شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک جداشده از غذای سنتی ترخینه و دوغ ترخینه بر اساس توالی ۱۶S rDNA

فرزانه تفویضی[a]*، مریم تاج آبادی ابراهیمی[b]، لیلا خجاره[c]

[a] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد پرند، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
[b] استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، تهران، ایران
[c] کارشناس ارشد ژنتیک، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۱/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۵/۱۶

چکیده

مقدمه: سوپ ترخینه یکی از غذاهای محلی ناحیه غرب ایران می باشد که از قدیم الایام کاربرد دارویی و درمانی داشته و در درمان سرماخوردگی مورد استفاده قرار می‌گرفته است. تحقیقات نشان داده است که ترخینه و دوغ ترخینه منبع غنی از باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشند. لذا به دلیل ابهام آمیز بودن تست‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی باکتری‌ها، استفاده از روش‌های مولکولی جهت شناسایی و بررسی فیلوژنتیکی باکتری‌های موجود در ترخینه و بکارگیری آن‌ها در صنایع غذایی، امری بسیار ضروری است.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های جداسازی شده از دو منبع مذکور براساس روش توالی یابی ناحیه ۱۶S rDNA صورت گرفت. در بین باکتری‌های جدا شده چهار سویه T20، T22، TD4 و TD10 با توانایی تولید باکتریوسین قوی تر نسبت به سایر نمونه‌ها جهت توالی‌یابی انتخاب شدند، بدین منظور پس از رشد باکتری‌ها در محیط اختصاصی MRS، استخراج DNA از ایزوله‌های مورد نظر توسط هضم لیزوزیمی صورت گرفت. تکثیر ناحیه ۱۶S rDNA توسط پرایمرهای اختصاصی انجام پذیرفت و به دنبال آن توالی یابی ناحیه مذکور انجام شد.

یافته‌ها: با مقایسه توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI، تشابه ۹۹٪ با لاکتوباسیلوس کازئی حاصل شد. چهار سویه فوق تحت عنوان سوش‌های جدیدی از لاکتوباسیلوس کازئی در GenBank ثبت شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به پتانسیل بالای پروبیوتیکی ترخینه، کاربردی شدن این باکتری‌های پروبیوتیک در صنایع غذایی می‌تواند اثرات مفیدی در بهبود و کیفیت مصارف غذایی داشته باشند.

واژه های کلیدی: *ترخینه، توالی یابی، لاکتوباسیل، ۱۶S rRNA*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: tafvizi@piau.ac.ir

jftn.srbiau.ac.ir

مقدمه

لاکتوباسیل‌ها نقش مهمی در صنایع غذایی ایفا می‌کنند. چرا که می‌توانند سبب بهبود و تغییر طعم غذا شده و مانع از رشد باکتری‌های مسموم کننده گردند. البته همه لاکتوباسیل‌ها مفید نیستند، بعضی از آن ها در ایجاد مسمومیت غذایی دخالت دارند و حتی ممکن است پاتوژن باشند. بنابراین وجود سیستم طبقه بندی برای آن‌ها و توسعه روش‌های شناسایی سریع و قابل اعتماد امری ضروری است. بررسی فیلوژنی نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، باکتری‌های گرم مثبت با میزان G+C پائینی هستند. شناسایی مرسوم فنوتیپی لاکتوباسیل‌ها، وقت گیر و خسته کننده بوده و همیشه قابل اعتماد نیست. به علاوه گونه‌های مشخصی وجود دارند که قابل شناسایی بر اساس صفات فنوتیپی نیستند. از طرفی پاسخ‌های فنوتیپی تحت تاثیر شرایط محیطی قرار می‌گیرند، بنابراین بایستی از روش‌های شناسایی پایدارتر و قابل اعتمادتر استفاده کرد. روش‌های مولکولی از جمله شناسایی نواحی ۱۶S rRNA، ۲۳S rRNA و نواحی بین ژنی ۱۶S rRNA و ۲۳S rRNA جهت شناسایی اختصاصی لاکتوباسیل‌ها به کار می‌روند. دانش امروزی در مورد ارتباط فیلوژنی باکتری‌ها بر اساس بررسی مقایسه ای توالی های ۱۶S rRNA می‌باشد (Woses *et al*., 1987).

درخت‌های فیلوژنی حاصل از آنالیز مقایسه توالی‌های ماکرومولکول‌های حفاظت شده دیگر مانند ۲۳S rRNA، فاکتور طویل شدن Tu و زیر واحد β آنزیم ATPase با نتایج حاصل از ۱۶S rRNA مطابقت دارند. از آنجا که درخت های فیلوژنی مشابهی از بررسی مولکول‌های نسبتا متفاوتی از نظر عملکردی مثل rRNA و ATPase حاصل شده است، می‌توان نتیجه گیری کرد که کلاستر ۱۶S rRNA حاصل، منعکس کننده فیلوژنی باکتری است نه تاریخچه ژنی (Schleifer *et al*., 1995).

با پیشرفت تکنیک‌های مولکولی، در طبقه‌بندی باکتری‌ها نیز تغییرات چشمگیری رخ داده است. انگیزه اصلی در ایجاد این تغییرات، ناشی از ماهیت و ویژگی توالی‌های rRNA به عنوان یک کرنومتر مولکولی است (Woses *et al*., 1987). بخش هایی از مولکول ۱۶S rRNA در بین گونه‌های باکتریایی حفاظت شده است و می‌تواند جهت مقایسه و تطبیق همردیفی[1] ایزوله‌های مختلف به کار رود. مقایسه نواحی حفاظت شده، امکان مقایسه مابقی نواحی (شکل ۱، V1 تا V9) را که در بین بسیاری از گونه‌ها متفاوت می‌باشد، فراهم می‌آورد (Collins *et al*., 1991; Stackebrandt *et al*., 1995; Vandamme *et al*., 1996).

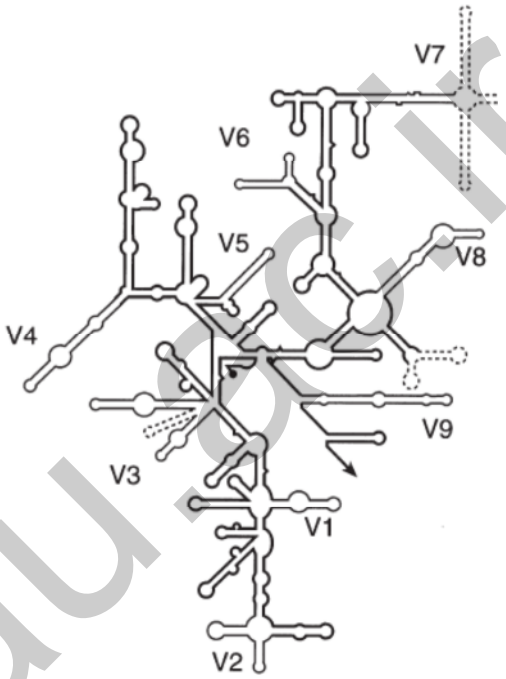
از نقطه نظر عملی، توالی‌های ژن ۱۶S rDNA، به عنوان یک روش قابل اطمینان در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط روش‌های مبنی بر PCR و یا پراب‌های ویژه نوکلئوتیدی می‌تواند بکار گرفته شود (Langendijk *et al*., 1995; Wang *et al*., 1996; Welling *et al*., 1997; Lick, 2003; Caufield *et al*. 2007; Dimtonova *et al*., 2008).

ترخینه و دوغ ترخینه از غذاهای سنتی کرمانشاه می‌باشند که در فصل سرما مورد استفاده قرار می‌گیرند و در درمان سرماخوردگی مؤثر واقع می‌شود. تاج آبادی ابراهیمی و همکاران در سال ۲۰۱۱، باکتری‌های اسید لاکتیک ترخینه را جداسازی و خالص نمودند. در بررسی مذکور از محصول ترخینه ۲۶ و از دوغ ترخینه ۱۶ سویه لاکتوباسیل جدا شد. این ایزوله‌ها به ترتیب (T1-T26) و (TD1-TD16) نامگذاری شدند. پس از تعیین مقاومت شرایط اسیدی و املاح صفراوی و توانایی اتصال به لاین سلولی Caco-2، توانایی مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا با روش‌های دولایه و حفره‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت. امکان کلونیزاسیون ایزوله‌ها در سیستم گوارشی با آزمون‌های مقاومت شرایط اسیدی و املاح صفراوی و توانایی اتصال به لاین سلولی تایید شد. اگر چه ایزوله‌های T20، و T22، TD4 و TD10 بالاترین درصد مهار رشد باکتری‌های بیماریزا (استافیلاکوکوس آرئوس، اشرشیا کلی و لیستریا منوسیتوژنز) را نشان دادند (Tajabadi Ebrahimi *et al*., 2011a,b). بنابراین هدف از این تحقیق، شناسایی مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک T20، و T22، TD4 و TD10 جدا شده از غذای محلی ترخینه و دوغ ترخینه از طریق توالی‌یابی ناحیه ۱۶S rDNA می‌باشد.

[1] Alignment

jftn.srbiau.ac.ir

به نظر می‌رسد این ویژگی در ارتباط با وجود باکتری‌هایی با خاصیت پروبیوتیکی می‌باشد. بنابراین هدف از این تحقیق، شناسایی مولکولی باکتری‌های پروبیوتیک جدا شده از غذای محلی ترخینه و دوغ ترخینه از طریق توالی‌یابی ناحیه ۱۶S rDNA می‌باشد.



شکل ۱- مدلی از ساختار دوم ۱٦S rRNA پروکاریوت‌ها
نواحی که دارای بیشترین توالی باز نوکلئوتیدی متغیر می‌باشد بین نواحی V1-V9 مشخص شده است.

مواد و روش ها

- باکتری‌ها، محیط کشت و شرایط کشت

باکتری‌های T20، T22، TD4 و TD10 جدا شده از ترخینه و دوغ ترخینه، پس از بررسی تست‌های بیوشیمیایی جهت تایید و غربال نمودن وجود لاکتوباسیل‌ها، تایید ظرفیت پروبیوتیکی و با توانایی تولید باکتریوسین قوی‌تر نسبت به سایر نمونه‌ها که در تحقیق قبلی توسط تاج آبادی به اثبات رسید (Tajabadi Ebrahimi *et al*., 2011 a, b)، جهت شناسایی توسط روش مولکولی در این مطالعه انتخاب شدند. باکتری‌های جدا شده، بر روی محیط کشت انتخابی MRS (Man ROGOSA and SHARP) کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد دی اکسید کربن گرمخانه‌گذاری شدند.

- استخراج DNA

استخراج DNA از ایزوله‌های مذکور با استفاده از هضم آنزیمی لیزوزیم و با اندکی تغییرات در روش Araújo مورد استفاده قرارگرفت (Araújo *et al*., 2004). از کشت ۲۴ ساعته جهت استخراج DNA استفاده شد. ۲ml از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به میکروتیوپ‌های ۲ میلی لیتری انتقال یافتند و در rpm ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب‌ها ۳ بار با بافر TEN (EDTA 100mM، NaCl 150mM، Tris Hcl 100Mm) و هر بار در rpm ۳۰۰۰ بمدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. به رسوب‌های حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEN و mg/ml ۴ لیزوزیم اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دو دسیل سولفات اضافه گردید و سپس انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار با pH ۵/۲ روی یخ به نمونه‌ها اضافه شد، نمونه ها ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ انجام شد. مایع رویی جدا شد و برای خالص سازی DNA از پروتئین‌ها از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۴:۲۵:۱ استفاده شد. در مرحله رسوب دهی DNA ایزوپروپانول سرد مورد استفاده قرار گرفت، در مرحلهٔ آخر برای شستشو، اتانول بکار برده شد. رسوب‌های DNA در دمای آزمایشگاه خشک شدند. رسوب‌های حاصله در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد.

- تکثیر ناحیه ۱٦S rDNA و توالی یابی

جهت تکثیر ناحیه ۱۶S rDNA از پرایمرهای دیجنریت[1] 616V, 630R تهیه شده از شرکت تکاپو زیست که توالی آن‌ها در ذیل قید شده است، استفاده شد (Ehrmann *et al*., 2003).

616V, 5-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3;
630R, 5-CAKAAAGGAGGTGATCC-3.

[1] Degenerate

jfn.srbiau.ac.ir

واکنش PCR متشکل از ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲.۵ میکرولیتر از Buffer PCR 1x که شامل (10 mM Tris Hcl PH8.8, 250 mM kcl)، dNTP 200 µM و 0.4 µM آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه (Corbet, Australia) Palmcycler Gp-001 انجام شد. دناتوره شدن DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل به شرح زیر انجام شد: دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دناتوره شدن نهایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی به مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکار سازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TBE 0.5 x (0.5 mM EDTA, pH 8.0, 44.5 mM Tris/Borate) استفاده شد. ژل با رنگ Rima Sight DNA Stain رنگ‌آمیزی شد و شناسایی محصول PCR با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت (Sambrook *et al*., 2001). از مارکر 100bp (Gene Ruler, fermentas) به عنوان مارکر مولکولی استفاده شد (شکل ۲). پس از خالص سازی محصول PCR (تقریبا ۱۵۰۰ bp)، توالی یابی هر دو رشته توسط پرایمرهای 616V و 630R بکار رفته در واکنش PCR، به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت Bioneer کره جنوبی انجام گردید.

- بررسی فیلوژنی

نتیجه خوانش توالی های حاصل از دو زنجیره، جهت شناسایی Chimeric Artifact، توسط نرم افزار Vector NTI 11 مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، توالی کامل ناحیه ژنی ۱۶S rDNA برای هر ایزوله حاصل شد. برای شناسایی توالی‌های ۱۶S rDNA ایزوله‌های مورد مطالعه، از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده شد. همردیفی یا تطبیق تمامی توالی‌های ۱۶S rDNA توسط Clustal W، انجام شد. درخت فیلوژنی با استفاده از روش Neighbor - joining و عدد bootstrap محاسبه شده با 1000 Replication، توسط نرم افزار MEGA4 رسم شد (Tamura *et al*., 2007). از *Escherchia coli* (NC 012947.1) به عنوان outgroup استفاده شد.

- توالی های باکتری های رفرانس بکار رفته در بررسی فیلوژنی

توالی ژن‌های ۱۶S rRNA باکتری‌های رفرانس بکار رفته در بررسی‌های فیلوژنی پس از جستجو در Blastn بر مبنای حداکثر همردیفی با توالی‌های مورد مطالعه (۹۹٪) در تحقیق حاضر انتخاب شده و در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱- توالی‌های مرجع مورد استفاده جهت Align نمودن ایزوله‌ها

Reference Sequences	Accession Numbers
Lactobacillus casei strain Shirota	AB 531131.1
Lactobacillus casei strain YIT 0209	AB 008205.1
Lactobacillus casei strain YIT 0180	AB 008204.1
Lactobacillus casei	D 865117.1
Lactobacillus paracasei	DQ 99664.1
Lactobacillus paracasei strain SM20	AJ 441105.1

یافته ها

از بین بیست ایزوله جدا شده از منبع غذای محلی ترخینه و دوغ ترخینه، دو باکتری T20 و T22 جدا شده از ترخینه، TD4 و TD10 جدا شده از دوغ ترخینه با پتانسیل پروبیوتیکی و با قابلیت تولید باکتریوسین قوی‌تر نسبت به بقیه نمونه‌ها که در تحقیق قبلی جداشده بودند (Tajabadi Ebrahimi *et al*., 2011 a, b)، جهت شناسایی مولکولی با روش توالی‌یابی در این مطالعه انتخاب شدند. شکل ۲ نشان دهنده قطعات تکثیر شده (در حدود ۱۵۰۰bp) ژن ۱۶S rDNA با پرایمر های اختصاصی بر روی ژل آگارز می باشد. بر طبق آنالیزهای فیلوژنی پیشنهاد

ifn.srbiau.ac.ir

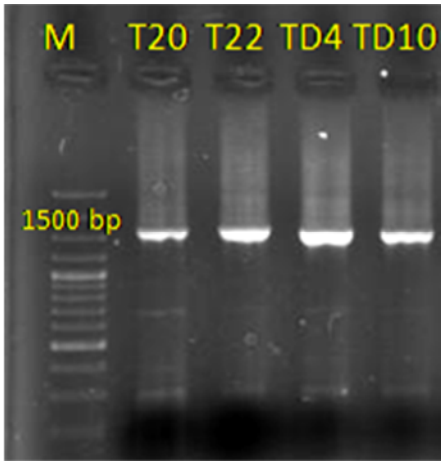
می‌شود کـه بـاکتری‌هـایی بـا ۹۷٪< تشـابه در تـوالی ژن ۱۶S rRNA متعلق به همان گونه می‌باشـند (Schloss and Handelsman, 2005). پس از انجام تـوالی‌یـابی، مقایسه همردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجـام شـد و بیشترین تشابه بـا باسـیلوس کـازئی (۹۹٪)، بـرای تمـامی ایزوله‌ها حاصل گردید که نتایج آن بطور خلاصه در جـدول ۲ نمایش داده شده است (برای مثال برای هـر ایزولـه سـه باکتری با درصد تشابه بـالا در جـدول ارائـه شـده اسـت). بنابراین با میزان تشـابه بدسـت آمـده حاصـل از Blastn، ایزوله های مورد مطالعه متعلق به گروه لاکتوباسیل کـازئی بودند. بررسی‌های فیلـوژنی و میـزان تشـابه حاصـل شـده، حاکی از شناسایی چهار سوش جدیـد باسـیلوس کـازئی در منبع ترخینه و دوغ ترخینه مـی باشـد. تـوالی سـوش‌هـای مذکور با شماره دسـتیابی‌هـای *Lactobacillus casei* strain T20 (JQ412730)، *Lactobacillus casei* strain T22 (JQ412731)، *Lactobacillus casei* strain TD4 (JQ412732)، strain TD10 (JQ412734) در پایگـاه اطلاعـاتی GenBank ثبت شدند.

بحث

یکی از ابزارهای مرسوم جهت طبقـه‌بنـدی فیلوژنیـک باکتری‌ها، شناسایی صـفات مورفولـوژیکی و ویژگـی‌هـای فنوتیپی است. از جمله محدودیت‌های الگوهای فنوتیپی این است که دو یا چند ارگانیزم ممکن است از نظر ظـاهری یـا صفات بیوشیمیایی مشابه یکدیگر باشند ولی از نظر ژنوتیپی مجزا باشند. توالی‌یابی اسیدهـای نوکلئیـک، ابـزار جدیـد و قدرتمنـدی را جهـت تعیـین ارتباطـات تکـاملی و فیلـوژنی میکروارگانیزم‌ها فراهم نموده است که تحت عنوان سـاعت تکاملی معرفی می‌شود. اطلاعـات ژنـومی (تـوالی ژنـوم) از

جدول ۲- میزان بررسی تشابه ایزوله‌های جدا شده با باکتری های موجود در پایگاه اطلاعاتی Blastn

Isolates	Sequence lenghts	Most closely related type strain	Accession numbers	similarity
T20	1514bp	Lactobacillus casei strain Shirota	AB 531131.1	99%
T20	1514bp	Lactobacillus casei strain YIT 0209	AB 008205.1	99%
T20	1514bp	Lactobacillus casei strain YIT 0180	AB 008204.1	99%
T22	1512bp	Lactobacillus casei strain Shirota	AB 531131.1	99%
T22	1512bp	Lactobacillus casei strain YIT 0209	AB 008205.1	99%
T22	1512bp	Lactobacillus casei strain YIT 0180	AB 008204.1	99%
TD4	1514bp	Lactobacillus casei strain Shirota	AB 531131.1	99%
TD4	1514bp	Lactobacillus casei strain YIT 0209	AB 008205.1	99%
TD4	1514bp	Lactobacillus casei strain YIT 0180	AB 008204.1	99%
TD10	1522bp	Lactobacillus casei strain Shirota	AB 531131.1	99%
TD10	1522bp	Lactobacillus casei strain YIT 0209	AB 008205.1	99%
TD10	1522bp	Lactobacillus casei strain YIT 0180	AB 008204.1	99%



شکل ۲- نمایش محصول PCR (قطعه 1500 bp) حاصل از تکثیر ژن ۱٦S rRNA ایزوله‌های جدا شده از ترخینه و دوغ ترخینه بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

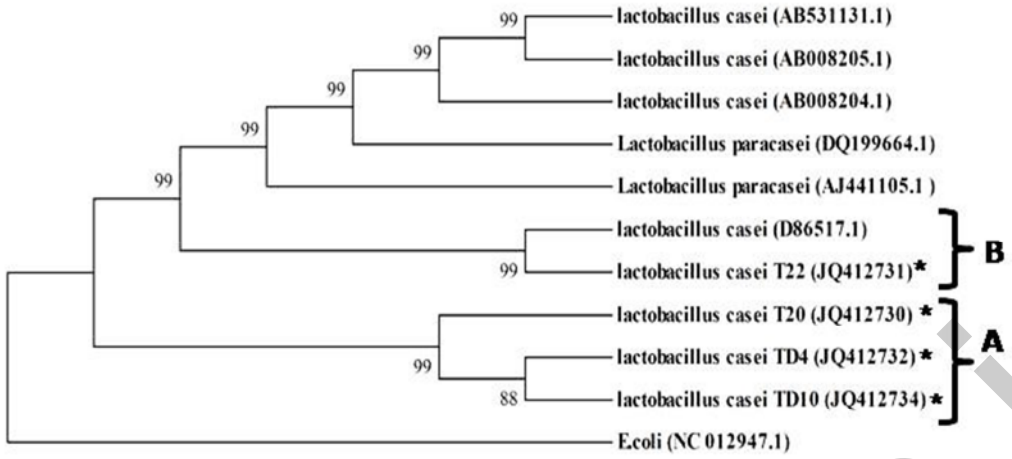
jftn.srbiau.ac.ir

جهاتی نسبت به اطلاعات فنوتیپی ارجحیت دارند که می‌توان به سهولت بیشتر، قابل اعتماد بودن بیشتر و تفسیر نتایج دقیق تر اشاره کرد؛ از طرفی اطلاعات ژنومی حاوی اطلاعات مفیدتر و جامع‌تری نسبت به اطلاعات فنوتیپی می‌باشند. از سال ۱۹۶۵ کم‌کم روش‌های مولکولی در جهت توصیف ارتباطات فیلوژنی وارد عرصه زیست شناسی گردید. تعیین صفات و ویژگی‌های ژنتیکی از جمله تعیین نسبت بازهای DNA، مطالعات هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک، آنالیز دیواره سلولی و توالی‌یابی پروتئین جهت گروهبندی فیلوژنی باکتری‌ها به کار گرفته شدند. ولی این روش‌های مولکولی به اندازه کافی جهت آشکارسازی تاکسون‌های باکتری‌ها کارآمد نبودند. برای مثال، مطالعات هیبریداسیون اسیدهای نوکلئیک (DNA/DNA) جهت مشخص نمودن ارتباطات بین فیلوژنی genera دارای محدودیت بودند. مطالعات هیبریداسیون (DNA/RNA) نیز فقط جهت بازنگری دوباره ساختار تاکسونومیکی موجود بکار گرفته شد. حتی مقایسه توالی پروتئین‌ها نیز به اندازه کافی راهگشا نبود بجز در گروه خاصی از باکتری‌های بنفش. با پیشرفت تکنیک‌های مولکولی، در طبقه بندی باکتری‌ها نیز تغییرات چشمگیری حاصل شد که این امر ناشی از شناسایی مولکول rRNA به عنوان کورنومتر مولکولی بود. مولکولی که توالی آن در گذر زمان بطور تصادفی دچار تغییر می‌شود تحت عنوان کورنومتر مولکولی در نظر گرفته می‌شود. در بین مولکول‌های زیستی rRNA به عنوان مفیدترین و کاربردی‌ترین کورنومتر مولکولی انتخاب شده است. چرا که دارای درجه بالایی از ثبات عملکردی است، در تمام ارگانیزم‌ها وجود دارد و اندازه بزرگی دارد. شاید مهم‌ترین استفاده از rRNA به عنوان کورنومتر مولکولی توالی‌یابی مستقیم آن می‌باشد و در نهایت شرایطی را فراهم می‌آورد که دقیق ترین ارتباطات فیلوژنی قابل بررسی باشد (Woese *et al*., 1987). بر این اساس جهت شناسایی دقیق سوش‌های پروبیوتیکی موجود در ترخینه و دوغ ترخینه از روش قدرتمند و دقیق توالی‌یابی ژن ۱۶S rDNA استفاده شد.

شکل ۳ نشان دهنده ارتباط فیلوژنی ایزوله‌های مذکور و باکتری‌های مرجع موجود در GenBank می‌باشد. مطابق با درخت فیلوژنی حاصله، ایزوله T22 در کلاد B و با bootstrap بسیار بالا (۹۹٪) و میزان تشابه ۹۹٪ نسبت به *Lactobacillus casei* (D865117.1) قرار گرفت. سوش‌های T20، TD4 و TD10 نیز یک کلاد جداگانه (کلاد A) تشکیل دادند. وجود تشابه بالای توالی‌های ۱۶S rDNA سوش‌های TD4 و TD10 جدا شده از دوغ ترخینه، سبب قرارگیری آن‌ها در یک گروه با ۸۸٪ bootstrap شد و از طرفی با bootstrap بسیار بالا (۹۹٪)، نزدیک به سوش T20 جدا شده از ترخینه قرار گرفتند. از طرفی هر دو کلاد A و B با ۹۹٪ bootstrap نزدیک به گروه لاکتوباسیل‌های کازئی و زیر گروه آن پاراکازئی گروهبندی شدند. تمامی سوش های T20، T22، TD4 و TD10 تشابه DNAای ۹۹٪ با گروه لاکتوباسیل کازئی و پاراکازئی نشان دادند. هر دو ایزوله TD4 و TD10 در یک گروه قرار گرفتند که نمایانگر رابطه فیلوژنی نزدیکشان با یکدیگر می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر در این مورد، جداسازی این دو ایزوله از یک منبع (دوغ ترخینه) می‌باشد.

در بسیاری از مطالعات از روش توالی‌یابی جهت شناسایی سوش‌های لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک و تنوع شده است. چرا که نسبت به روش‌های رایج بیوشیمایی که وقت‌گیر و در بسیاری از موارد ابهام آمیز می‌باشند روش قابل اعتمادی بوده و قادر به شناسایی سوش‌های نزدیک به هم می باشد. Kullen و همکاران در سال ۲۰۰۰ از روش توالی سنجی ناحیه ۵۰۰ جفت بازی ژن ۱۶S rRNA (خصوصا ناحیه متغیر V_1 ، V_2) برای شناسایی سوش‌های لاکتوباسیل های اسیدوفیلوس استفاده کردند. این روش بطور موفقیت آمیزی قادر به شناسایی طیف وسیعی از سوش‌ها بود. روش توالی سنجی ناحیه V_3 ژن۱۶S rRNA برای تعیین دقیق تنوع لاکتوباسیل ها در کفیر توسط Wang به کار گرفته شد (wang *et al*., 2006). Sisto نیز از همین روش برای شناسایی اختصاصی سوش‌های لاکتوباسیلوس پاراکازئی استفاده کرد (Sisto *et al*., 2009). حجازی و همکاران نیز با توالی‌یابی ناحیه ۱۶S rRNA، لاکتوباسیلویس پلانتاروم و انتروکوکوس هیرا را در پنیر مناطق سراب و هریس شناسایی کردند (حجازی و همکاران، ۱۳۸۹).

ifrt.srbiau.ac.ir



شکل ۳- درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی‌های ۱٦S rRNA ایزوله‌های مورد مطالعه (مشخص شده با ستاره) و توالی‌های مرجع در GenBank

اعداد واقع در گره کلادها، نمایانگر ارزش bootstrsp (٪) می‌باشند.

از باکتری E. coli (NC012947.1) به عنوان Outgroup استفاده شد.

نتیجه‌گیری

این تحقیق اولین گزارش مبنی بر شناسایی مولکولی باکتری‌های موجود در غذای سنتی ترخینه با ظرفیت پروبیوتیکی می باشد. امید است بتوان با تهیه بانک میکروبی غنی از منابع طبیعی و سنتی موجود در کشور از توان پروبیوتیکی این باکتری ها در مصارف صنعتی در جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی سود جست.

سپاسگزاری

این تحقیق با پشتیبانی و حمایت مالی معاونت محترم پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند انجام گرفته است. بدین وسیله از همکاری و حمایت واحد مربوطه تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

حجازی، م. ا.، لطفی، ح.، زنجانی، ب. و برزگری، ا. (۱۳۸۹). جداسازی، شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی باکتریهای با پتانسیل پروبیوتیکی از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب. مجلهٔ علمی-پژوهشی پژوهشهای صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز، شماره ۱، جلد ۲۰/۳، ۱۹-۱.

Araújo, W. L., Angellis, D. A. & Azevedo, J. L. (2004). Direct RAPD evaluation of bacteria withoutconventional DNA extraction. Brazilian Archives of Biology and Technology, 47, 375-80.

Caufield, P. W., Li, Y., Dasanayake, A. & Saxena, D. (2007). Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. Caries Res, 41(1), 2-12.

Collins, M. D., Rodrigues, U., Ash, C., Aguirre, M., Farrow, J. A. E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B. A., Williams, A. M. & Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett, 77, 5-12.

Dimtonova, S. P., Bakalov, B. V., Aleksandrova-Georgieva, R. N. & Danova, S. T. (2008). Phenotypic and and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. J Microbiol Immunol Infect, 41,469-477.

Ehrmann, M. A., Mu¨ ller, M. R. A. & Vogel, R. F. (2003). Molecular analysis of sourdough reveals Lactobacillus mindensis sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53, 7–13.

Kullen, M. J., Sanozky-Dawes, R. B., Crowell, D. C. & Klaenhammer, T. R. (2000). Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. Journal of Applied Microbiology, 89, 511-516.

Langendijk, P. S., Schuts, F., Jansen, G. J., Raangs, G. C., Kamphuis, G. R., Wilkinson, M. H. F. & Welling, G. J. (1995). Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of

ijtn.srbiau.ac.ir

Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. Appl. Environ. Microbiol, 61,3069-3075.

Lick, S. (2003). Review: Typing systems for lactobacilli, Milchwissenschaft, 58, 256–260.

Schleifer, K. H., Ehrmann, M., Beimfohr, C., Brockmann, E., Ludwig, W. & Amann, R. (1995). Application of molecular methods for the Classification and identification of Lactic Acid Bacteria. Int. Dairy Journal, 5, 1081-1094.

Schloss, P. D. & Handelsman , J. (2005). Introducing DOTUR, a computer program fordefining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl.Environ. Microbiol, 71, 1501–1506.

Sisto, A., De Bellis, P., Visconti, A., Morelli, L. & Lavermicocca, P. (2009). Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain Lactobacillus paracasei IMPC2.1. Int J Food Microbiol, 136(1), 59-65.

Stackebrandt, E. & Rainey, F. A. (1995). Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies, p. 1-17. *In*: A. D. L. Akkeramns, J. D. van Elsas, and F. J. de Bruijn (ed.), Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Tajabadi Ebrahimi, M., Bahrami, H. & Ziary, Z. (2011 a). Tarkhineh source of probiotic lactic acid bacteria. The Quarterly Journal of Biological Sciences, Islamic Azad University, Zanjan. 4(12): 1-9.

Tajabady, E. M., Ouwehand, A. C., Jafari, P., Bahrami, H. & Heidary Nasrabadi, M. (2011 b). "Evaluation probiotic effects of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh", International Scientific Conference on Probiotic and prebiotic, Slovakia, June 14-16.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0.Mol Biol Evol, 24, 1596–1599.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, V., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microb.Rev, 60, 407-438.

Wang, R. F., Cao, W. W. & Cerniglia, C. E. (1996). PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl. Environ. Microbiol, 62, 1242-1247.

Wang, Y. Y., Li, H. R., Jia, S. F., Wu, Z. J. & Guo, B. H. (2006). Analysis of bacterial diversity of kefir grains by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing. Wei Sheng Wu Xue Bao, 46(2), 310-3.

Welling, G., Elfferich, W. P., Raangs, G. C., Wildeboer-Veloo, A. C. M., Jansen, G. J. & Degener, J. E. (1997). 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. Scand. J. Gastroenterol. 32 Supplement 222, 17-19.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. Microbial. Rev, 51,221-71.

jftn.srbiau.ac.ir