتریوفاز لیتیک علیه سودوموناس *آنروژینوزا* و تهیه کوکتل فازی، موفق به جداسازی و شناسایی دو فاز لیتیک با اندازه های ۵۰ و ۸۰ نانومتر از خانواده های تکتی ویریده و سیستوویریده گردید.

در پژوهش حاضر از دو سویه سودوموناس *آنروژینوزا* (ATCC۲۷۸۵۳) و (RTCC۱۴۷۴) استفاده شد که هر دو مقاوم به آنتی بیوتیک بودند و با استفاده از روش های کشت دو لایه و اسپات تست و مشاهده پلاکها و هاله های عدم رشد وجود باکتریوفاز به اثبات رسید. همچنین با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری مورفولوژی، سایز و خانواده باکتریوفازها مشخص

سپاسگزاری

واحد کرج که ما را در این پژوهش یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی می شود.

بدینوسیله از راهنمایی و مساعدت سرکار خانم دکتر دزفولیان ریاست محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی

Reference

1. Amini B, Kamali M, zarei A, bayat E, Javadi h, Mansuri M, Farhadi N. Isolation and Rapid Identification of Peudomonas aeruginosa through PCR Bio Sci Qtr Azad Uni of Zanjan 2013 Winter, (3): 59-65
2. Taghinekhad J, Molaee Kohneh Shahri SH, Hosseinzadeh M, Javan Jasur V. Qtr J of Laboratory and Diagnosis 2015 Winter (34): 67-82
3. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):1-27.
4. Azizian R, Askari H . The Use of Phage as a Specialized Antibiotic Against Lethal Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Sci J Ilam Univ Med Sci. 2013;
5. Arumugam S, Manohar P, Sukumaran S, Sadagopan S, Loh B, Leptihn S, et al. Antibacterial efficacy of lytic phages against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa infections in bacteraemia mice models. BMC Microbiol [Internet]. 2022;22(1):1-7. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02603-0>
6. Hatfull G, Dedrick R, Schooley R. Phage Therapy for Antibiotic-Resistant Bacterial Infections. Annu Rev Med. 2022;73:197-211.
7. Nasr-Esfahani B, Roshnaei M, Fazeli H, Havaei A, Moghim Sh, Ghasemian-Safaei H et al. The Effect of Isolated Bacteriophage on Multi-Drug Resistant (MDR) Pseudomonas Aeruginosa. J Isfahan Med Sci 2014; 2014.
8. Rahimzadeh G , Farshidi F. Phage Therapy in Treatment of Gram-negative Bacterial Infections: A Systematic Review. J Mazandaran Univ Med Sci 2018;28; 2018. p. 203-12.
9. Rahimzadeh G, Saeedi M, Farshidi F, Rezai MS, Infectious P, Sciences M, et al. Phage Therapy in Tereatment of Gram-negative Bacterial Infection : A Systematic Review. J Maz Uni Med Sci. 2018;28(165):203-12.
10. Chegini Z, Khoshbayan A, Taati Moghadam M, Farahani I Bacteriophage therapy against Pseudomonas aeruginosa biofilm:A review. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials REVIEW; 2020.
11. Molla Ahmadian Kaseb A. Isolation of Bacteriophages Treatment of Infection Caused by Pseudomonas aeruginosa as an Aiternative for Antibiotics. Thsis submitted to receive the degree of Master of Sciences in Micribiology
12. Shokri D, Soleimanidelfan A, Moayednia R, Mobasherizadeh S, Shirsalimian M, Enayatollahi S EJ. Isolation Identification and Evaluation of Two Lytic Bacteriophages Against Clinical Antibiotic-Resistant Strains of Pseudomonas aeruginosa from Waste Water and Hospital Sewage of Isfahan City. Sci J Ilam Univ Med Sci [Internet].

- 2015;23:164–72. Available from: www.SID.ir
13. Dorri K, 1, Farzan Modaresi2*, Mohammad Reza shakibaie3 EM. Frequency of Gene-Producing Strains (*aprA*, *rhlI*, *rhlR*, *algD*) in Clinical.pdf. Pars Journal of Medical Sciences, Vol.20, No.2, Summer 2022; 2022. p. 39–47.
14. Khajekaramodin M, fazlibazaz B, Ebrahimi M, Ghazvini K, Afzal Aghayee M, Naderinasab M, et al. Enrichment and Isolation of Lytic Bacteriophages against Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. Iranian Journal of Medical Microbiology, No 2,3, Summer and Winter 2008, p. 66-72
15. Vinodkumar C, Kalsurmath S, Neelagund Y. Utility of lytic bacteriophage in the treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. Indian J Pathol Microbiol. 2008 Jul 1;51(3):360–6.
16. Pires D, Sillankorva S, Faustino A, Azeredo J. Use of newly isolated phages for control of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and ATCC 10145 biofilms. Res Microbiol [Internet]. 2011;162(8):798–806. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092325081100115X>
17. Fei B, Li D, Liu X, You X, Guo M, Ren Y, et al. Characterization and genomic analysis of a broad-spectrum lytic phage HZ2201 and its antibiofilm efficacy against *Pseudomonas aeruginosa*. Virus Res [Internet]. 2023;335(April):199184. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199184>
18. Abdelghafar A, , Ghada G, Momen S. A novel lytic phage exhibiting a remarkable in vivo therapeutic potential and higher antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2023;42(10):1207–34. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04649-y>
19. Furfaro L, Payne M, Chang B. Bacteriophage Therapy: Clinical Trials and Regulatory Hurdles. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(October):1–7.
20. Altamirano F, Barr J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2019;32(2):e00066-18. Available from: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/CMR.00066-18>

مروری بر تاثیر میکروبیوم بر بیماریهای خودایمنی

سارا بصری^۱، محدثه لاری پور^۲

۱. دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

۲. دانشیار قارچ شناسی، دانشکده ی علوم زیستی، دانشگاه آزاد تهران شمال

چکیده

سابقه و هدف: بیماری‌های خودایمنی ناشی از پاسخ ایمنی نامناسب به آنتی‌ژن‌های خودی هستند که منجر به التهاب مزمن و آسیب بافتی می‌شوند. در دهه‌های اخیر، مطالعات نشان داده‌اند که میکروبیوم روده، به عنوان یک اکوسیستم پیچیده از باکتری‌ها، قارچ‌ها و ویروس‌ها، نقش کلیدی در تنظیم سیستم ایمنی و هموستاز دارد. هدف از این مطالعه مروری، بررسی تاثیر میکروبیوم روده بر پاتوژن‌ها و پیشرفت بیماری‌های خودایمنی مختلف است. این بررسی نشان می‌دهد که دیس‌بیوز روده (اختلال در تعادل میکروبی روده) با بسیاری از بیماری‌های خودایمنی از جمله بیماری روماتیسم مفصلی، دیابت نوع ۱، بیماری التهابی روده و ام‌اس مرتبط است. مکانیسم‌های پیشنهادی شامل تولید متابولیت‌های میکروبی، مدولاسیون پاسخ‌های ایمنی ذاتی و تطابقی و تاثیر بر نفوذپذیری روده هستند. در نهایت، این بررسی پتانسیل مداخلات درمانی مبتنی بر اصلاح میکروبیوم، مانند پروبیوتیک‌ها و پیوند مدفوع، را برای مدیریت بیماری‌های خودایمنی برجسته می‌کند، هرچند تحقیقات بیشتر برای تایید این پتانسیل ضروری است.

نتیجه گیری: در مجموع، شواهد فزاینده‌ای نشان می‌دهد که میکروبیوم روده نقش مهمی در پاتوژن‌ها بیماری‌های خودایمنی ایفا می‌کند. اختلال در ترکیب و عملکرد میکروبیوم می‌تواند به اختلال در سیستم ایمنی و افزایش خطر ابتلا به این بیماری‌ها منجر شود. درک دقیق مکانیسم‌های این ارتباط می‌تواند به توسعه استراتژی‌های درمانی جدید و مؤثر مبتنی بر اصلاح میکروبیوم روده برای پیشگیری و درمان بیماری‌های خودایمنی بینجامد. با این حال، تحقیقات بیشتری برای تایید این یافته‌ها و تعیین کاربرد بالینی این رویکردها ضروری است.

کلمات کلیدی: میکروبیوتا، بیماری‌های خودایمنی، سیستم ایمنی، پروبیوتیک

A review of the impact of the microbiome on autoimmune diseases

Sara Basri^{1*}, Mohaddeseh Larypoor²

1. Phd student in Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch

2. Associate Professor of Mycology, Faculty of Biological Sciences, Islamic Azad University, North Tehran Branch²

Abstract

Introduction: Autoimmune diseases arise from an inappropriate immune response to self-antigens, leading to chronic inflammation and tissue damage. In recent decades, studies have demonstrated that the gut microbiome, a complex ecosystem of bacteria, fungi, and viruses, plays a crucial role in regulating the immune system and homeostasis. The aim of this review is to investigate the impact of the gut microbiome on the pathogenesis and progression of various autoimmune diseases. This review reveals that gut dysbiosis (an imbalance in the gut microbiota) is associated with many autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, type 1 diabetes, inflammatory bowel disease, and multiple sclerosis. Proposed mechanisms include the production of microbial metabolites, modulation of innate and adaptive immune responses, and effects on gut permeability. Finally, this review highlights the potential of microbiome-based therapeutic interventions, such as probiotics and fecal microbiota transplantation, for managing autoimmune diseases, although further research is needed to confirm this potential.

Conclusion: In summary, mounting evidence suggests that the gut microbiome plays a significant role in the pathogenesis of autoimmune diseases. Disruptions in microbiome composition and function can lead to immune dysregulation and an increased risk of these diseases. A precise understanding of the mechanisms underlying this association could lead to the development of new and effective therapeutic strategies based on modulating the gut microbiome for the prevention and treatment of autoimmune diseases. However, further research is crucial to validate these findings and determine the clinical applicability of these approaches.

Keywords: Microbiota, Autoimmune Diseases, Immune System , Probiotic

مقدمه

تعداد سلولهای عفونت ها بیان ناپجای مولکول MIC₂ هورمونها بخصوص هورمونهای جنسی و ... از عوامل مستعد کننده بیماری های خود ایمنی هستند. برای مثال استروژن سبب تحریک و تستوسترون مانع فعالیت خود ایمنی میشود مثلا دوسوم مبتلایان به ام اس زنان هستند. زنان ده برابر بیشتر از مردان به بیماری های خودایمنی مبتلا میشوند یا اگر میزان کورتیزول از حدی بالاتر رود. می تواند سبب تحریک بیماری های خودایمنی شود (۲). مواد و روش ها برای نگارش این مقاله مروری با استفاده از واژگان کلیدی میکروبیوتا، بیماریهای خود ایمنی، سیستم ایمنی، پروبیوتیک، به جست و جو در پایگاه های اطلاعاتی Scopus, Google Scholar, Science Direct, Pub Med پرداخته و مقاله های مرتبط به کار گرفته شد.

بیماری های Immune - Mediated Disease که بر اثر حمله سیستم ایمنی به التهابهای غیر قابل کنترل به وجود می آیند، از جمله بیماریهایی هستند که در سالهای اخیر در کشورهای صنعتی و پیشرفته اپیدمیک شده اند. از جمله این بیماری ها می توان به دیابت نوع ۱ گریوز، ام اس میاستنی گراویس ارتريت روماتوئید، اسم لوپوس و... اشاره کرد. این بیماری ها هنگامی رخ می دهد که دستگاه ایمنی بدن به اشتباه حمله به خود بدن را آغاز میکند و هر بیماری علائم هشدار دهنده خود را دارد. تاکنون ۸۰ نوع بیماری خودایمنی شناخته شده که ابتلا به تعدادی از آنها در سالهای اخیر رو به افزایش است (۱). در تمام این بیماری ها فعالیت سیستم ایمنی کمتر یا بیشتر از حد معمول است. بسته به نوع عارضه ای که ایجاد میشود بیماری ممکن است قابل کنترل باشد. آزاد شدن آنتی ژنهای مخفی اختلال در کار تیموس کاهش

یافته ها و بحث

پدیده ی Tolerance

دسترس سلول های دستگاه ایمنی، تنظیم فعالیت لنفوسیت ها از طریق سلول های T مهار کننده و حذف سلول های T حساس به آنتی ژن های خودی در تداوم پدیده تحمل دخالت دارند. عوامل محیطی موثر در بروز بیماری های خودایمنی بسیار متنوعند و عوامل فیزیکی و روحی می تواند زمینه ساز بروز بیماری های خود ایمنی شود (که به دو نوع systemic و Tissue specific تقسیم می شوند. در مورد بیماری های systemic در بیشتر موارد اکثر نقاط بدن درگیر می شود مانند آرتریت روماتوئید. از جمله بیماری های Tissue specific می توان به میاستنی گراویس، دیابت وابسته به انسولین و تیروئید اشاره کرد). میزان بروز بیماری های خودایمنی در برخی خانواده ها با زمینه ارثی شایع تر است.

در شرایط طبیعی دستگاه ایمنی بدن بنا به پدیده ای به نام تحمل نسبت به آنتی ژن های خودی عکس العمل نشان می دهد. عواملی مانند دور نگه داشتن آنتی ژن های خودی از

نویسنده مسئول: دانشجوی دکترای، دانشکده

علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد

تهران شمال

آدرس الکترونیک:

sarab517582@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۰۹/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۹/۲۲

عفونت). بهترین راه استفاده از پروبیوتیک ها و پری بیوتیک هاست. تحقیقات نشان داده استرس در میزان ابتلا و پیشرفت بیماری های خودایمنی موثر است. مصرف پروبیوتیک ها مثل لاکتوباسیل ها باعث تغییر بیان ژن GABA می شود که موجب کاهش استرس و اضطراب شده و این خود در متعادل نگه داشتن میکروبیوتای بدن موثر است (۵). در یک مطالعه روی ۳۰ نوزاد ارتباط قابل توجهی بین ویژگی های خاص میکروبیوم روده و قدرت پاسخ های نوزادانه ترس مشاهده کردند. نوزادانی با شرایط یکسان از نظر تغذیه و عدم استفاده از آنتی بیوتیک. خود ترس و استرس تضعیف کننده سیستم ایمنی است و می تواند بدن را مستعد بیماری های خودایمنی کند (۲).

می شود. حال اگر بیاییم و التهاب سیستم ایمنی را سرکوب کنیم، به نحوی از این بیماری ها ممانعت کرده ایم ولی در مواردی دیده شده سرکوب سیستم ایمنی که خیلی فعال است، فرد را مستعد بیماری های دیگر نیز می کند (مثل عفونت). بهترین راه استفاده از پروبیوتیک ها و پری بیوتیک هاست. تحقیقات نشان داده استرس در میزان ابتلا و پیشرفت بیماری های خودایمنی موثر است. مصرف پروبیوتیک ها مثل لاکتوباسیل ها باعث تغییر بیان ژن GABA می شود که موجب کاهش استرس و اضطراب شده و این خود در متعادل نگه داشتن میکروبیوتای بدن موثر است (۵). در یک مطالعه روی ۳۰ نوزاد ارتباط قابل توجهی بین ویژگی های خاص میکروبیوم روده و قدرت پاسخ های نوزادان به ترس مشاهده کردند. نوزادانی با شرایط یکسان از نظر تغذیه و عدم استفاده از آنتی بیوتیک. خود ترس و استرس تضعیف کننده سیستم ایمنی است و می تواند بدن را مستعد بیماری های خودایمنی کند (۲).

در ایجاد این بیماری ها توارث پلی ژنتیک مطرح است. یعنی ژن های مختلف با جایگاههای متفاوت دخیل هستند که اطلاعات ما در مورد آن ها اندک است. یک دسته از این ژن ها که به خوبی شناخته شده اند کمپلکس HLA و MHC است. علائم بیماری های خودایمنی معمولاً رفت و برگشتی است. ممکن است بیمار برای مدتی هیچ علائمی نداشته باشد و مدتی بعد با یک حمله شدید و ناگهانی مواجه شود. (تشخیص بیماری های خودایمنی به روش های مختلف مانند تست های سربولوژیک، ایمونو فلورسانس و الیزا و.. انجام می گیرد) (۳). حال اگر بیاییم و التهاب سیستم ایمنی را سرکوب کنیم، به نحوی از این بیماری ها ممانعت کرده ایم ولی در مواردی دیده شده سرکوب سیستم ایمنی که خیلی فعال است، فرد را مستعد بیماری های دیگر نیز می کند (مثل تعامل میکروبیوتا با مغز

میکروبیوتا از طریق مکانیسم های مختلفی از قبیل سیستم ایمنی، مسیرهای عصبی و غدد درون ریز با مغز تعامل دارد. اختلالات میکروبی (Dysbiosis) با برخی بیماری های خود ایمنی ارتباط دارد، از جمله دیابت، اختلالات تیروئید، آسم، انسفالوپاتی کبدی، MS،MG ... بخصوص ثابت شده دیابت نوع ۱ و پرکاری خودایمنی تیروئید با تغییر در میکروبیوتای دستگاه گوارش مرتبط است. در دیابت داروی مورفین گزینه ای برای درمان است. مکانیسم عمل این دارو هنوز مشخص نیست ولی میکروبیوتای روده به عنوان یک سایت بالقوه عمل متفورمین پیشنهاد شده است. بعلاوه رژیم غذایی پرچرب بخصوص چربی های اشباع موجب مقاومت به انسولین شده، نفوذپذیری روده را افزایش می دهد و التهاب ایجاد می کند. در بیماری آسم میکروبیوتیک نابالغ در دستگاه گوارش، بلوغ مناسب سیستم ایمنی را به تاخیر انداخته و تحمل ایمنی را مختل می کند. این عدم تحمل باعث افزایش حساسیت مانند آسم می شود (۴). در IBD بر اساس ژنتیک فرد پاسخ های التهابی تشدید می شود و میکروبیوتای تغییر یافته روده دیده

IgA ترشحي

می شود (۶). بدن انسان بیش از ۱۰۰ تریلیون باکتری دارد که در انواع عملکردی متابولیکی بدن نقش دارند و عمدتاً در ۶ خانواده فرمیکوت ها، باکترئیدزها، پروتوباکترها، اکتینوباکترها و وروکومیکروباکترها قرار دارند. بالغ بر ۱۰۰۰ گونه باکتریایی در دستگاه گوارش (روده) انسان وجود دارد که در هر شخص حداقل ۱۶۰ نوع دیده می شود و بیشتر در گروه باکترئیدزها و فرمیکوتاها هستند (۷). عوامل تغییر تعادل میکروبی روده عبارتند از: ژنتیک، رژیم غذایی، داروها، سبک زندگی، بیماری ها، محل سکونت، جنسیت... همچنین مصرف آنتی بیوتیک ها به ترتیب سبب کاهش تعداد و تنوع میکروبی شده و مصرف پروبیوتیک ها اساساً در افزایش و گسترش تنوع میکروبی دستگاه گوارش موثر است (۸).

سیستم ایمنی وابسته به روده (GALT) توانایی مبارزه با پاتوژن ها را دارد. سدهای بیوشیمیایی و فیزیکی، میکروبیوتا و پاتوژن ها را از مخاط روده جدا می کند و مانع فعالیت بیش از حد سیستم ایمنی موضعی می شود. به علاوه سلول های اپی تلیال روده در ایجاد و عملکرد سدهای دفاعی نقش اساسی دارند. M cell هایی که در Peyer's patch ها قرار دارند در ترنس سیتوز یا جابجایی باکتری ها نقش دارند. به این صورت که نمونه آنتی ژنی در لومن روده را اندوسیتوز کرده و این نمونه یا آرگانسیم را به سلول های دندریتیک، T cell ها و B cell ها ارائه می دهند تا پاسخ ایمنی ایجاد شود. IgA ترشحي هم مورد دیگری است که از موکوس روده به صورت دیمر IgA ترشح می شود و به الگوهای آنتی ژنی میکروب ها متصل شده و موجب آگلوتیناسیون و بلاک فعالیت آنها در میزبان

HLA آنتی ژن لکوسیت های انسانی

روده در تحریک یا توقف پاسخ های التهابی بدن هستند که توسط خود باکتری ها یا متابولیت های تولیدی آنها، سلول های ایمنی آموزش دیده یا مکانیسم ناشناخته دیگری صورت می گیرد (۹). میکروبیوتای روده نقش مهمی در گوارش، سلامتی فیزیکی و سلامت روحی بر عهده دارد. تحقیقات اخیر نشان داده باکتری هایی که برای بیشتر افراد سودمند هستند، میتوانند سلامت برخی افراد را به خطر انداخته و منجر به بیماری های خود ایمنی در افراد آسیب پذیرتر شوند (۱۰).

در بیماری های خود ایمنی (که در ادامه به تعدادی از آن ها اشاره می شود) اغلب تا حدی تغییراتی در مجموعه ژن های آنتی ژن لکوسیت های انسانی (HLA) دیده می شود که در سیستم ایمنی تطبیقی نقش دارند. (یعنی عوامل بیماری زا را شناسایی می کنند) HLA ها آنتی ژن ها را به لنفوسیت های B و T ارائه می دهند. سلول های T که سلول های خودی را نادیده می گیرند، این خاصیت را بیشتر در تیموس دریافت می کنند ولی برخی نیز در روده دارای این خاصیت می شوند. زیست شناسان در حال حاضر در حال بررسی نقش میکروبیوم

در جدول زیر پنج بیماری خود ایمنی از این نظر بررسی شده اند:

جدول ۱- خلاصه یافته های تحقیقات پیرامون ارتباط میکروبیوتای روده و بیماریهای خود ایمنی

بیماری	تغییرات در میکروبیوم روده	باکتری های مرتبط	درمان های بالقوه با توجه به میکروبیوم	جزئیات بیشتر	منابع
سندرم آنتی فسفولیپید	در این بیماران عامل ایجاد التهاب و افزایش خطر لخته شدن خون، سگته و حتی مرگ (بخصوص مرگ ناگهانی در بیماران جوان تر)	افزایش * <i>Roseburia intestinalis</i> * که در افراد سالم مفید است، اما در این بیماری مضر است و باعث التهاب و افزایش خطر لخته شدن خون می شود. تزریق آن به موش های مبتلا به این سندرم، باعث پیشرفت بیماری می شود.	حذف باکتری های مضر در روده (به عنوان مثال، با استفاده از آنتی بیوتیک ها)	مطالعات نشان می دهند که از بین بردن این باکتری می تواند به پیشگیری از آمبولی کمک کند. البته زن شخص و سبک زندگی هم می تواند موثر باشد.	۱۰، ۱۱، ۱۲
لوپوس	دیس بیوز (عدم تعادل در میکروبیوم): کاهش *لاکتوباسیلوس* و *س* و *بیفیدوباکتریوم* (کاهش) و *م*، *افزایش* *کلبسیلا* و *پروتئوس*	*کلبسیلا* و *پروتئوس* (افزایش)؛ *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم* (کاهش)	استفاده از آنتی بیوتیک های زوداثر برای کاهش *کلبسیلا* و *پروتئوس* و جایگزینی با *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدوباکتریوم*	مطالعات نشان می دهند که آنتی بیوتیک های زوداثر می توانند شدت بیماری را کاهش دهند. بررسی ها نشان می دهد که دیس بیوز در این بیماری کاملاً مشهود است. عوامل ژنتیکی به تنهایی نمی توانند تفاوت در شیوع و سن شروع بیماری را در جوامع مختلف توضیح دهند. عوامل اپی ژنتیکی و محیطی نیز نقش مهمی ایفا می کنند.	۱۴، ۱۳، ۱۵

<p>۱۶)، (۱۷)</p>	<p>مطالعات نشان می‌دهند که میکروبیوم روده در شدت و روند بیماری MS نقش دارد. حتی در دوقلوهای همسان، تا ۳۵٪ احتمال ابتلا در هر دو وجود دارد، اما رژیم غذایی می‌تواند شدت و روند بیماری را کنترل کند. انتقال میکروبیوم افراد مبتلا به موش‌های عاری از میکروب، باعث بروز بیماری شدیدتر در موش‌ها می‌شود. مکانیسم دقیق تأثیر میکروبیوم روده بر بیماری هنوز مشخص نیست، اما امید است که این دانش به درمان‌های بهتر (شاید به شکل قرص‌های پروبیوتیک ساده) منجر شود. مصرف بیفیدوباکتریوم لاکتیس به همراه گالاتولیگوساکارید، جمعیت بیفیدوباکتری‌ها و لاکتوباسیلوس‌ها را در روده افزایش می‌دهد و جمعیت سلول‌های T تنظیمی را نیز افزایش می‌دهد. سازمان بهداشت جهانی نیز اصلاح رژیم غذایی، رعایت بهداشت و مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها را در اصلاح میکروبیوم و تأثیر آن بر تعدیل و بلوغ سیستم ایمنی موثر می‌داند.</p>	<p>استفاده از پروبیوتیک‌ها (مانند مخلوط لاکتوباسیلوس‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها) به همراه پری‌بیوتیک‌ها (به شکل سیمببوتیک) برای بهبود فاکتورهای التهابی، مقاومت به انسولین و ناتوانی حرکتی. اصلاح رژیم غذایی، رعایت بهداشت و مصرف صحیح آنتی‌بیوتیک‌ها.</p>	<p>برخی گونه‌ها باعث افزایش پاسخ‌های التهابی می‌شوند</p>	<p>تفاوت در فراوانی گونه‌های باکتریایی در مقایسه با افراد سالم</p>	<p>MS (مالتیپل اسکلروزیس)</p>
----------------------	---	--	--	--	-----------------------------------

<p>(۵)، ۱۸ (۱۹)</p>	<p>مطالعات نشان داده‌اند که ترکیب ۵ پروبیوتیک می‌تواند در موش‌های مبتلا به MG بهبود ایجاد کند و بیان مارکرهای تنظیمی مانند IL-۱۰ و TGFβ را افزایش دهد. همچنین، استفاده از پروبیوتیک‌های خاص و پری‌بیوتیک‌ها می‌تواند به افزایش سلول‌های T تنظیمی و تولید سایتوکاین‌های ضد التهابی کمک کند. افزایش جمعیت T cell ها، به ویژه در طحال موش‌های درمان شده با لاکتومیکس، وابسته به IL-۱۰ است. نتایج نشان دهنده اثر مثبت مخلوط لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس در بهبود بیماران مبتلا به بیماری‌های خودایمنی است.</p>	<p>استفاده از ترکیبی از ۵ پروبیوتیک (اثربخشی در موش‌ها نشان داده شده است). استفاده از پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس کریسپاتوس*، لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس* و LMGS لاکتیس* به منظور افزایش بیان مارکرهای تنظیمی مانند IL-۱۰ و TGFβ و ترمیم بافتی. استفاده از پری‌بیوتیک‌ها برای افزایش سلول‌های T helper و T regulator در نتیجه افزایش IL-۱۰ و TGFβ (اثرات ضد التهابی).</p>	<p>*ویروکومی کروبیاسه*، *بیفیدوباکتریاسه*، *، *باکترئوئیدزها*، *دسولفوویبریون اسه*، *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس*، *لاکتوباسیلوس کریسپاتوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *بیفیدوباکتریوم انیمالیس زیرگونه لاکتیس*، *LMGS لاکتیس*.</p>	<p>کاهش در باکتری‌های *ویروکومی کروبیاسه* و *بیفیدوباکتری اسه*، افزایش در *باکترئوئیدزها * و خانواده *دسولفوویبری وناسه*.</p>	<p>میاستنی گراویس (MG)</p>
<p>(۲۰) (۲۱)</p>	<p>مطالعات نشان داده‌اند که تعامل بین پروتئین‌های سولفاتاز در برخی باکتری‌های کامنسال و الگوهای آنتی‌ژنی سلول‌های T و B در بیماران آرتریت روماتوئید نقش دارد. تغییرات در میکروبیوم روده می‌تواند علائم بیماری را تشدید کند، اما</p>	<p>استفاده از پروبیوتیک‌ها برای متعادل کردن تغییرات میکروبی و کاهش علائم بیماری. باسیلوس کوآگولانس (اثربخشی در موش‌ها نشان داده شده است).</p>	<p>باکتری‌های کامنسال (گونه‌های خاص نام برده نشده‌اند اما بر اساس متن، پروتئین‌های</p>	<p>تغییرات میکروبی که منجر به افزایش علائم بیماری می‌شود.</p>	<p>آرتریت روماتوئید</p>

	<p>پروبیوتیک‌ها می‌توانند این تغییرات را متعادل کنند. به عنوان مثال، باسیلوس کوآگولانس در موش‌های مبتلا به آرتریت روماتوئید بهبودی ایجاد کرده است. با این حال، گونه‌های باکتریایی خاص درگیر به طور دقیق در متن مشخص نشده‌اند.</p>		<p>سولفاتاز آنها نقش دارند).</p>		
--	---	--	----------------------------------	--	--

در جدول زیر پنج بیماری خود ایمنی از این نظر بررسی شده اند: در جدول زیر برخی عوامل موثر در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های خودایمنی و مکانیسم اثر آنها آورده شده است.

جدول ۱- خلاصه یافته های تحقیقات پیرامون ارتباط میکروبیوتای روده و بیماریهای خود ایمنی

جدول ۲- برخی عوامل موثر در ایجاد و پیشرفت بیماری‌های خودایمنی

منابع	جزئیات	مکانیسم اثر	عامل
<p>(۱۸, ۲۲), (۲۳, ۲۴)</p>	<p>SCFAs تولید شده توسط باکتری‌های روده مانند *پرووتلا هیستیکولا ، به عنوان منبع انرژی برای سلول‌های اپی‌تلیال روده عمل می‌کنند و نقش‌های تنظیمی در اپی‌ژنتیک دارند. آن‌ها می‌توانند با مهار هیستون داستیلاز، عملکرد سلول‌های T را تحت تاثیر قرار دهند، مهاجرت نوتروفیل‌ها را القا کنند، تولید موکوس را افزایش دهند، بیان Tight Junction را بهبود بخشند، تولید پپتیدهای ضد میکروبی را تحریک کنند، و التهاب مزمن را با کاهش TNFα، IL-۶ و IL-۱β سرکوب کنند. بوتیرات به طور خاص می‌تواند ترشح IL-۶ را کاهش دهد. همچنین، SCFAs با تقویت</p>	<p>تعدیل پاسخ ایمنی، اثر اپی ژنتیکی</p>	<p>اسیدهای چرب زنجیره کوتاه (SCFAs)</p>

	سلول های T تنظیمی Tregs، التهاب را کاهش می دهند و از طریق تنظیم بیان NF-κB، تمایز سلول های دندریتیک را مهار می کنند.		
[۲۵, ۲۴]	چاقی با ترشح سایتوکاین های التهابی TNF-α، IL-۶ و پروتئین های فاز حاد التهابی همراه است. افزایش لپتین، با اتصال به گیرنده های روی لنفوسیت های T تنظیمی، تکثیر آن ها را مهار می کند و احتمال ابتلا به بیماری های خودایمنی را افزایش می دهد.	التهاب مزمن، اختلال در عملکرد سلول های T تنظیمی	چاقی
(۲۶, ۲۴)	افزایش سن با تغییر در ترکیب میکروبیوتای روده همراه است، از جمله کاهش بیفیدوباکتری ها و فرمی کوت ها و افزایش باکتری های گرم منفی (مانند/نتروباکتریاسه ها). این تغییرات منجر به افزایش فاکتورهای التهابی و اختلال در تعادل سیستم ایمنی می شود. علاوه بر این، تغییرات فیزیولوژیک مرتبط با سن، مانند کاهش پرزهای روده، مشکلات دندانی و گوارشی، و تغییرات حسی، به دیس بیوز روده و نقص ایمنی کمک می کنند.	تغییر در میکروبیوتای روده، تغییرات فیزیولوژیک	افزایش سن
(۳۸, ۳۷)	تاثیر بر سد روده: ویتامین D با افزایش بیان پروتئین های تشکیل دهنده اتصالات محکم در سلول های اپیتلیال روده (E-cadherin, claudin-1, occludin, ZO-1) به استحکام سد روده و جلوگیری از نفوذپذیری آن کمک می کند. کمبود ویتامین D می تواند به آپوپتوز (مرگ سلولی برنامه ریزی شده) سلول های اپیتلیال روده منجر شود. منابع: دریافت نور خورشید، تغذیه مناسب و مکمل های ویتامین D.	ویتامین D از طریق گیرنده های خود (VDR) که در بسیاری از سلول های ایمنی بیان می شود، بر سیستم ایمنی تاثیر می گذارد. این تاثیر شامل تنظیم بیان ژن ها در سلول های ایمنی، جلوگیری از تمایز غیرطبیعی لنفوسیت های B و تعدیل پاسخ های التهابی است.	ویتامین D

	<p>انواع پروبیوتیک‌ها: متن به چند نمونه از پروبیوتیک‌ها مانند *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتریوم* و *استرپتوکوکوس* اشاره می‌کند. که در بهبود بیماری‌های خودایمنی و تقویت سیستم ایمنی موثر هستند. لازم به ذکر است که انواع مختلفی از پروبیوتیک‌ها وجود دارد و تاثیر هر کدام ممکن است متفاوت باشد.</p> <p>*مکمل‌های پروبیوتیک: مکمل‌های پروبیوتیک به صورت قرص و کپسول در دسترس هستند و می‌توانند به بهبود تعادل باکتریایی روده و تقویت سیستم ایمنی کمک کنند. اما همیشه قبل از مصرف هرگونه مکمل، با پزشک مشورت کنید.</p> <p>بلوغ سیستم ایمنی: میکروب‌های روده در هفته‌های اول زندگی نوزاد نقش اساسی در بلوغ سیستم ایمنی دارند. نقص‌هایی در سیستم ایمنی نوزادان در بدو تولد، با ورود میکروب‌ها به روده برطرف می‌شود. پروبیوتیک‌ها می‌توانند در این فرآیند کمک کنند.</p>	<p>پروبیوتیک‌ها با تعدیل سیستم ایمنی (ایمونومودولاسیون) باعث کاهش التهاب و تولید سایتوکاین‌های پیش التهابی می‌شوند. آنها همچنین می‌توانند میزان ایمونوگلوبولین‌ها را افزایش دهند و سد روده را تقویت کنند.</p> <p>تاثیرات بر سیستم ایمنی: پروبیوتیک‌ها بر سیستم ایمنی در سطوح مختلفی تاثیر می‌گذارند، از جمله افزایش تعداد گلبول‌های سفید، تقویت لنفوسیت‌های T، خنثی‌سازی سموم روده‌ای، فعال‌سازی ماکروفاژها و افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی.</p>	<p>پروبیوتیک‌ها</p>
--	--	---	---------------------

انتقال اثرات خودایمنی

با ژنوم فردی (که در برخی موارد تا ۱۰۰ برابر افزایش می‌یابد) موجب میشود که سیستم ایمنی آموزش ببیند تا پروتئین‌های انسانی را به عنوان تهدید تشخیص دهد. این تقلید مولکولی سیستم ایمنی را گیج میکند، چون شروع به واکنش در برابر باکتری کرده و نتیجه می‌گیرد که در برابر

در یک متآنالیز که توسط مارتین گریگر (ایمونولوژیست) بر روی ۳۶۶۵ نمونه انسانی انجام شد که بیش از ۲۲ میلیون ژن میکروبیوم را شناسایی کرد مشخص شد پروتئین‌های تولید شده توسط باکتری‌های روده بی‌خطر یا به راحتی قابل کنترل هستند ولی شباهت بین برخی از ژن‌های میکروبیوم

پریووتلا در مفاصل مبتلایان به آرتریت روماتوئید پیدا کردند. در مطالعه دیگر متابولیت های باکتریایی روده در لوزالمعده مبتلایان به دیابت نوع ۱ یافت شده است یا ممکن است متابولیت ها از طریق عصب واگ پیام را از روده به مسیر مغز فرستاده و منجر به نوعی بیماری خودایمنی عصبی شوند مانند MG. یا همسانی متابولیت های پپتیدی میکروبی در روده با برخی پروتئین های غلاف میلین می تواند منجر به بیماری MS شود (۱۷).

ها نشان داد که باکتری *انتروکوکوس گالیناروم* می تواند به طور خودبخود از روده به چند اندام دیگر از جمله کبد، طحال، گره های لنفاوی انتقال یابد. این باکتری موجب التهاب و تولید آنتی بادی های خاصی می شود که به فاکتورهای ترویج خودایمنی معروفند (۲۹). مشخص شده سرکوب رشد این باکتری ها با استفاده از آنتی بادی ها یا واکسن علائم خودایمنی را کاهش می دهد و درمان بالقوه ای برخی بیماری های خود ایمنی مانند بیماری کبدی، لوپوس، دیابت نوع ۱ است. به علاوه ترکیبی از سویه های کلاستریدیوم بر فعالیت سلول های Treg اثر مثبت دارد و تنظیم کننده سطح ایمونوگلوبولین هاست (۳۰). مطالعات نشان داده بین میکروبیوتای افرلد و سیستم ایمنی آن ها ارتباط دوطرفه وجود دارد و یکدیگر را تنظیم می کنند (۲۶).

تاثیرگذاری آن در پاسخ به واکسن های مختلف بیشتر است و ایمنی قابل ملاحظه ای در فرد صورت می گیرد. اگر فردی میکروبیوتای ناقصی داشته باشد، روده نشت پذیر و لایه مخاطی نازک باشد، پاسخ های ایمنی که علیه واکسن ها ایجاد

پروتئینهای خودی واکنش داده است (۲۸). مثلا در آرتریت روماتوئید پروتئین های باکتریایی به خصوص در *پریووتلا* بسیار شبیه پروتئین انسانی Ro ۶۰ است که در مفاصل وجود دارد. حال سوال اینجاست که چطور اثرات خودایمنی از روده به قسمت های دیگر بدن منتشرمی شود؟ مثلا در MS به سلول های عصبی یا در دیابت نوع ۱ به سلول های پانکراس. جوابی که یافتند این است که یا باکتری ها یا متابولیت ها و بقایای آن ها که توسط سیستم ایمنی حمل می شوند، می توانند به قسمت دیگر وارد شوند. مثلا شواهدی از DNA

میکروبیوتای روده و بیماری های خودایمنی

محققان دانشگاه بیل در آمریکا ارتباط بین باکتری های روده و ابتلا به برخی بیماری های خودایمنی را بررسی کرده اند. تغییر تعادل ترکیبات و یا عملکرد میکروبیوم که اغلب دیسبیوز (dysbiosis) نامیده می شود، با بیماری های خودایمنی و التهابی همراه است. میکروبیوم می تواند پاسخ های ایمنی سازشی و خودایمنی را ایجاد کند. نشان داده شده تعادل زیرگروه سلول های T helper و T regulator توسط گونه های میکروبی تحت تاثیر قرار گرفته است. این مفهوم که پاتوبیونت ها (میکروب های همزیستی که بالقوه پاتوژنیک هستند ولی به طور طبیعی پاتوژنیک نیستند) ممکن است باعث آغاز خودایمنی در بیماری های خودایمن سیستمیک گردند جدید نیست. مثلا میکروکوکوس روماتیکوس (که امروزه *استریپتوکوکوس پیوژنز* گفته می شود) را به عنوان عامل تب روماتیسمی در میزبان مستعد نشان می دهند. مطالعه آن

واکسن

در سال های اخیر تلاش شده برای برخی بیماری های خود ایمنی از جمله دیابت واکسن تهیه شود. وقتی فردی میکروبیوتا و لایه مخاطی سالم دارد عملکردهای سیستم ایمنی اش مناسب است. وقتی واکسن دریافت می کند

می شود (ایمونیزه شدن) در آن کامل نیست و ضعیف است. به همین منظور امروزه همراه با واکسن ها، باکتری های

بلوغ سیستم ایمنی نوزادان

گزارش های مربوط به پیوند مدفوع (FMT) (باکتریوتراپی) یا استفاده از قرص های پروبیوتیک این امید را به افراد مبتلا به بیماری های اتوایمیون می دهد که راهی آسان در پیشگیری از پیشرفت بیماری و یا درمان آنها می تواند باشد (۳۲). مثلا مداخله یک رژیم غذایی هدفمند می تواند جامعه میکروبی افراد مبتلا به MS را از باکتری های پیش التهابی به انواع ضد التهابی تغییر دهد (۳۳). میکروب ها در بلوغ سیستم ایمنی نوزادان نقش اساسی دارند. مطالعات Ng و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان می دهد تیمار پروبیوتیکی بلافاصله بعد از تولد در القاء تحمل ایمونولوژیکی در سنین بالا نقش اساسی دارد. نقص و ناهنجاری های مرتبط با روده، سلول های نابالغ B, T, کمبود CD۴ در کلیه اندام های لنفاوی، کمبود سلول های T helper و نیز آنتی بادی های IgG, IgA در بدو تولد

پروبیوتیک هم می دهند تا واکسن تأثیر بیشتر و ایمنی بهتری داشته باشد (۳۱).

همه این مشکلات ظرف چند هفته اول پس از ورود و دخالت میکروب ها برطرف می گردد (۳۴). مثلا ترکیبی از سویه های کلاستریدیا و باکتروئیدس فراگلیلیس که همزیست انسان است می تواند موجب افزایش سلول های T helper و CD۴ شود. دانشمندان طی ۲۰ سال گذشته مطالعات خود را معطوف به میکروبیوم روده کرده، می گویند امیدواریم دانش بهتر در مورد میکروبیوم روده، به ویژه در سه سال اول زندگی منجر به تداخلات پیشگیری از بسیاری از بیماری های خودایمنی می شود. مثلا دادن ترکیبات کاملا مشخص میکروبی به نوزادان تمرکز موجب رشد سیستم ایمنی و تحمل مطلوب نسبت به بدن خود آنان بدون از بین بردن توانایی مبارزه با عفونت ها می شود که روش درمانی تاثیرگذاری است که می تواند تاثیر جهانی داشته باشد (۳۵).

آسم و آلرژی

این تیم تحقیقاتی در مورد بیماری آسم نیز مطالعاتی داشته که نتیجه آن به این صورت است که کاهش تنوع در میکروبیوتای روده در اوایل زندگی به دنبال مصرف آنتی بیوتیک ها می تواند موجب افزایش بروز آسم و آلرژی شود. البته نوع و محل زایمان و تغذیه نوزاد نیز بر ترکیب میکروبی دستگاه گوارش اثر می گذارد. به علاوه مشخص شد در نوزادان مبتلا به آسم تعداد بیفیدوباکتریوم به شدت کمتر از باکتری های عادی است و اگر به هر روشی مانند مصرف پروبیوتیک ها بخصوص رژیم غذایی حاوی بیفیدوباکتریوم تعداد این باکتری ها را زیاد کنیم، می تواند میزان ابتلا را تا حدود زیادی

کاهش دهد (۳۶). در مورد نوزادان نارس جامعه میکروبی کاملا متفاوت است که وضعیت سلامت را تحت تاثیر قرار می دهد و احتمال ابتلا به عفونت ها بخصوص عفونت های تنفسی، بیماری های خودایمنی و آسم و آلرژی را افزایش می دهد. حال اگر غذای حاوی بیفیدوباکتریوم بیشتری بدهیم، احتمال اینکه این نوزاد در ادامه زندگی سالم تری داشته باشد بیشتر است. به علاوه اگر بتوانیم کاری کنیم که در بدن این نوزادان T helper۲ گسترش پیدا نکرده و به جای آن T helper۱ یا T regulator ایجاد شود، نتیجه افزایش این ها تولید IL-10, TGFβ است که آنتی اینفلامیتور هستند و التهاب را

سرکوب می کنند. پری بیوتیک ها این نقش را دارند. استفاده از پری بیوتیک ها در رژیم غذایی نوزادان می تواند مانع ابتلا به آسم و آلرژی تا حدود زیادی شود (۳۶).

ویتامین D و سیستم ایمنی

نشان داد، همراه با کاهش نسبت فیرمیکوت به باکترئوئید و کاهش فراوانی نسبی گونه های فکالی باکتریوم و خانواده رومینوکوکاسه بنابراین هنوز در مورد اثرات ویتامین D اختلاف نظر وجود دارد. مطالعات مختلف نشان می دهد که ویتامین D علاوه بر تاثیر بر متابولیسم استخوان، تکثیر و تمایز سلولی بر تنظیم و تعادل پاسخ های ایمنی هم موثر است. به این ترتیب که گیرنده ویتامین D (VDR) در طیف وسیعی از سلول های ایمنی از جمله لنفوسیت های B و T، ماکروفاژها و دندریت سل ها بیان می شود. فرم فعال ویتامین D باعث تنظیم بیان VDR در سلول های ایمنی و عدم تمایز لنفوسیت های B آلوده به ویروس می شود. بنابراین دریافت نور آفتاب، تغذیه مناسب و مصرف کافی ویتامین D نه فقط استخوان های قوی بلکه عملکرد بهینه سیستم ایمنی را در بردارد. مطالعات نشان داده بر هم کنش مقدار مناسب ویتامین D و VDR در افزایش بیان و تعدیل *E.cadherin*, *claudin1*, *occludin* و *ZO1* موثر است که در ایجاد اتصالات محکم و جلوگیری از نشت پذیری روده نقش بسزایی دارد. به علاوه در بررسی های سلول های اپیتلیال روده و روده بزرگ مشخص شده کمبود ویتامین D می تواند منجر به آپوپتوز سلول های اپیتلیال روده شود (۳۸).

مطالعات محققان دانشگاه کالیفرنیا سن دیگو نشان می دهد حالت فعال ویتامین D (نه پیش ماده آن) با تنوع باکتری های روده ارتباط دارد که بهبود وضعیت سلامت و جلوگیری از بسیاری از بیماری های خود ایمنی می شود. 7 دهیدرو کلاسترول توسط نور خورشید به کوله کلسیفرول 3D غیرفعال تبدیل می شود. سپس در کبد یک OH گرفته شده ، ۲۵ هیدروکسی کلسیفرول به وجود می آید. OH دوم در کلیه گرفته شده و ۲۵و۱ دی هیدروکسی کلسیفرول به وجود می آید که کلاسترول نامیده می شود و فرم فعال ویتامین D است. در این تحقیق که بر روی ۵۶۷ داوطلب انجام شد، مشخص شد در روده افرادی که مقادیر زیادی ویتامین D فعال دارند ، ۱۲ نوع باکتری بیش از سایرین وجود دارد و اغلب آن ها اسیدهای چرب مفیدی تولید می کنند که به حفظ سلامت مخاط روده کمک می کند (۳۷). افزایش سطح ویتامین D با فراوانی بیشتر باکتری از جنس کوپروکوکوس و فراوانی کمتر از جنس رومینوکوکوس ارتباط دارد. در نمونه برداری از دستگاه گوارش فوقانی افزایش فراوانی نسبی باکتری و کاهش پروتئوباکتریوم گزارش شده است (۳۸). یک مطالعه کوچک با بیست فرد سالم و کمبود ویتامین D افزایش قابل توجهی وابسته به دوز را در فراوانی نسبی باکترئوئیدها و آکرومانسیا

پروبیوتیک ها

التهابی را کم کرده و با تعدیل سیستم ایمنی خطر ابتلا به این بیماری ها را کاهش می دهند. سلول های ایمنی انواع سایتوکاین ها را ترشح می کنند مثل ۱، ۲و ۶، اینترفرون آلفا

تغذیه نقش اساسی در توسعه میکروبیوتا و سلامت افراد دارد. پروبیوتیک ها با تعدیل روی سیستم ایمنی (ایمونومودولیشن) میزان التهاب را کم و میزان تولید سایتوکاین های پیش

استحکام بخشد. پروبیوتیک ها در سطوح متعددی بر روی سیستم ایمنی تاثیر می گذارند از جمله: افزایش نسبت گلوبین ها و آلبومین ها، افزایش تعداد گلبول های سفید، ترغیب و افزایش مقاومت لنفوسیت های T، خنثی کردن سموم روده ای (آنتروتوکسین ها)، فعال کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول های کشنده طبیعی، تعدیل خودایمنی و تحریک ایمنی در برابر باکتری های بیماری زا و پرتوزوآها، جلوگیری از سرکوب تکثیر لنفوسیت ها و... (۳۹).

باکتریایی روده را به روشی تغییر دهد که قدرت دفاعی بدن افزایش پیدا کرده و سیستم ایمنی تقویت شود. تحقیقات نشان داده مصرف مکمل های حاوی لاکتوباسیلوس جیجی، لاکتوباسیلوس کریسپاتوس، لاکتوباسیلوس گاسری، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگسام سیستم ایمنی را تقویت کرده و بخصوص در بیماری های خودایمنی که با اختلال در تنفس و دفع ادرار رابطه دارند برای مثال MS و MG و دیابت بسیار موثر است. در یک پژوهش به تعدادی داوطلب بزرگسال مبتلا به MS ترکیبی از لاکتوباسیلوس گاسری، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و بیفیدوباکتریوم لانگسام و یا دارونما دادند. این افراد سه هفته این مکمل های پروبیوتیک را مصرف کردند و پس از مصرف مشخص شد که تعادل باکتریایی روده آن ها تغییر کرده و نشانگان ضدالتهابی افزایش یافته است (۴۰).

ها از جمله میکروبیوتای پوست، دهانی و تنفسی به صورت محدودتر انجام گرفته است. پوست به صورت یک اکوسیستم عمل می کند و اولین خط دفاعی در برابر ارگانیسم های

و گاما و IL-10, IL-12 که هر یک نقش خاصی در بدن دارد. سایتوکاین ۱ و ۶، IL-6 سایتوکاین های اینفلامیتوری هستند و التهاب ایجاد می کنند (۲۷). برخی سایتوکاین ها مثل IL-10 و IL-12 واکنش های التهابی را از بین برده و تعادل ایجاد می کنند و وجود آن ها در افراد اتوایمیون بسیار مهم است. این افراد واکنش های التهابی فوق العاده گسترده ای دارند که می تواند سلول ها را از بین ببرد. همچنین مصرف پروبیوتیک ها می توانند ایمنوگلوبین ها را up regulate کرده (یعنی میزان بیان آن ها را بالا ببرند)، سد روده را

مکمل های پروبیوتیک

جهت تقویت و ایجاد تعادل در سیستم ایمنی مصرف مکمل های زینک (روی)، ویتامین B6, C, D3, اسیدفولیک و... کمک کننده است. مکمل های پروبیوتیک در ایمنی انسان و تمام مهره داران و جلوگیری از پیشرفت بیماری های خودایمنی نقش دارد، به طوری که ۷۰٪ سیستم ایمنی بدن ما در روده قرار دارد و ایمنی خوب از سلامت روده شروع می شود (۳۹). این مکمل ها بیشتر به فرم های قرص و کپسول در بازار وجود دارند. مثالی از مکمل های پروبیوتیک در تقویت و ایجاد تعادل در سیستم ایمنی: قرص بیون ۳، کپسول کامفورتی فیکس، قرص مکیدی لاکتوگام و... پروبیوتیک های مختلفی در بهبود انواع بیماری های خودایمنی و بخصوص تقویت سیستم ایمنی به کار گرفته می شوند. برای مثال در IBS از مکمل پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و استرپتوکوکوس به نام V.S.L استفاده می شود که کاهنده نفخ است. مصرف مکمل های پروبیوتیک ممکن است تعادل

میکروبیوتای پوست

علاوه بر میکروبیوتای روده که اصلی ترین نقش را در پاسخ های ایمنی و جلوگیری از ایجاد یا پیشرفت بیماری های خودایمنی دارد، مطالعاتی بر روی میکروبیوتای سایر قسمت

۵SrRNA۲۸. ۸ فاکتور افزایش طول ۱ آلفا و دو زیر واحد RNA پلیمراز ۲ ترسیم شده است. اما اختلالات پوستی مانند تغییر در یک یا چند جزء میکروبیوتا می تواند ایجاد عفونت، زخم، خارش و خشکی و اختلالات دیگر کند مثلا در دیابت نوع ۱ انواعی از قارچ ها بر روی پوست رشد می کنند که موجب عفونت بالینی به خصوص در ناحیه پا می شود (۴۲). التهاب و عدم ترمیم پوست بخصوص در اثر اختلال در TLRها و ایمنی ذاتی ناشی از آن می تواند سیستم ایمنی را تضعیف کند که مطالعات نشان می دهد در پیشرفت بیماری های اتوایمیون به خصوص دیابت نوع ۱ و لوپوس موثر است (۴۳). پیری پوست هم بعد از سن ۷۰ سال و تغییر PH پوست می تواند در تضعیف سیستم ایمنی موثر باشد. استفاده از پروبیوتیک هایی حاوی لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می تواند در بهبودی میکروبیوتای پوست موثر باشد (۴۴).

تنفسی بخصوص از نوع ویروسی می تواند موجب تشدید بیماری های اتوایمیون شود. بنابراین کامنسال های ساکن ریه می توانند به عنوان پروبیوتیکی برای خنثی کردن کلونی سازی ریه توسط باکتری های بیماری زا استفاده شوند. با این حال برای اینکه به عنوان یک درمان بالقوه به کار گرفته شود نیازمند مطالعات بیشتر است (۲۶).

های اتوایمیون بخصوص در افراد مسن موثر است. پس توجه به سلامت دهان و دندان بخصوص در سنین بالا ضرورت دارد (۲۶و۲۷).

خارجی و مواد سمی است. میکروارگانیسم های سیمبیوتیک پوست که در برابر میکروارگانیسم های بیماری زا یا مضر ایجاد محافظت می کنند، به لنفوسیت های T در پاسخ به سویه های بیماری زا نیز کمک می کنند. به علاوه کراتینوسیت ها به طور پیوسته کلونی های میکروبیوتای پوست را از طریق گیرنده های TLR و مانوز رصد می کنند (۴۱). در رحم پوست جنین استریل است، اما میکروبیوتای آن بلافاصله بعد از تولد بسته به نوع زایمان شکل می گیرد. پس از آن نیز امل محیطی مثل لباس، محل زندگی، شغل، استفاده از آنتی بیوتیک ها، مواد آرایشی-بهداشتی و... از عوامل بالقوه تغییر میکروبیوتای پوست هستند. (کلا باکتری ها در چهار راسته باکتریایی پروتئوباکترها، فرمیکوت ها، باکتریوئیدها، اکتینوباکترها قرار دارند که توسط آنالیز SrRNA ۱۶ شناسایی شده اند. تنوع باکتری ها در مناطق چرب کمتر است. فیلوژنی ارگانیسم های قارچی هم توسط SrRNA ۱۸ - SrRNA

میکروبیوتای تنفسی

در مورد فلور تنفسی نیز باید گفت تحقیقات دانشگاه ژنو نشان داده مقدار قابل توجهی از باکتری های لاکتوباسیلوس بخصوص لاکتوباسیلوس مورینوس به عنوان عامل ضد میکروبی و تعدیل کننده سیستم ایمنی در میکروبیوتای ریه موش های سالم وجود دارد که می تواند مانعی در برابر پنومونی، ذات الریه، عفونت های تنفسی ویروسی مانند کرونا و آنفلوآنزای نوع A باشد. مطالعات نشان داده عفونت های

میکروبیوتای دهان

مطالعات محققان ژاپنی نیز بیان می کند میکروبیوتای دهان و دندان و بخصوص زبان که نقش مهمی در تمامی جنبه های سلامت بدن انسان دارد، رابطه مستقیم با انواع عفونت های تنفسی و نیز ناراحتی های قلبی دارد که در تشدید بیماری

پروژه میکروبیوم انسانی

رو به افزایش است و در آینده گزینه های درمانی بسیاری از بیماری ها به مداخلات مبنی بر میکروبیوم متکی است. لازم به ذکر است که ترکیب میکروبی جمعیت کشورها با هم متفاوت است به طوری که ۹۹٪ ژنوم انسان بین افراد مشابه ولی کمتر از ۲۰٪ ژنوم میکروبیایی مشابه است. این مورد می تواند یکی از دلایل این موضوع باشد که برخی بیماری های خود ایمنی در برخی جمعیت ها شایع تر یا کمتر است. در سال ۲۰۰۷ پروژه میکروبیوم انسانی برای درک رابطه بین تغییرات میکروبی و بیماری های مختلف در دو مرحله انجام شد (۶).

هم اکنون محققان شرکت IBM و موسسه Broad هاروارد در MIT و ماساچوست و محققان دانشگاه کالیفرنیا در حال همکاری جهت تهیه نقشه ۳ میلیون ژن باکتریایی هستند که در روده انسان ساکن است تا درک بهتری از نقش میکروبیوم در بیماری ها مخصوصا بیماری های خود ایمنی مانند دیابت نوع ۱، MS، MG، لوپوس و ... دهد. آن ها برای این منظور از نمونه DNA ۱۰ هزار داوطلب استفاده کردند. به این ترتیب پیشرفت های مهمی در فهم ما از ایمونوپاتوژنز بیماری های خودایمنی پنجره ای به روی تعاملات میزبان- میکروبیوم و پاتوبیونت های مسئول گشوده شد. تحقیقات حوزه میکروبیوتا

برای مطالعه ی سریع تر موضوعات ذکر شده ، جدول زیر تدوین شده است:

جدول ۳- خلاصه اطلاعات متن ارائه شده در مورد میکروبیوتای بدن

نواحی مختلف بدن انسان	میکروبیوتا	نقش	عوامل موثر بر تغییر	ارتباط با بیماری ها	مطالعات و یافته ها
پوست	باکتری ها (پروتئوباکترها، فرمی کوت ها، باکتریوئیدها، اکتینوباکترها) و قارچ ها	اولین خط دفاعی؛ محافظت در برابر پاتوژن ها؛ کمک به لنفوسیت های T؛ نظارت بر کلونی های میکروبی توسط کراتینوسیت ها	نوع زایمان، لباس، محل زندگی، شغل، آنتی بیوتیک ها، مواد آرایشی- بهداشتی، سن (بعد از ۷۰ سالگی)	عفونت، زخم، خارش، خشکی، دیابت نوع ۱ (عفونت قارچی در پا)	اختلال در میکروبیوتا منجر به التهاب، عدم ترمیم پوست و تضعیف سیستم ایمنی می شود که در پیشرفت بیماری های خودایمنی موثر است. استفاده از پروبیوتیک ها (لاکتوباسیلوس و

بیفیدوباکتریوم) می تواند موثر باشد					
کومنسال های ریه می توانند به عنوان پروبیوتیک برای خنثی کردن کلونی سازی ریه توسط باکتری های بیماری زا استفاده شوند (نیازمند مطالعات بیشتر)	تشدید بیماری های خودایمنی	عفونت های تنفسی (ویروسی)	عامل ضد میکروبی؛ تعدیل کننده سیستم ایمنی؛ حفاظت در برابر پنومونی، ذات الریه، عفونت های تنفسی ویروسی	لاکتوباسیلوس مورینوس (و سایر باکتری ها)	تنفسی (ریه)
سلامت دهان و دندان، بخصوص در سنین بالا، اهمیت دارد	عفونت های تنفسی؛ ناراحتی های قلبی؛ تشدید بیماری های خودایمنی (به خصوص در افراد مسن)	سن	نقش مهم در سلامت بدن	میکروبیوتای متنوع	دهان (زبان)
پروژه میکروبیوم انسانی در حال تهیه نقشه ژنوم باکتریایی روده برای درک بهتر نقش میکروبیوم در بیماری ها است. ترکیب میکروبی جمعیت های مختلف متفاوت است	دیابت نوع ۱، MG، MS، لوپوس و سایر بیماری های خودایمنی	اطلاعاتی در مورد عوامل موثر بر تغییر در این بخش ارائه نشده است	نقش اصلی در پاسخ های ایمنی و جلوگیری از ایجاد یا پیشرفت بیماری های خودایمنی	میکروبیوتای متنوع (۳ میلیون ژن باکتریایی)	روده (مطالعه کلی)

نتیجه گیری

است میکروبیوم آن با گذشت زمان، با محیط زیست، با درمان دارویی و... نوسان می یابد. صرف نظر از موانع، مطالعات مربوط به میکروبیوتا و میکروبیوم چشم اندازه های جدیدی در مورد

مطالعات مرتبط با میکروبیوم در حال حاضر در حال انجام است ولی به احتمال زیاد تحت تاثیر نقاط ضعف مرتبط با مطالعات ژنومی قرار می گیرد. چون ژنوم فرد با اینکه ثابت

بیوتیک ها و یا داروهای خاص (۴۵). بررسی های اخیر در ایران نیز در تلاش برای شناخت جمعیت میکروبیایی این کشور است.

بیماری های خودایمنی باز می کند (۹). ممکن است ارتباط بین همزیست های خاص و برخی اختلالات خودایمنی وجود داشته باشد که شناسایی آنها رویکردهای جدیدی در پیشگیری یا درمان بدهد برای مثال تجویز پروبیوتیک ها، پری

Reference

1. Vojdani A. A potential link between environmental triggers and autoimmunity. *Autoimmun Dis* 2014; 2014:1.
2. Andréasson K, Alrawi Z, Persson A, Jönsson G, Marsal J. Intestinal dysbiosis is common in systemic sclerosis and associated with gastrointestinal and extraintestinal features of disease. *Arthritis Res Ther*. 2016; 18:278.
3. Berrih-Aknin, S. 2014. Myasthenia gravis: paradox versus paradigm in autoimmunity. *J. Autoimmun*. 52: 1–28.
4. Ochoa-Reparaz, D.W. Mielcarz, L.E. Ditrio, A.R. Burroughs, D.M. Foureau, S. Haque-Begum, L.H. Kasper, Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol*, 183.2009; 6041-6050.
5. B. Westrom, A novel probiotic mixture exerts a therapeutic effect on experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by IL-10 producing regulatory T cells, *PLoS One*, 5. 2010; e9009.
6. Maier, R.C. Anderson, N.C. Roy, Understanding how commensal obligate anaerobic bacteria regulate immune functions in the large intestine, *Nutrients*, 7 .2014; 45-73.
7. Austin M, Mellow M, Tiemey WM. Fecal microbiota transplantation in the *Clostridium difficile* Infections. *The American Journal of medicine*. 2014; 127(6):479-83.
8. A.G. Wexler, A.L. Goodman, An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome, *Nat Microbiol*, 2.2017; 17026.
9. T.A. Tucker, M.D. Schrenzel, R. Knight, J.I. Gordon, Evolution of mammals and their gut microbes, *Science*, 320. 2008; 1647-1651.
10. Pineda Mde, S.F. Thompson, K. Summers, F. de Leon, J. Pope, G. Reid, A randomized, doubleblinded, placebo-controlled pilot study of probiotics in active

- rheumatoid arthritis, *Med Sci Monit*, 17.2011; CR347354.
11. Giannakopoulos B, Krilis SA. The pathogenesis of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2013; 368:1033–44.
 12. Blank M, Krause I, Fridkin M et al. Bacterial induction of autoantibodies to beta2-glycoprotein-I accounts for the infectious etiology of antiphospholipid syndrome. *Clin Invest* 2002; 109:797–804.
 13. Neuman H, Koren O. The gut microbiota: a possible factor influencing systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 2017; 29:374–7.
 14. Haitao Zhang, Zhengzhao Liu, Minlin Zhou, Zhangsuo Liu, Jianghua Chen, Changying Xing, Hongli Lin, Zhaohui Ni, Ping Fu, Fuyou Liu, Nan Chen, Yongcheng He, Jianshe Liu, Caihong Zeng and Zhihong Liu *JASN* December .2017; 28 (12) 3671-3678.
 15. G. Silverman, D. Azzouz , A. Alekseyenko, Systemic Lupus Erythematosus and dysbiosis in the microbiome:cause or effect or both?, *Immunol*; 2019 Dec;61:80-85.
 16. T, Nowak A, Torres M,Campbell J: Bacteriotherapy in chronic fatigue syndrome(CFS). *American Journal of Gasterenterology*. 2012; 10013-1917 USA.
 17. Rsati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurological sciences*. 2001.; 22(2):117-03
 18. Gradolatto, A., D. Nazzal, F. Truffault, et al. 2014. Both Treg cells and Tconv cells are defective in the myasthenia gravis thymus: roles of IL-17 and TNF-. *J. Autoimmun*. 52: 53–63.
 19. Dalakas, M.C. 2013. Novel future therapeutic options in myasthenia gravis. *Autoimmun. Rev.* 12: 936941.
 20. V. Malmstrom, A.I. Catrina, L. Klareskog, The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting, *Nature Reviews Immunology*, 17.2017; 60-75.
 21. K. Abhari, S.S. Shekarforoush, S. Hosseinzadeh, S. Nazifi, J. Sajedianfard, M.H. Eskandari, The effects of orally administered *Bacillus coagulans* and inulin on prevention and progression of rheumatoid arthritis in rats, *Food Nutr Res*, 60.2016; 30876.
 22. C.H. Kim, J. Park, M. Kim, Gut microbiota-derived short-chain Fatty acids, T cells, and

- inflammation, *Immune Netw*, 14. 2014; 277-288.
23. T.L. Miller, M.J. Wolin, Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora, *Appl Environ Microbiol*, 62 .1996; 1589-1592.
24. W.S. Chung, A.W. Walker, P. Louis, J. Parkhill, J. Vermeiren, D. Bosscher, S.H. Duncan, H.J. Flint, Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level, *BMC Biol*, 14.2016;
25. P.D. Cani, W.M. de Vos, Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*, *Front Microbiol*, 8 ,2017; 1765.
26. Belkaid Y, Hand T. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014; 157:121–41.
27. M.C. Collado, M. Derrien, E. Isolauri, Intestinal integrity and *Akkermansia muciniphila*, a mucin-degrading member of the intestinal microbiota present in infants, adults, and the elderly, *Appl Environ Microb*, 73 .2007; 7767-7770.
28. M. Greger, What's Your Gut Microbiome Enterotype?, *Nutrition Facts*.5 (2019) e73.C. Allaband, D. McDonald, Y. Vazquez-Baeza, J.J. Minich, A. Tripathi, D.A. Brenner, R. Loomba, L. Smarr, W.J. Sandborn, B. Schnabl, P. Dorrestein, A. Zarrinpar, R. Knight, *Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians*, *Clin Gastroenterol Hepatol*, (2018).
29. N. Kamada, S.U. Seo, G.Y. Chen, G. Nunez, Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease, *Nat Rev Immunol*, 13. 2013; 321-335.Siegrist CA. Neonatal and early life vaccinology .
30. *Vaccine* 2001; 19:3331–46.
31. Pimer E. Fecal microbiota transplantation: effectiveness, complexities and lingering concerns. *Mucosal immunology*. 2014; 7(2):210-4.
32. Harkonen, L. Orivuori, S. Hakala, G.W. Welling, H.J. Harmsen, O. Vaarala, Fecal microbiota composition differs between children with beta-cell autoimmunity and those without, *Diabetes*, 62.2013; 1238-1244.
33. Ng K., Ferreyra J., Higginbottom S., Lynch J., Kashyap P., Gopinath S., et al. Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of

- enteric pathogens. *Nature* 2013; 502: 96–99.
34. M. Murri, I. Leiva, J.M. Gomez-Zumaquero, F.J. Tinahones, F. Cardona, F. Soriguer, M.I. QueipoOrtuno, Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a casecontrol study, *BMC Med*, 11.2013; 46.
35. M.C. de Goffau, S. Fuentes, B. van den Bogert, H. Honkanen, W.M. de Vos, G.W. Welling, H. Hyoty, H.J. Harmsen, Aberrant gut microbiota composition at the onset of type 1 diabetes in young children, *Diabetologia*, 57. 2014; 1569-1577.
36. CM, Cantorna MT, DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys* 2000; 374:334-338.
37. D., Vitamin D and Immune Function. TOUCH BRIEFINGS. 2009.
38. J. Suez, N. Zmora, G. Zilberman-Schapira, U. Mor, M. Dori-Bachash, S. Bashiardes, M. Zur, D. RegevLehavi, R. Ben-Zeev Brik, S. Federici, M. Horn, Y. Cohen, A.E. Moor, D. Zeevi, T. Korem, E. Kotler, A.
39. Harmelin, S. Itzkovitz, N. Maharshak, O. Shibolet, M. Pevsner-Fischer, H. Shapiro, I. Sharon, Z. Halpern, E. Segal, E. Elinav, Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT, *Cell*, 174. 2018; 1406-1423 e1416.
40. P.A. Bron, M. Kleerebezem, R.J. Brummer, P.D. Cani, A. Mercenier, T.T. MacDonald, C.L. GarciaRodenas, J.M. Wells, Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function?, *Br J Nutr*, 117, 2017; 93-107.
41. Arron ST, Dimon MT, Li Z et al. High *Rhodotorula* sequences in skin transcriptome of patients with diffuse systemic sclerosis. *J Invest Dermatol*. 2014; 134:2138–45.
42. C.J. Qi, Q. Zhang, M. Yu, J.P. Xu, J. Zheng, T. Wang, X.H. Xiao, Imbalance of Fecal Microbiota at Newly Diagnosed Type 1 Diabetes in Chinese Children, *Chin Med J (Engl)*, 129.2016; 1298-1304.
43. L. Wen, R.E. Ley, P.Y. Volchkov, P.B. Stranges, L. Avanesyan, A.C. Stonebraker, C. Hu, F.S. Wong, G.L. Szot, J.A. Bluestone, J.I. Gordon, A.V. Chervonsky, Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1

- diabetes, Nature, 455.2008; 1109-1113.
44. N. Arpaia, C. Campbell, X. Fan, S. Dikiy, J. van der Veecken, P. deRoos, H. Liu, J.R. Cross, K. Pfeffer, P.J. Coffey, A.Y. Rudensky, Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory Tcell generation, Nature, 504.2013; 451-455.
45. Van der Meulen TA, Harmsen HJM, Bootsma H, Spijkervet FKL, Kroese FGM, Vissink A. The microbiome–systemic diseases connection. Oral Dis 2016; 22:71