جداسازی، شناسایی و انگشت‌نگاری باکتری‌های لاکتوباسیلوس از محصولات لبنی و تخمیری سنتی استان لرستان و تعیین روابط ژنتیکی بین آنها با استفاده از تکنیک RAPD-PCR

صبا دارائی [a]، بهروز دوستی [b]، کامران سمیعی [c*]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه زیست‌شناسی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
[b] دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
[c] استادیار گروه زراعت و اصلاح‌نباتات، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۴/۲۰ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۰۶/۲۶
DOI. 10.30495/jftn.2023.74174.11265

چکیده

مقدمه: باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) اجزای اصلی و طبیعی میکرو فلور دستگاه گوارش هستند. شناسایی باکتری های اسید لاکتیک برای مطالعات پایه و کاربرد در صنایع غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

مواد و روش‌ها: جهت جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک طبیعی، نمونه‌های ماست محلی و ترخینه سنتی از مناطق مختلف استان لرستان با در نظر گرفتن فواصل جغرافیایی مناسب و شرایط آب و هوایی مختلف جمع‌آوری شد. پس از جداسازی باکتری‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی، تعداد ۲۰ باکتری اسید لاکتیک انتخاب و سپس با استفاده از آغازگرهای اختصاصی، ژن 16SrDNA تکثیر و پس از همردیفی و مقایسه با بانک اطلاعاتی NCBI، نوع باکتری تعیین گردید. به منظور برآورد تنوع ژنتیکی بین باکتری‌های مورد مطالعه، از ۴ آغازگر نشانگر RAPD-PCR استفاده شد. در انتها درخت فیلوژنتیکی بین باکتری‌های مورد مطالعه انجام گرفت.

یافته‌ها: براساس آزمون آنتی‌بیوگرام مشخص شد که تمامی باکتری‌های مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و آمیکاسین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکومایسین و تتراسایکلین حساس بودند. باکتری‌های جداسازی شده از ترخینه با ۹۷ درصد شباهت و باکتری‌های جداسازی شده از ماست با ۸۹ درصد شباهت در گروه مشابهی قرار گرفتند. دو سویه باکتری جداسازی شده از ماست با ۹۴ درصد به باکتری *L.rhamnosus* شباهت داشتند. در رابط با دو سویه باکتری جداسازی شده از نمونه ترخینه، نتایج نشان داد که این دو باکتری با شباهت ۹۸ درصد به باکتری گونه *L.pentosus* شباهت دارند. براساس نتایج گروه‌بندی توسط نشانگر RAPD-PCR، باکتری‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۵۷ درصد تشکیل ۶ گروه دادند و یک ژنوتیپ به تنهایی یک گروه تشکیل داد. در رابطه با فواصل جغرافیایی و گروه‌بندی به دست آمده، نمونه‌های باکتری جداسازی شده از محصولات سنتی مناطق جغرافیایی مشابه، در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند.

نتیجه‌گیری: نتایج به طور کلی نشان داد که استفاده از نشانگرهای ژنتیکی می‌تواند در شناسایی دقیق‌تر گونه و سویه باکتری‌های اسید لاکتیک محصولات لبنی و تخمیری بسیار کارا باشد.

واژه‌های کلیدی: *اسید لاکتیک، لاکتوباسیلوس، RAPD-PCR، فیلوژنتیک*

* نویسنده مسئول مکاتبات
email: kamransamiei@yahoo.com

مقدمه

تخمیر یکی از قدیمی‌ترین تکنیک‌های مورد استفاده بشر بوده که برای فرآوری و نگهداری مواد غذایی استفاده می‌شود (Sharma *et al*., 2020). با توجه به فواید متعدد فرآیند تخمیر و غذاهای تولید شده در این فرآیند، توجه ویژه‌ای به این گروه از مواد غذایی می‌شود. غذاهای تخمیر شده به دلیل وجود ترکیبات زیستی نظیر پپتیدهای فعال زیستی، آمین‌های بیوژنیک و کاهش اثرات منفی از طریق عملکرد میکروبی، خواص تغذیه‌ای را بهبود می‌بخشند. همچنین می‌توانند با کاهش خطر انتقال مواد بیماری‌زا به غذا از طریق متابولیت‌های ضد میکروبی تشکیل شده در طی فرآیند تخمیر، به تضمین ایمنی غذا کمک کنند (Dimidi *et al*., 2019).

پروبیوتیک‌ها به بهبود عملکرد روده، تقویت سیستم ایمنی و کاهش عوامل بیماری‌زا کمک می‌کنند. مطالعات متعدد نشان داده که پروبیوتیک‌ها دارای اثر ضد فشار خون، کاهش سطح کلسترول، اثر آنتی‌اکسیدانی، محافظت در برابر سرطان روده بزرگ، کاهش علائم آلرژی و کاهش شاخص چاقی هستند. مصرف منظم پروبیوتیک‌ها سلامت روده را بهبود بخشیده و در درمان اختلالات گوارشی مانند و سندرم روده تحریک‌پذیر و درماتیت نقش فعالی ایفا می‌کنند. پروبیوتیک‌ها همچنین می‌توانند در بهبود سیستم ایمنی، متابولیسم کبد و بهبود هضم نقش موثری داشته باشند (Nazir *et al*., 2018).

باکتری‌های اسید لاکتیک[1] (LAB) به طور طبیعی باکتریوسین‌هایی تولید می‌کنند که به حفظ زیستی مواد غذایی کمک کرده و به‌عنوان یک سیستم دفاعی آنتاگونیستی، اثرات بازدارنده و ضد میکروبی داشته و سبب جلوگیری از عمل پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های فاسد کننده می‌شوند. به دلیل وجود باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، از این باکتری‌ها می‌توان به‌عنوان ابزاری برای اطمینان از ایمنی و کیفیت محصولات غذایی استفاده کرد (Perez *et al*., 2014).

محصولات لبنی و تخمیر شده، به طور گسترده‌ای در دسترس بوده و حاوی طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها هستند که در فرآیند تولید آنها نقش دارند (Zabat *et al*., 2018). باکتری‌های اسید لاکتیک را می‌توان در اکثر محصولات تخمیری یافت. وجود این باکتری‌ها در غذای تخمیر شده آن را به یک غذای کاربردی تبدیل می‌کند. در طی فرآیند تخمیر، بسترهای آلی به محصولات نهایی ارگانیک ساده تبدیل می‌شوند (Mokoena, 2017).

اکوسیستم‌های طبیعی و سنتی میزبان جوامع مختلف میکروبی هستند. بنابراین، اکوسیستم‌هایی که از سلامت انسان حمایت می‌کنند و آن را ارتقا می‌دهند، باید شامل جوامع میکروبی با عملکرد خوب و متنوع باشند. تنوع زیستی بالا در میکروبیوم روده به دستیابی و حفظ عملکردهای مختلف کمک می‌کند. میکروبیوم‌های محیطی و انسانی با هم تعامل داشته و تنوع زیستی در مقیاس کلان سبب ایجاد تنوع ژنتیکی وسیع در فلور میکروبی شده که به نوبه خود از یک میکروبیوم انسانی سالم و متنوع پشتیبانی خواهد کرد (Delgado-Baquerizo *et al*., 2016).

روش‌های سنتی که از مشاهده مورفولوژی تک سلولی یا خصوصیات کلنی استفاده می‌کنند، پارامترهای قابل اعتمادی برای شناسایی گونه‌های باکتریایی بوده ولی چندان دقیق نبوده و دارای معایبی هستند. این تکنیک‌ها زمان‌بر و پر هزینه بوده و به دلیل تنوع در سرعت رشد و شرایط مختلف محیطی ممکن است منجر به نتایج مبهم شود. برای کاهش مشکلات ناشی از کاربرد تکنیک‌های سنتی، روش‌های جدیدتری که باکتری‌ها را سریع و مطمئن شناسایی می‌کنند، توسط بسیاری از آزمایشگاه‌ها در سراسر جهان اتخاذ شده‌اند. یکی از مهمترین و پرکاربردترین تکنیک‌های شناسایی باکتری‌ها، استفاده از نشانگرهای ژنتیکی است. ترکیب تکنیک‌های ژنتیکی با روش‌های سنتی، سطح اطمینان بالاتری را برای شناسایی باکتری‌ها در اختیار قرار می‌دهد (Kshikhundo and Itumhelo, 2016).

توالی ژن 16SrDNA برای شناسایی گونه‌های باکتریایی در نمونه‌های طبیعی و ایجاد روابط فیلوژنتیکی بین آنها استفاده می‌شود (Eren *et al*., 2011). بر اساس این واقعیت که تنوع این نواحی با هویت گونه‌ها در ارتباط است، تجزیه و تحلیل کل ژن 16SrDNA برای شناسایی گونه‌های باکتریایی بسیار کارایی خواهد داشت (Chakravorty *et al*., 2007).

[1] Lactic Acid Bacteria

تشخیص گونه‌های باکتریایی با تکنیک‌های مبتنی بر نشانگرهای مولکولی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا چنین تکنیک‌هایی مبتنی بر تجزیه و تحلیل اسیدهای نوکلئوتیدی بوده و قابل تکرار هستند. علاوه بر این، این روش‌ها در سال‌های اخیر پیشرفت قابل‌توجهی داشته و امکان دسته‌بندی باکتری‌ها را با استفاده از معیارهای جدید بر اساس یک توالی خاص از ژنوم‌ها را ممکن می‌سازد (Coeuret *et al.*, 2013). با توجه به نقش ارزشمند محصولات لبنی و تخمیری سنتی به دلیل فراوانی باکتری‌های پروبیوتیک در آنها، مطالعه حاضر به منظور جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* موجود در ماست محلی و ترخینه سنتی مناطق جغرافیایی مختلف استان لرستان به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری و کشت باکتری‌های مورد مطالعه

جهت جداسازی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس*، نمونه‌های ماست محلی و ترخینه سنتی از مناطق مختلف استان لرستان با در نظر گرفتن فواصل جغرافیایی مناسب و شرایط آب و هوایی مختلف جمع‌آوری شد. در جدول ۱ مشخصات نمونه‌های مورد مطالعه شامل ۱۰ نمونه ماست محلی و ۱۰ نمونه ترخینه سنتی و محل جمع‌آوری آنها نمایش داده شده است. پس از نمونه‌برداری و کدبندی آنها، نمونه‌های ماست جمع‌آوری شده در کوتاه‌ترین زمان بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و مراحل جداسازی و کشت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* موجود در نمونه‌ها در روز نمونه‌برداری صورت گرفت.

جهت آماده‌سازی نمونه‌های ترخینه سنتی، ابتدا مقدار ۲۰ گرم از هر نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل قرار داده شد. سپس ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه آماده شده در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده شد. جهت جداسازی بخش جامد و تهیه سوسپانسیون سلولی اولیه، نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۴۰۰۰rcf به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند و سپس ۲۰ میلی‌لیتر از محلول رویی به فالکون استریل جدیدی منتقل شد. در رابطه با نمونه‌های ماست محلی، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر از نمونه در فالکون‌های ۵۰ میلی‌لیتری قرار داده و سپس جهت جداسازی بخش جامد و تهیه سوسپانسیون سلولی اولیه، نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۴۰۰۰rcf به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در مرحله بعد، مقدار ۲۰ میلی‌لیتر از محلول رویی به فالکون استریل جدیدی منتقل شد.

جهت کشت باکتری‌های موجود در نمونه‌های آماده‌سازی شده، مقدار ۱ میلی‌لیتر از محلول به دست آمده از سوسپانسیون اولیه نمونه‌های ترخینه و ماست، با ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع MRS[1] (Q.Lab, Canada) ترکیب و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور (ژال تجهیز، ایران) گرمخانه‌گذاری شدند.

باکتری‌های رشد یافته اولیه، در سانتریفیوژ با ۴۰۰۰rcf به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و سپس محلول رویی دور ریخته شد. به باکتری‌های ته‌نشین شده مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از بافر PBS[2] (pH=3) اضافه شده و به شدت همزده شد. نمونه‌ها به مدت ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و در سانتریفیوژ با ۴۰۰۰rcf به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و سپس محلول رویی دور ریخته شد.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های جمع‌آوری شده[1]

Table 1- Characteristics of the collected samples

Collection place	Traditional product type	Code	Collection place	Traditional product type	Code
Robat	Yogurt	G-11	Alashtar	Tarkhineh	G-1
Alashtar		G-12	Chegeni		G-2
Noorabad		G-13	Khorramabad		G-3
Firoozabad		G-14	Beyranshahr		G-4
Doroud		G-15	Boroujerd		G-5
Azna		G-16	Aligoodarz		G-6
Aligoodarz		G-17	Poldokhtar		G-7
Zagheh		G-18	Taleghan		G-8
Poldokhtar		G-19	Kouhdasht		G-9
Kouhdasht		G-20	Doroud		G-10

[1] De Man–Rogosa–Sharpe [2] Phosphate Buffered Saline

به منظور شستشوی پلت باکتری‌های ته‌نشین شده، از مقدار مناسبی سرم استریل فیزیولوژیک PPS[1] استفاده شد. پلت به دست آمده در ۱۰ میلی‌لیتر سرم PPS توسط همزن به صورت سوسپانسیون درآمد. به منظور کشت نهایی نمونه‌های باکتری، مقدار ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون مرحله قبل به صورت چمنی بر روی محیط کشت MRS جامد به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی در جار با استفاده از گازپک (مرک، آلمان) گرمخانه‌گذاری شد (Borga *et al*., 2017; Montazeri *et al*., 2020).

- شناسایی و جداسازی اولیه باکتری‌های لاکتوباسیلوس

مرحله اول جداساز۳ی باکتری‌های اسید لاکتیک با استفاده از محیط کشت اختصاصی (MRS) و شرایط اسیدیته پایین (pH=3-3.5) صورت گرفت. برای جداسازی و تخلیص دقیق‌تر، از هر یک از باکتری‌های رشد یافته بر روی محیط کشت اختصاصی، تعداد ۵ کلنی انتخاب و به صورت خطی بر روی محیط MRS جامد کشت داده شد. پس از خالص‌سازی باکتری‌های منتخب، از سایر آزمون‌ها از جمله آزمون گرم، آزمون کاتالاز و آزمون آنتی‌بیوگرام جهت شناسایی و غربال باکتری‌ها استفاده شد (Kim *et al*., 2010).

پس از رنگ‌آمیزی نمونه‌های باکتری و انتخاب باکتری‌های گرم مثبت، از مشاهدات میکروسکوپی جهت تعیین شکل باکتری استفاده شد. برای این منظور، لام حاوی باکتری گرم مثبت (بنفش رنگ) توسط میکروسکوپ نوری (Nikon.E200-Japon) مورد ارزیابی قرار گرفت و نوع باکتری از نظر باسیل یا کوکسی شکل بودن، تعیین شد (Kim *et al*., 2010).

جهت اجرای آزمون آنتی‌بیوگرام، تعداد ۶ آنتی‌بیوتیک تجاری (تتراسیکلین، ونکومایسین، آمیکاسین، آمپی‌سیلین، کانامایسین و جنتامایسین) به منظور گروه‌بندی باکتری‌های جداسازی شده مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا کشت چمنی از باکتری‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت جامد MRS در پلت‌های ۸ سانتی‌متری تهیه شد. سپس هر یک از دیسک‌های تجاری حاوی آنتی‌بیوتیک‌های مورد نظر (پادتن‌طب، ایران) بر روی محیط کشت با فاصله مناسب قرار داده شدند. به منظور ارزیابی میزان حساسیت یا مقاومت، از دیسک بلانک ۶ میلی‌متری (پادتن‌طب، ایران) به عنوان کنترل منفی و بررسی عدم تشکیل هاله استفاده شد. نمونه‌های آماده شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری و براساس تشکیل (حساسیت) یا عدم تشکیل (حساسیت) هاله عدم رشد و همچنین اندازه قطر هاله تشکیل شده، حساسیت و مقاومت باکتری‌های مورد نظر تعیین گردید (Kim *et al*., 2010).

- استخراج DNA باکتریایی و تعیین کمیت و کیفیت آن

جهت استخراج DNA کل (Total DNA) از تکنیک جوشاندن استفاده شد. برای این منظور یک کلنی از باکتری‌های مورد مطالعه در ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر استریل توسط ورتکس به صورت سوسپانسیون درآمد. سوسپانسیون مورد نظر در بن‌ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در سانتریفیوژ با ۸۰۰۰rcf به مدت ۵ دقیقه قرار داده و ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به عنوان DNA الگو در مراحل بعدی آزمایش استفاده گردید. پس از استخراج و تخلیص DNA تمامی باکتری‌های مورد مطالعه، کمیت و کیفیت آنها با استفاده از اسپکتروفتومتری و الکتروفورز ژل آگارز برآورد گردید. نهایتاً محلول کاری با غلظت ۲۰ نانوگرم DNA در هر میکرولیتر تهیه ودر دمای ۲۰- سانتی‌گراد نگهداری شد (Dimitrakopoulou *et al*., 2020).

- تکثیر ژن 16SrDNA و الکتروفورز آن

به منظور بررسی باکتری‌های مورد مطالعه از نظر مولکولی، آغازگرهای اختصاصی برای ژن 16SrDNA با استفاده از نرم‌افزار AllelID طراحی شد (جدول ۲). به منظور تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی ژن 16SrDNA از واکنش‌های PCR با استفاده از کیت سنتز DNA شرکت فزابیوتیک (ایران) استفاده شد. مخلوط واکنش شامل ۱ واحد آنزیم Taqپلی‌مراز و ۱۰۰ نانوگرم DNA ژنومی

[1] Physiological Peptone Solution

باکتری بود. برنامه زمانی و دمایی واکنش‌های PCR در جدول ۳ نمایش داده شده است.

پس از تکثیر قطعات ۱۵۰۰ جفت‌بازی ژن 16SrDNA، جهت مشاهده محصول PCR از ژل آگارز ۱/۵ درصد، بافر TAE و تکنیک الکتروفورز استفاده شد. جهت مشخص نمودن اندازه قطعات تکثیر شده، از نشانگر با اندازه مشخص 100bp استفاده شد.

- توالی‌یابی، همردیفی[1] و رسم درخت فیلوژنتیکی

پس از تکثیر قطعات ۱۵۰۰ جفت بازی با استفاده از DNA تمامی باکتری‌های مورد مطالعه، چهار نمونه از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* تایید شده ترخینه و ماست انتخاب و محصول PCR آن جهت توالی‌یابی به شرکت دنا زیست (ایران) ارسال شد. توالی دریافت شده با استفاده از ابزار BLAST[2] در بانک اطلاعاتی NCBI بر علیه اطلاعات ژنومی باکتری‌های خانواده لاکتوباسیلوس همردیف شد. براساس نتایج به دست آمده تعداد مساوی توالی برای هر باکتری با شباهت بیش از ۹۵ درصد انتخاب و توسط نرم‌افزار MEGA.6.0 و ابزار ClustallW موجود در آن ابتدا همردیفی چندگانه انجام گرفت و نهایتاً درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های انتخاب شده ترسیم شد.

- تعیین فواصل ژنتیکی و برآور چندشکلی بین باکتری‌های مورد مطالعه

به منظور بررسی تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه، از نشانگر RAPD-PCR استفاده شد. تعداد ۴ آغازگر ۱۰ نوکلئوتیدی براساس مطالعات قبلی انتخاب (Rodriguez *et al*., 2001) و جهت سنتز به شرکت تکاپو زیست (ایران) ارسال شد. اطلاعات آغازگرهای مورد استفاده شامل توالی نوکلئوتیدی و دمای اتصال آنها در جدول ۴ نمایش داده شده است.

- تکثیر و الکتروفورز قطعات تکثیر شده توسط تکنیک RAPD-PCR

به منظور تکثیر قطعات (باند) با استفاده از آغازگرهای نشانگر RAPD-PCR، از واکنش‌های PCR با استفاده از کیت سنتز DNA شرکت فزابیوتیک (ایران) استفاده شد. جهت اجرای واکنش‌های PCR از شرایط واکنش و چرخه دمایی و زمانی مشابه تکثیر ژن 16SrDNA و دمای تعیین شده برای اتصال هر آغازگر استفاده شد.

جدول ۲- توالی، دمای اتصال و اندازه قطعه تکثیر شونده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن 16SrDNA

Table 2-bSequence, annealing temperature and size of the amplified fragment using 16SrDNA gene specific primers

Primer name	Nucleotide sequence	Annealing temperature	Length of product (bp)
16SrDNA-F	5´-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3´	56	1500
16SrDNA-R	5´-AAGGTTACCTCACCGACTTC-3´		

جدول ۳- چرخه دمایی و زمانی مورد استفاده جهت تکثیر ژن 16SrDNA

Table 3- Temperature and time cycle used for 16SrDNA gene replication

Number of cycles	Name of step or cycle	Temperature (°C)	Time (Minute)
1	Primer denaturing	94	5
	Denaturing	94	1
40	Annealing	56	1
	Extension	72	2
1	Final extension	72	10

جدول ۴- توالی و دمای اتصال آغازگرهای مورد استفاده برای نشانگر RAPD-PCR.

Table 4-Sequence and annealing temperature of primers used for RAPD-PCR marker

Primer name	Nucleotide sequence	Annealing temperature
OPA13	5´-CAGCACCCAC-3´	40
BO7	5´-AGATGCAGCC-3´	38
B10	5´-CAGGCACTAG-3´	35
OP10	5´-ACTGGCTCCG-3´	42

[1] Alignment [2] *Basic Local Alignment Search Tool*

پس از تکثیر قطعات (باند) با استفاده از آغازگرهای تصادفی مورد استفاده، محصول PCR با حجم مشخصی از بافر بارگیری (Loading Buffer-6X) ترکیب و جهت مشاهده از ژل آگارز ۱/۵ درصد، بافر TAE و تکنیک الکتروفورز استفاده شد. جهت مشخص نمودن اندازه قطعات تکثیر شده، از نشانگر با اندازه مشخص 100bp استفاده شد.

- گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه

محصول نهایی ژل الکتروفورز با استفاده از دستگاه ژل‌خوان (Gel-Documentation-Biorad-USA) عکس‌برداری و سپس براساس وجود یا عدم وجود قطعات تکثیر شده، به باکتری‌های مورد مطالعه به ترتیب امتیاز یک و صفر داده شد. ماتریس امتیازدهی تشکیل و سپس با استفاده از نرم‌افزار NTSYS.2.02i ماتریس تشابه تهیه و براساس میزان شباهت برآورد شده، دندروگرام با استفاده از الگوریتم UPGMA ترسیم شد. دندروگرام به دست آمده در ضریب تشابه مناسب قطع و گروه‌بندی باکتری‌ها انجام گرفت (Abdollahniya *et al*., 2018).

یافته‌ها

نتایج آزمون گرم، تست کاتالاز و آزمون آنتی‌بیوگرام

پس از کشت نمونه‌های ترخینه سنتی و ماست محلی بر روی محیط کشت اختصاصی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* (MRS) و همچنین اعمال اسیدیته پایین (pH=3)، تعداد محدودی از باکتری‌ها با فرم رشد و کلنی مشابه جداسازی گردید. استفاده از محیط کشت اختصاصی توانست به طور موفقیت‌آمیزی تعداد باکتری‌های اولیه را جهت بررسی‌های بعدی کاهش دهد و شانس جداسازی و شناسایی باکتری‌های منتخب از گروه باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* را افزایش دهد. در شکل ۱ نمونه‌ای از کشت باکتری‌های مورد مطالعه بر روی محیط کشت MRS نمایش داده شده است.

پس از رنگ‌آمیزی کلنی‌های خالص شده مربوط به هر یک از نمونه‌های ترخینه و ماست، مشخص شد که اکثر باکتری‌های رشد یافته گرم مثبت (بنفش رنگ) و باسیلی شکل بودند. با این وجود در برخی موارد باکتری‌های گرم مثبت کوکسی‌شکل نیز مشاهده شد. برای مرحله بعدی، باکتری‌هایی با کاتالاز منفی انتخاب شد. براساس نتایج به دست آمده از آزمون آنتی‌بیوگرام، تمامی باکتری‌های مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و آمیکاسین مقاوم و به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکومایسین و تتراسایکلین حساس بودند. باکتری‌های جداسازی شده نسبت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین الگوی متفاوتی داشتند به طوری که ۴ باکتری مقاوم و ۱۶ باکتری دیگر حساسیت نشان دادند.

- نتایج PCR ژن 16SrDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های مورد مطالعه

پس از تکثیر ژن 16SrDNA و الکتروفورز محصول نهایی PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، تمامی نمونه‌های باکتری جمع‌آوری شده قطعه ۱۵۰۰ جفت بازی تولید کردند. به منظور تایید نتایج به دست آمده، PCR در دو تکرار اجرا گردید و براساس نتایج به دست آمده، محصول PCR دو نمونه ترخینه و دو نمونه ماست محلی انتخاب و قطعه مورد نظر توالی‌یابی شد.

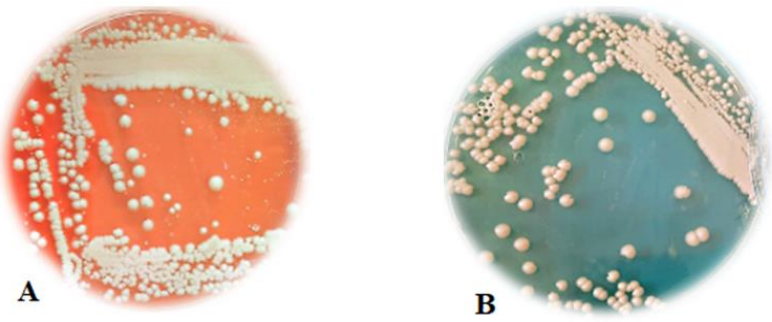

Figure 1- Results of tarkhineh (A) and yogurt (B) samples cultured on MRS-specific culture medium

شکل ۱- نتایج کشت نمونه‌های ترخینه (A) و ماست (B) کشت داده شده بر روی محیط کشت اختصاصی MRS.

نتایج همردیفی بین توالی ژن 16SrDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیکی چهار باکتری انتخاب شده نشان داد که باکتری‌های جداسازی شده از ترخینه با ۹۷ درصد شباهت و باکتری‌های جداسازی شده از ماست با ۸۹ درصد شباهت در گروه‌های مشابهی قرار گرفتند. باکتری‌های دو گروه ترخینه و ماست نیز در فاصله ژنتیکی ۷۹ درصد تشکیل گروه مشترکی دادند (شکل ۲).

- بررسی روابط فیلوژنتیک و تعیین گونه باکتری‌های مورد مطالعه

بر اساس نتایج همریفی چندگانه، درخت فیلوژنتیکی برای نمونه‌های باکتری جداسازی شده از ترخینه سنتی و ماست محلی ترسیم شد. نتایج نشان داد که دو سویه باکتری جداسازی شده از ماست با ۹۴ درصد به باکتری *L.rhamnosus* شباهت داشتند. در رابط با دو سویه باکتری جداسازی شده از نمونه ترخینه، نتایج نشان داد که این دو باکتری با میانگین شباهت ۹۸ درصد به باکتری‌های گونه *L.pentosus* شباهت داشتند. پس از ترسیم درخت فیلوژنتیکی، مشخص شد که باکتری‌های مورد مطالعه در گروه‌های مشترکی قرار گرفتند (شکل ۳).

- برآورد فواصل ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD-PCR

نتایج تکثیر قطعات چندشکل توسط ۴ آغازگر تصادفی مورد استفاده و الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز، نشان داد که آغازگرهای B07 و OPA13 به ترتیب با ۱۴ و ۱۱ باند چندشکل (پلی‌مورف) در بین باکتری‌های مورد مطالعه از بیشترین درصد چندشکلی (۹۳ و ۸۵ درصد) برخوردار بودند. آغازگر B10 با ۶ قطعه چندشکل (۶۷ درصد) از کمترین مقدار چندشکلی برخوردار بود. براساس نتایج به دست آمده، ۴ آغازگر مورد استفاده توانستند تعداد ۴۸ باند در بین باکتری‌های مورد مطالعه تشکیل دهند که ۳۹ باند (۸۱ درصد) چند شکل بودند (شکل ۵).

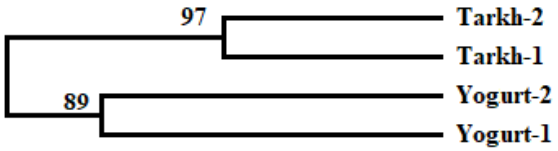

Figure 2- Phylogenetic tree of the studied bacteria based on the nucleotide sequence fragment of the 16SrDNA gene.

شکل ۲- درخت فیلوژنتیکی باکتری‌های مورد مطالعه براساس قطعه توالی نوکلئوتیدی ژن 16SrDNA.

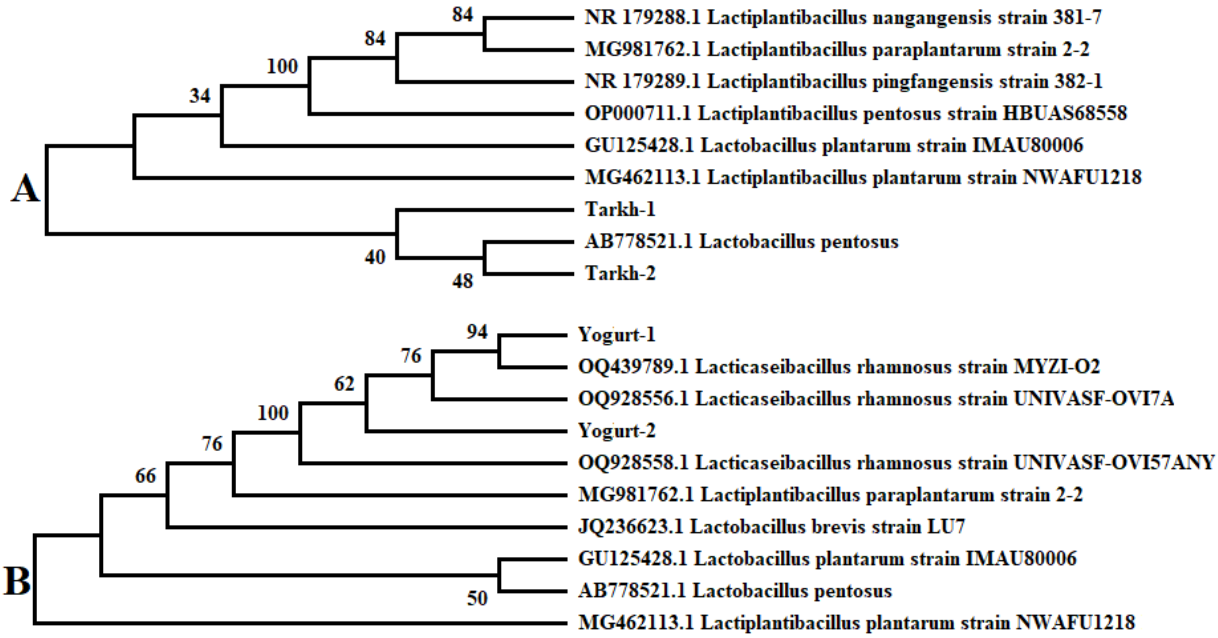

Figure 3-Phylogenetic tree of bacteria isolated from tarkhineh samples (A) and yogurt (B).

شکل ۳-درخت فیلوژنتیک باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های ترخینه سنتی (A) و ماست محلی (B).

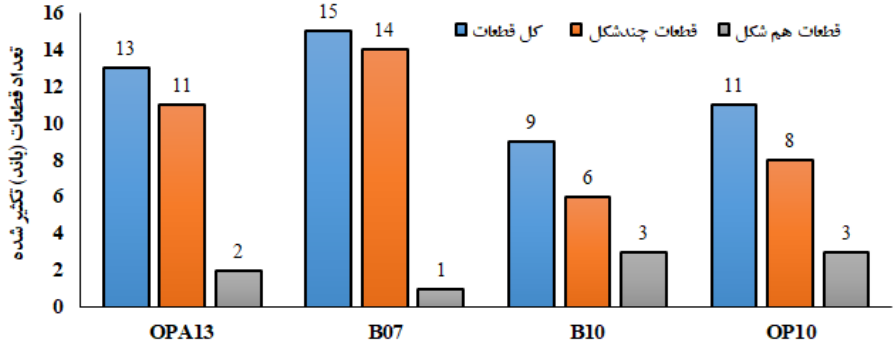

Figure 4 - Frequency of amplified fragments using RAPD-PCR marker primers.

شکل ۴- فراوانی قطعات تکثیر شده با استفاده از آغازگرهای نشانگر .RAPD-PCR

- ترسیم دندروگرام و گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه

براساس قطعات چندشکل به دست آمده، ضرایب تشابه بین ۲۰ باکتری مورد مطالعه برآورد شد. نتایج نشان داد که میانگین تشابه بین باکتری‌های مورد مطالعه حدود ۵۲ درصد بود. بیشترین تشابه (کمترین فاصله ژنتیکی) بین دو باکتری جداسازی شده از ترخینه سنتی (نمونه الشتر و نمونه چگنی) با ۹۸ درصد و کمترین شباهت به دو باکتری (نمونه ترخینه کوهدشت و نمونه ماست ازنا) با ۱۱ درصد تعلق داشت.

براساس گروه‌بندی و ترسیم دندروگرام براساس فواصل ژنتیکی، نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه در ضریب تشابه ۵۷ درصد تشکیل ۶ گروه دادند و ژنوتیپ شماره ۲۰ (نمونه ماست محلی کوهدشت) به تنهایی یک گروه تشکیل داد (شکل ۵).

باکتری‌های جداسازی سازی شده از ترخینه سنتی و ماست محلی در گروه‌های مشابهی قرار گرفتند و گروه‌بندی صورت گرفته با نوع محصول سنتی تا حدود زیادی مطابقت داشت. در رابطه با فواصل جغرافیایی و گروه‌بندی به دست آمده، نتایج نیز تا حدودی هم‌خوانی داشت و نمونه‌های باکتری جداسازی شده از محصولات مناطق جغرافیایی مشابه، در گروه‌های نزدیک به هم قرار گرفتند.

برای تعیین صحت درخت ترسیم شده از ضریب کوفنتیک استفاده گردید. مقدار ضریب به دست آمده برابر با ۰/۸۹ بود صحت گروه‌بندی را تایید نمود. تجزیه هماهنگ اصلی[1] (PCOA) و گروه‌بندی براساس دو مولفه اصلی ضمن تایید گروه‌بندی انجام شده، نشان داد که باکتری‌هایی که از محصولات مختلف جداسازی شده بوند در فاصله فضایی دورتری نسبت به هم قرار گرفتند (شکل ۶).

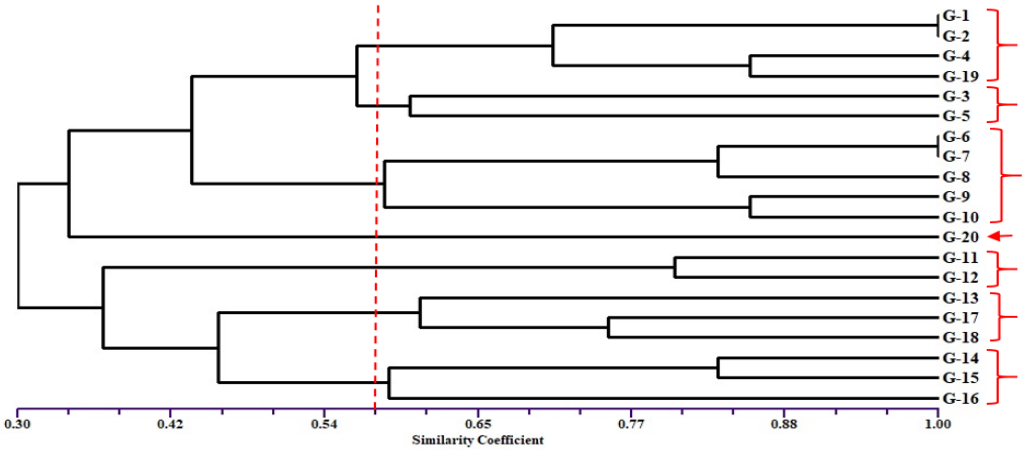

Figure 5-Grouping of studied bacteria using RAPD-PCR marker and obtained genetic distances.

شکل ۵-گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از نشانگر RAPD-PCR و فواصل ژنتیکی به دست آمده.

[1] Principle Coordinate Analysis

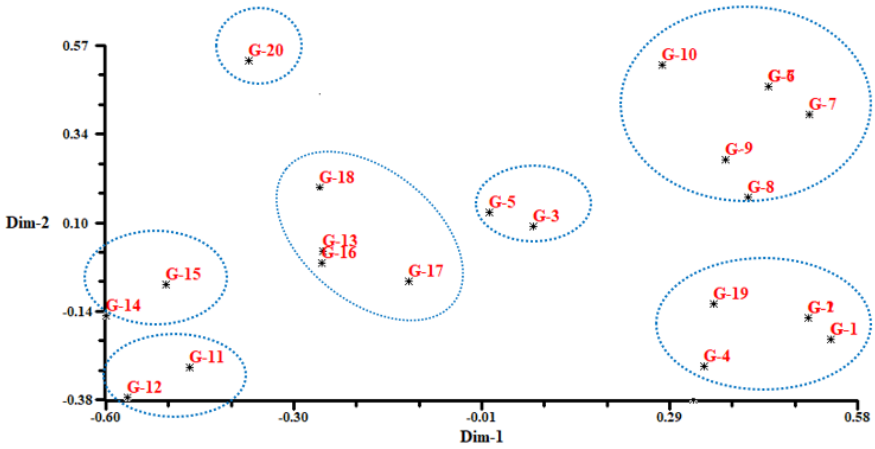

Figure 6- The results of the PCOA and the grouping of the studied bacteria and its two-dimensional diagram.

شکل ۶-نتایج آزمون هماهنگ اصلی (PCOA) و گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه و نمودار دو بعدی آن.

بحث

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که محصولات غذایی سنتی مبتنی بر تخمیر نظیر ترخینه که حاوی فرآورده‌های لبنی می‌باشد، منبع غنی از باکتری‌های اسید لاکتیک از جنس *لاکتوباسیلوس* می‌باشد. علاوه‌بر این ماست محلی که به طور سنتی در مناطق مختلف جغرافیایی به صورت سنتی تولید می‌گردد نیز حاوی طیف گسترده‌ای باکتری‌های اسید لاکتیک است. از این رو می‌توان از این پتانسیل در بهبود محصولات و فرآورده‌های لبنی استفاده نمود.

باکتری‌های جداسازی شده در مطالعه حاضر همگی گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. البته در مراحل اولیه کشت و قبل از تخلیص باکتری‌ها، برخی از کشت‌های سلولی مخلوطی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بودند که با واکشت‌های متعدد و استفاده از محیط کشت اختصاصی و شرایط اسیدی پایین (pH=3)، کلنی‌های خالص گرم مثبت تهیه گردید.

در همین راستا در مطالعه Borga و همکاران (۲۰۱۷) که بر روی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* نمونه‌های ماست سنتی صورت گرفت، بیان شد که همه سویه‌ها گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. همچنین Montazeri و همکاران (۲۰۲۰) بیان کردند که تمامی ۳۶ سویه باکتری اسید لاکتیک مورد مطالعه آنها کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند.

از باکتری‌های جداسازی شده در پژوهش حاضر می‌توان برای تولید محصولات پروبیوتیکی استفاده کرد. بسیاری از پروبیوتیک‌ها به صورت تجاری در بازار موجود هستند، اما پتانسیل پروبیوتیک آنها در یک رژیم غذایی بایستی مورد ارزیابی‌های متعدد قرار گیرد. استفاده از باکتری‌های موجود در محصولات لبنی سنتی می‌تواند اطمینان از مصرف این باکتری‌ها را محصولات غذایی تضمین نماید.

تخمیر روش مهمی برای نگهداری مواد غذایی است. در تخمیر، باکتری‌های اسید لاکتیک به‌عنوان آغازگر فرآیند تخمیر نقش بسیار موثری دارند. غذاهای تخمیر شده حاوی باکتری‌های اسید لاکتیک، ارزش و کیفیت بالاتری دارند. با این حال، همه باکتری‌های اسیدلاکتیک، برای استفاده‌های تجاری و صنعتی، پروبیوتیک‌های خوبی نیستند. باکتری‌های اسید لاکتیک با تحمل اسید و صفرا، مقاومت ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیکی، آبگریزی سطح سلولی، فاقد فعالیت همولیتیک و سمیت سلولی و تجمع خودکار، به عنوان گزینه‌های اصلی یک پروبیوتیک خاص مد نظر محققین و پژوهشگران هستند (Min *et al.*, 2020).

بازار پروبیوتیک‌ها یکی از سریع‌ترین بخش‌های در حال رشد صنایع غذایی است. در حال حاضر انواع مختلفی از محصولات پروبیوتیک وجود دارد و می‌توان آنها را بر اساس شکل، دوز و محل اثر دسته‌بندی کرد. برای افزایش اثربخشی و تولید محصولات پروبیوتیک، ضمن شناسایی و معرفی میکروارگانیسم‌های موثر، باید آن‌ها به‌طور خاص طراحی کرد تا مکان‌های مختلف را هدف قرار دهند (Wang *et al.*, 2022).

نتایج آزمون آنتی‌بیوگرام توانست الگوی مشابهی از حساسیت و مقاومت در باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های ترخینه و ماست محلی نشان دهد. همه باکتری‌های جداسازی شده به آنتی‌بیوتیک کانامایسین و آمیکاسین مقاوم بودند و در مقابل، به آنتی‌بیوتیک‌های جنتامایسین، ونکومایسین و تتراسایکلین حساس بودند.

باکتری‌های اسید لاکتیک عمدتاً به آنتی‌بیوتیک‌های بالینی نظیر پنی‌سیلین، تتراسایکلین، اریترومایسین و کلروآمفنیکل حساس هستند و در مقابل مقاومت نسبتاً بالایی به آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و سیپروفلوکساسین دارند. با این حال الگوی مقاومت و حساسیت این باکتری‌های در سطح گونه و سویه بسیار متفاوت است و ممکن است گونه‌های یک جنس از الگوی متفاوتی برخوردار باشند. ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌های لاکتوباسیل بر روی کروموزوم قرار داشته و از حفاظت شدگی بالایی برخوردار است (Dzidic *et al*., 2008).

در مطالعه Zhang و همکاران (۲۰۱۸) که بر روی الگوی حساسیت و مقاومت باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* موجود در محصولات لبنی اجرا شد، در مجموع بیان شد که استفاده از آزمون آنتی‌بیوگرام می‌تواند ابزار مناسبی برای بررسی و انتخاب باکتری‌های اسید لاکتیک باشد.

ابزارهای مولکولی در تشخیص گونه‌های باکتریایی بسیار موثر هستند. روش‌های مولکولی نقش مهمی در جداسازی و شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی برای مقاصد صنعتی ایفا می‌کنند. تکنیک RAPD نسبت به روش‌های بیوشیمیایی برای ارزیابی تنوع ژنتیکی سویه‌های باکتری مؤثرتر و حساس‌تر است. در مطالعات متعددی برای تمایز باکتری‌های اسید لاکتیک و طبقه بندی مولکولی و تعیین روابط ژنتیکی گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، از نشانگر RAPD استفاده شده است (Dimitonova *et al*., 2008; Markiewicz *et al*., 2010; Ruiz *et al*., 2018).

نتایج بررسی روابط فیلوژنتیکی بین باکتری‌های مورد مطالعه نشان داد که دو سویه باکتری جداسازی شده از ماست با ۹۴ درصد به باکتری *L.rhamnosus* و دو سویه باکتری جداسازی شده از نمونه ترخینه، با ۹۸ درصد به باکتری‌های گونه *L.pentosus* شباهت داشتند. نتایج بررسی تنوع ژنتیکی بین باکتری‌های مورد مطالعه تنوع ژنتیکی بالایی را در بین مناطق مختلف جغرافیایی نشان داد ضمن اینکه باکتری‌های جداسازی شده از ترخینه و ماست نیز از نظر ژنتیکی اختلافات قابل توجهی داشتند و گروه‌های مجزایی قرار تشکیل دادند.

یکی از مهمترین عوامل تنوع ژنتیکی باکتری‌های مختلف، وجود تنوع در شرایط آب و هوایی، محیط رشد و تکثیر آنهاست. بسیاری از سویه‌های جمع‌آوری شده در مطالعه حاضر، دارای شرایط آب و هوایی تقریباً یکسانی بودند و این واقعیت می‌تواند دلیل پایین بودن تنوع ژنتیکی بین برخی از سویه‌ها دانست. ازطرف دیگر حجم کم نمونه‌های مورد بررسی، با توجه به محدودیت‌های موجود را می‌توان دلیل دیگری برای این امر دانست.

مناطق جغرافیایی مختلف به دلیل برخورداری از اقلیم و شرایط آب و هوایی مختلف، فشارهای طبیعی و انتخابی متفاوتی را بر جمعیت باکتریایی تحمیل نموده و سبب تغییرات قابل توجهی در میزان فواصل ژنتیکی در سطح DNA می‌شوند. Abdollahniya و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که سویه‌های *لاکتوباسیلوس* جمع‌آوری شده از نواحی جغرافیایی با فواصل کمتر، بیشترین شباهت ژنتیکی را داشتند و در گروه‌های مشترکی قرار گرفتند.

به نظر می‌رسد که تحقیقات و مطالعات صورت گرفته در زمینه استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک در صنایع غذایی چندان مناسب نیست. بر همین اساس استفاده از روش‌های ژنتیک مولکولی در شناسایی میکروارگانیسم‌های مواد غذایی و میکروبیوم غذا ضروری است. این فناوری‌ها به تسهیل استراتژی‌های مختلف حفاظت زیستی و همچنین ارزیابی اثربخشی آنها کمک می‌کند (Lahiri *et al*., 2022).

نتیجه‌گیری

جمع‌آوری و بررسی مشخصات باکتری‌های بومی جنس *لاکتوباسیلوس* از محصولات لبنی و تخمیری سنتی، علاوه‌بر حفظ ذخایر ژنتیکی کشور، می‌تواند در معرفی سویه‌های مناسب برای استفاده در صنایع غذایی بسیار موثر باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که استفاده از نشانگر RAPD در گروه‌بندی و تعیین روابط فیلوژنتیکی بین باکتری‌های اسید لاکتیک بومی محصولات لبنی و

تخمیری بسیار موثر است.

در مطالعه حاضر از صفات مورفولوژیک، بیوشیمایی و دو گروه از نشانگرهای ژنتیکی مبتنی بر RAPD-PCR و تکثیر ژن 16SrRNA جهت شناسایی و بررسی روابط فیلوژنتیکی و گروه‌بندی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در محصولات لبنی و تخمیری سنتی استان لرستان استفاده شد. نتایج نشان داد که استفاده همزمان چند نشانگر از گروه‌های مختلف نشانگری ضمن شناسایی دقیق‌تر گونه و سویه باکتری‌های مورد مطالعه، کارایی این نشانگرها را مورد تایید قرار داد.

اختلافات مشاهده شده بین باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* مورد بررسی در مطالعه حاضر تا اندازه‌ای با فواصل جغرافیایی مطابقت داشت. وجود شرایط مختلف اقلیمی و همچنین روش‌های متفاوت تولید، فرآوری و نگهداری محصولات لبنی و تخمیری را می‌توان از مهمترین دلایل وجود تنوع ژنتیکی بین باکتری‌های این مناطق دانست.

منابع

Abdollahniya, D., Hosseini, S.M., Baghbaderani, B.K., Mordadi, A. & Arabestani, M.R. (2018). Identification of Lactobacillus species isolated from traditional dairy products using RAPD-PCR. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, *5*(2), 7-13. https://doi.org/10.34172/ajcmi.2018.02

Bogra. M.S., Iqbal, S. & Ershad, K. (2017). Isolation and presumptive characterization of probiotic lactic acid bacteria from yoghurt. *International Journal of Dairy Science and Technology*. 3(2), 172-180.

Chakravorty, S., Helb, D., Burday, M., Connell, N. & Alland, D. (2007). A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *Journal of microbiological methods*, *69*(2), 330-339. https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.02.005.

Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. & Vernoux, J.P. (2003). Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Le Lait*, *83*(4), 269-306. https:// doi.org/10.1051/lait:2003019.

Delgado-Baquerizo, M., Maestre, F.T., Reich, P.B., Jeffries, T.C., Gaitan, J.J., Encinar, D., Berdugo, M., Campbell, C.D. & Singh, B.K. (2016). Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature communications*, *7*(1), 10541. https://doi.org/10.1038./ncomms10541.

Dimidi, E., Cox, S.R., Rossi, M. & Whelan, K. (2019). Fermented foods: definitions and characteristics, impact on the gut microbiota and effects on gastrointestinal health and disease. *Nutrients*, *11*(8), 1806. https://doi.org/10.3390/nu11081806.

Dimitonova, S.P., Bakalov, B.V., Aleksandrova-Georgieva, R.N. & Danova, S.T. (2008). Phenotypic and molecular identification of lactobacilli isolated from vaginal secretions. *J Microbiol Immunol Infect*, *41*(6), 469-477.

Dimitrakopoulou, M.E., Stavrou, V., Kotsalou, C. & Vantarakis, A. (2020). Boiling extraction method vs commercial kits for bacterial DNA isolation from food samples. *Journal of Food Science and Nutrition Research*, *3*(4), 311-319. https://doi.org/10.26502./jfsnr.2642-11000057.

Džidić, S., Šušković, J. & Kos, B. (2008). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects. *Food Technology & Biotechnology*, *46*(1).

Eren, A.M., Ferris. M.J. & Taylor, C.M. (2011). A framework for analysis of metagenomics sequencing data. *Pacistan Bio Computer*, 131-141. https://doi.org/10.5897/AJB2013.12057.

Kim, S., Huang, E., Park, S., Holzapfel, W. & Lim, S.D. (2018). Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Lactobacillus plantarum* K10. *Korean Journal of Food Science of Animal Resources*. 38(3), 554-569. https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.38.3.554.

Kshikhundo, R. & Itumhelo, S. (2016). Bacterial species identification. *World News of Natural Sciences*, *3*.

Lahiri, D., Nag, M., Sarkar, T., Ray, R.R., Shariati, M.A., Rebezov, M., Bangar, S.P., Lorenzo, J.M. & Domínguez, R. (2022). Lactic acid bacteria (LAB): Autochthonous and probiotic microbes for meat preservation and fortification. *Foods*, *11*(18), 2792. https://doi.org/10.3390/foods11182792.

Markiewicz, L.H., Biedrzycka, E., Wasilewska, E. & Bielecka, M. (2010). Rapid molecular identification and characteristics of Lactobacillus strains. *Folia microbiologica*, *55*, 481-488. https://doi.10.1007./s12223-010-0080-z.

Min, K.H., Yin, F.H., Amin, Z., Mansa, R.F. & Ling, C.M.W.V. (2022). An Overview of the Role of Lactic Acid Bacteria in Fermented Foods and Their Potential Probiotic Properties. *Borneo International Journal of Biotechnology (BIJB)*, *2*, 65-83. https//:doi.org/10.51200/bijb.v2i.4186.

Mokoena, M.P. (2017). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, *22*(8), 1255. https://doi.org/10.3390/molecules22081255.

Montazeri, V., Yasaei, G. & Kazemi, M.J. (2020). Isolation, identification, and characterization of lactic acidic bacteria isolated from the raw milk of a single-humped camel. *Microbiology, Metabolites and Biotechnology*, *3*(1), 53-62. https://doi.org/10.22104/ARMMT.2022.5077.1056.

Nazir, Y., Hussain, S.A., Abdul Hamid, A. & Song, Y. (2018). Probiotics and their potential preventive and therapeutic role for cancer, high serum cholesterol, and allergic and HIV diseases. *BioMed research international*. https://doi.org/10.1155/2018/3428437.

Perez, R.H., Zendo, T. & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, *13*(1), 1-13. https://doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S3.

Rodriguez, A.V., Baigorí, M.D., Alvarez, S., Castro, G.R. & Oliver, G. (2001). Phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity in Lactobacillus rhamnosus with capacity to translocate. *FEMS Microbiology Letters*, *204*(1), 33-38. https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10858.x.

Ruiz, P., Izquierdo, P.M., Seseña, S. & Palop, M.L. (2008). Intraspecific genetic diversity of lactic acid bacteria from malolactic fermentation of Cencibel wines as derived from combined analysis of RAPD-PCR and PFGE patterns. *Food Microbiology*, *25*(7), 942-948. https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.06.007.

Sharma, R., Garg, P., Kumar, P., Bhatia, S.K. & Kulshrestha, S. (2020). Microbial fermentation and its role in quality improvement of fermented foods. *Fermentation*, *6*(4), 106. https://doi.org/10.3390/fermentation6040106.

Wang, G., Chen, Y., Xia, Y., Song, X. & Ai, L. (2022). Characteristics of probiotic preparations and their applications. *Foods*, *11*(16), 2472. https://doi.org/10.3390/foods11162472.

Zabat, M.A., Sano, W.H., Wurster, J.I., Cabral, D.J. & Belenky, P. (2018). Microbial community analysis of sauerkraut fermentation reveals a stable and rapidly established community. *Foods*, *7*(5), 77. https://doi.org/10.3390/foods7050077.

Zhang, B., Wang, Y., Tan, Z., Li, Z., Jiao, Z. & Huang, Q. (2016). Screening of probiotic activities of lactobacilli strains isolated from traditional Tibetan Qula, a raw yak milk cheese. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, *29*(10), 1490. https://doi/10.5713/ajas.15.0849.

Isolation, Identification and Fingerprinting of *lactobacillus* Bacteria in Dairy and Fermented Products of Lorestan Province and Determination of Genetic Relationships Between them Using RAPD-PCR Marker

S. Daraei [a], B. Doosty [b], K. Samiei [c*]

[a] MSc Student of the Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

[b] Associate Professor of the Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

[c] Assistant Professor of the Department of Agronomy and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

Received: 11 July 2023 Accepted: 17 September 2023

Abstract

Introduction: Lactic acid bacteria (LAB) are the main and natural components of the microflora of the digestive system. Identification of lactic acid bacteria and their use in the food industry is very important.

Materials and Methods: In order to isolate natural lactic acid bacteria, samples of local yogurt and traditional tarkhineh were collected from different regions of Lorestan province, with respect to suitable geographical distances and different weather conditions. After separating gram-positive and catalase-negative bacteria, 20 lactic acid bacteria were selected and then using specific primers, the 16SrDNA gene was amplified and after alignment and comparison with the NCBI database, the type of bacteria was determined. In order to estimate the genetic diversity between the studied bacteria using the RAPD marker, 4 primers were used. Finally, a phylogenetic tree was made between the studied bacteria.

Results: Based on the antibiogram test, it was found that all the studied bacteria were resistant to kanamycin and amikacin antibiotics and sensitive to gentamicin, vancomycin and tetracycline antibiotics. Bacteria isolated from tarkhineh with 97% similarity and bacteria isolated from yogurt with 89% similarity were placed in the same group. Two bacterial strains isolated from yogurt were 94% similar to *L.rhamnosus* bacteria. In relation to the two bacterial strains isolated from tarkhineh sample, the results showed that these two bacteria were 98% similar to *L. pentosus* bacteria. Based on the results of grouping by RAPD-PCR marker, the studied bacteria formed 6 groups with a similarity coefficient of 57%, and one genotype alone formed one group. Regarding the geographical distances and the grouping obtained, the bacteria samples isolated from the traditional products of similar geographical areas were placed in close groups.

Conclusion: The results generally showed that the use of genetic markers can be very effective in identifying the species and strains of lactic acid bacteria in dairy and fermented products.

Keywords*: *Lactic Acid, Lactobacillus, Phylogenetic, RAPD-PCR.

* Corresponding Author: kamransamiei@yahoo.com