شناسایی تنوع میکروبی سبزیجات شور تخمیر شده با آب گوجه فرنگی با استفاده از تکنیک نسل جدید توالی‌یابی(NGS)

شهره حسامی [۱*]، نفیسه دعوتی [۲]

۱- استادیار،گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی بهار، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
(تاریخ دریافت: ۹۶ /۱۲/۱٤ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۵/۰۲)

چکیده

در سنجش فنوتیپی مجموع ۵۸ باکتری از ۳ نمونه سبزیجات تخمیری جدا گردید. جدایه‌های لاکتیکی براساس خصوصیات فنوتیپی در سطح جنس به صورت ٦٤٪ Lactobacillus، ۵٪Pediococcus، ٤/۵٪Leuconostoc و۲٦/۵٪ جدایه‌های غیرقابل تشخیص شناسایی گردیدند. این شناسایی توسط روش مولکولی مستقل از کشت براساس نسل جدید توالی یابی آمپلیکون‌های ژن 16SribosomalRNA کامل گردید. نواحی V3 و V4 از ژن 16SrRNA تکثیر شد و توسط پلتفرم IlluminaMiSeq توالی یابی شدند. داده‌ها با نرم افزار BaseSpace و بانک اطلاعاتی greengenes بررسی گردیدند. این آنالیز حضور۷۷/۱۲٪ Lactobacillus، ۷/۵۱٪ Pediococcus، ۵/٦۱٪ Leuconostoc، ۱/۲۰٪ Acinetobacter، ۱/۰۰٪ Enterobacter، ۰/۳۵٪ Erwinia و۰/۳۵٪ Dickeya به عنوان جنس‌های غالب و همچنین ۲/۷۹٪ باکتری غیرقابل طبقه بندی را در محصول نشان داد. در سطح گونه به صورت ۳۲٪/۱۹*Lactobacillusbrevis*، ۱۵/۷۱٪ *Lactobacillusjaponicus* ، ۱۳/۲۵٪ *Lactobacilluspentosus*، ۱۰/۲٦٪ *Lactobacillussenmaizukei*، ٤/٦۰٪ *Lactobacillusplantarum*، ۲/٦۵٪ *Leuconostocmesenteroides*، ۲/۳۲٪ *Lactobacillusacidifarinae* و۱۷/۲٦٪ باکتری غیر قابل طبقه‌بندی شناسایی شدند.شناسایی درسطح جنس توسط هر دو سنجش فنوتیپی و مولکولی (NGS)نتایج مشابهی رانشان داد. در این مطالعه، روش نسل جدید توالی‌یابی در شناسایی کامل جامعه میکروبی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی آشکار کرد که فلور میکروبی لاکتیکی غالب شامل Lactobacillus،Pediococcusو Leuconostoc فرایند تخمیر را هدایت می‌کنند. به علاوه باکتری‌های غیرلاکتیکی شامل Acinetobacter، Enterobacter، Erwinia و Dickeya نیز می‌توانند در فرایند رسیدگی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی نقش داشته باشند. باکتری‌هایی پروبیوتیکی نظیر *Lactobacillusplantarum*، *Lactobacilluspentosus*،*Leuconostocmesenteroides* و *Lactobacillusbrevis* نیز در این فراورده تخمیری شناسایی گردیدند.

کلید واژگان: نسل جدید توالی یابی، شوری سبزیجات، آب گوجه فرنگی، تخمیر

*مسئول مکاتبات: shesami@basu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

۱- مقدمه

فرآیند تخمیر متکی بر فعالیت بیولوژیکی ریزسازواره‌ها جهت تولید دامنه‌ای از متابولیت‌هایی است که می‌تواند علاوه بر تغییر بافت، ایجاد رنگ، طعم و آروماى خاص از رشد و بقا فلور میکروبی نامطلوب در مواد غذایی جلوگیری کند. در نتیجه، محصولات تخمیری بطور کلی مدت ماندگاری طولانی‌تری نسبت به مواد اولیه حاصل از آن دارند. تصور می شود که تخمیر تاثیر عمده‌ای بر عادات غذایی و سنت‌ها، فرهنگ، توسعه اقتصادی و انبارداری مواد غذایی داشته است. اکولوژی میکروبی محصولات تخمیری نه تنها جهت شناخت آروما، عطر و طعم حاصل از میکروب‌های مربوطه در محصول نهایی بلکه به دلیل سهم زیاد آن‌ها درتنوع زیستی و حفظ گنجینه‌ای از کشت‌های میکروبی بومی مناطق تولید کننده آن نیاز به مطالعات علمی بیشتری دارند. اخیرا بسیاری از فرآیندهای تخمیری بر روی سبزیجات مختلف در مقیاس صنعتی انجام می‌شوند که اکثرا متکی به استفاده از فلور میکروبی طبیعی موجود در مواد خام، شرایط، مکان و روش تخمیر می‌باشند. حضور باکتری‌های اسید لاکتیک در چنین فرآیندهای تخمیری توسط تکنیک‌های میکروبیولوژی کلاسیک تایید شده است[۱]. باکتری‌های اسیدلاکتیک اهمیت زیادی در فراورده‌های تخمیری دارند و فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرّار موثر در توسعه طعم، آروما وساختارفراورده لبنی شده و همچنین باعث افزایش زمان ماندگاری آن می‌شوند [۲]. برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک پروبیوتیک بوده و می‌توانند به دلیل فعالیت‌های ضدتوموری، کاهش کلسترول سرم، درمان نقص عدم تحمل لاکتوز، تحریک سیستم ایمنی و تثبیت فلور میکروبی دستگاه گوارش اثرات مفید بر سلامت انسان داشته باشند [۳]. تعداد زیادی از سبزیجات تخمیری در مقیاس کوچک در خانه توسط روش‌های سنتی با استفاده از سبزیجات خام تولید می‌شوند. سبزیجات خام فلور میکروبی بالایی دارند و نمی‌توان آن‌ها را پاستوریزه کرد. اغلب سبزیجات تخمیری نتیجه رشد باکتری‌های تطابق یافته با شرایط فراهم شده برای رشد آن‌ها، نظیر باکتری‌های اسید لاکتیک، می‌باشند. این باکتری‌ها در سبزیجات تازه به تعداد بسیار پایین یافت می‌شوند و حدود تنها ۰/۱۵ ٪ تا ۱/۵ ٪ از کل جمعیت میکروبی را شامل می‌شوند. اما شرایط ایجاد شده در تخمیر نظیر pH پایین، حضور نمک و اتمسفر غالبا بی‌هوازی محیط تخمیر باعث غالب شدن فلور میکروبی لاکتیکی می‌شود. در زمینه شناسایی فلور میکروبی سبزیجات تخمیری ایران چندین مطالعه انجام شده است که می‌توان به جداسازی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در انواع ترشی و شور سنتی در تهران، جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتیکی ترخینه و جداسازی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* از خیارشور تخمیری اشاره کرد [۴،۵]. همه این مطالعات انجام شده بر اساس تکنیک‌های وابسته به کشت بوده و تنها بر اساس شناسایی فلور لاکتیکی می‌باشد که فقط بخشی از فلور میکروبی بیوسیستم‌های تخمیری را شامل می‌شود. شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی که به نام سالاد گوجه فرنگی نیز معروف است یکی از محصولات تخمیری بومی منطقه خراسان رضوی در فصل پاییز می‌باشد که ترکیبی از هویج، گل کلم، برگ کلم، فلفل، آب گوجه فرنگی صاف شده، نمک، گلپر و فلفل است. تخمیر آن در دمای پاییزی و مشابه سایر سبزیجات تخمیری در ۲۴ ساعت اول به صورت درب نیمه باز و سپس به صورت درب بسته جهت ایجاد شرایط بی‌هوازی در طی کل فرایند تخمیر می‌باشد. تاکنون هیچگونه مطالعه دقیق و کاملی در ارتباط با شناسایی کل فلور میکروبی هدایت کننده تخمیر این محصول انجام نشده است. در مطالعات اولیهتنوع جامعه میکروبیمحیط تخمیری را توسط جداسازی باکتری‌های قابل کشت و شناسایی آن‌ها توسط روش‌های فنوتیپی به خصوص آنالیزهای بیوشیمیایی نظیر الگوهای تخمیر قند و مورفولوژی سلولی مورد مطالعه قرارمی‌دادند. تفسیر غلط و شناسایی اشتباه جوامع میکروبی بعلت محدودیتهای موجود در این نوع مطالعات اجتناب ناپذیر بود [۱].

آنالیز جامعه میکروبی وابسته به کشت ،و مستقل از کشت بر پایه DNA، علاوه برشناخت تنوع زیستی آن،درک صحیحی از توالی‌های میکروبی در طی تخمیرارائه کرده است. این اطلاعات می‌تواند کمک بزرگی به محققین در درک صحیح تفاوتهای محصولات تخمیری در ارتباط با آروما، عطر و طعم فراهم کند که این تفاوتها می تواند ناشی از اختلاف مواد اولیه، روش و شرایط

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

تولید، منشاء و منبع تولید آن‌ها باشد. روش‌های شناسایی بر پایه DNA می‌تواند در ارزیابی شایستگی و کفایت کشت‌های آغازگر غالب هدایت کننده تخمیر سبزیجات نیزکمک بزرگی نماید[۱]. در سال‌های اخیر با اختراع تکنیک‌های بیولوژی مولکولی درک بهتری از اکولوژی میکروبی سبزیجات تخمیری سنتی حاصل شدهاست که پنجره جدیدی را در مطالعه تخمیرهای غذایی باز می‌کند. هدف از این تحقیقاستفاده ازروش نسل جدید توالی‌یابی به عنوان جدیدترین تکنیک مولکولی مستقل از کشت است کهبرای اولین بار در شناسایی اکولوژی میکروبی شوری سبزیجات با آب گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار می گیرد.با استفاده از این روش می‌توان وجود باکتری‌های پروبیوتیکرا با استناد به تایید پروبیوتیک بودن این باکتریها در مطالعات گذشتهدر این محصول تخمیری بومی بررسی کرد[۳]. این روش اطلاعات کاملی از کل جامعه میکروبی و میزان غالب بودن هر یک از جنس‌ها و گونه‌های موجود را ارائه می‌دهد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه نمونه

سه نمونه شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی مطابق دستورالعمل تجربی آن در منطقه خراسان رضوی که به طور سنتی در منازل استفاده می شود به شرح زیر تهیه گردید:

۱- ابتدا ۲ کیلوگرم گوجه فرنگی را شسته، سپس آن‌ها به چهار قسمت برش می‌دهیم.

۲- به میزان ۳۲ گرم نمک طعام روی آن پاشیده تا نرم شده آب خود را از دست بدهد. سپس مایع حاصل را صاف کرده، تخم و پوست روی صافی را دور می ریزیم.آب گوجه فرنگی حاصل را کمی جوشانده و سپس سرد می‌کنیم.

۳- گل کلم (۰,۵ کیلو)، برگ کلم (۰,۵ کیلو)، هویج (۰,۵ کیلو) و ۲۵۰ گرم سیر را شسته و سپس خشک می‌کنیم.

٤- چند عدد فلفل قلمی تند،۲ گرم گل‌پر و ۲,۳۰ گرم غذاخوری فلفل سیاه خوب را مخلوط می کنیم.

۵- در نهایت مواد حاصل را که خوب مخلوط کرده‌ایم در شرایط کاملا خشک داخل آب گوجه آماده از قبل انتقال می‌دهیم.

٦- جهت انجام دوره رسیدگی و انجام تخمیر ابتدا به مدت ٢٤ ساعت درب ظرف را نیمه باز قرار داده، سپس درب ظرف کاملا بسته شده و به مدت ٤ هفته در دمای پاییزی اتاق قرار داده و اجازه می‌دهیم تا در این مدت عمل تخمیر و دوره رسیدگی طی شود.

۲-۲- جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

در پایان فرایند تخمیر تحت شرایط استریل از هر نمونه، کاملا یکنواخت شده مقدار ۱۰ میلی‌لیتر برداشت گردید. جهت مخلوط کردن مواد در زمان نمونه برداری در طی تخمیر، ظرف درحالیکه درب آن بسته بود چندین بار وارونه گردید و تکان داده شد، بعد از نمونه برداری نیز نمونه در هاون چینی استریل خرد و مخلوط گردید. هرنمونه در آب پپتونه تا رقت $۱۰^{-۷}$ رقیق سازی شد و سپس جهت شناسایی فلور لاکتیکی نمونه تا سطح جنساز رقت‌های مختلف در محیط‌های MRS آگار وM17 آگار کشت داده شد. سپستوسط گازپک نوع A در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. هر کلنی متفاوت از لحاظ رنگ، اندازه، تحدب، تقعر و شکل، توسط کشت خطی تا ۳ مرحله خالص سازی گردیدند. پس از انجام تست کاتالاز و رنگ آمیزی گرم برای هر کلنی، جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی به عنوان جدایه مشکوک به باکتری اسید لاکتیک در نظر گرفته شدند[٦].

۲-۳- شناسایی فنوتیپی جدایه‌های لاکتیکی در سطح جنس

آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص تا سطح جنس برای کلیه جدایه‌ها به صورت زیر صورت گرفت: بررسی رشد در دو دمای ۱۰°C و٤٥°C، دو غلظت ٦/٥٪ و ۱۸٪ کلرور سدیم و pH=۹/٦ و pH=٤/٤. بررسی تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز جهت تشخیص هوموفرمنتاتیو و هتروفرمنتاتیو بودن جدایه ها در محیط MRS براث اصلاح شده حاوی لوله دورهام انجام شد[۷]. به منظور بررسی هیدرولیز آرژنین توسط جدایه‌ها، از محیط ردی براث استفاده شد [۸].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

۲-٤- شناسایی مولکولی مستقل از کشت جامعه میکروبی نمونه شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی

۲-٤-۱- استخراج DNA کل از نمونه

استخراج DNA توسط کیت DNeasy®Blood&TissueKit از شرکت QIAGEN و دستورالعمل مربوطه از هر ۳ نمونه سبزیجات شور بصورت جداگانه انجام گردید.

۲-٤-۲- شناسایی مولکولی به روش Nextgenerationsequencing

DNA نمونه جهت توالی‌یابی به روش Next Generation Sequencing به مرکز آنالیز ژنومیکس پیشرفته دانشگاه گولف کانادا[1] ارسال گردید و کلیه مراحل توالی‌یابی NGS بر اساس پرتوکل Illuminasequencing و توسط دو PCR طبق مراحل زیر انجام گردید:

۲-٤-۲-۱- تهیه 16S DNA Library و انجامAmpliconPCR

تهیه 16S DNA Library از نمونه بر اساس پرتوکل 16S metagenomic sequencing library protocol (Illumina)انجامگردید. PCR اول با پرایمرهای زیر جهت تکثیر نواحی V3و V4 از ژن 16SrRNA برای آمپلیکون به اندازه 460 bp انجام شد.

Forward Primer: TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG

Reverse Primer:GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC

آداپتور Overhang به توالی‌های جفت پرایمر جهت سازگاری با Illuminaindex الحاق گردید که در انجام توالی‌یابی در مراحل بعد نقش دارد. توالی‌های آداپتورIlluminaoverhang به شرح زیر می باشد.

Forward overhang:5’TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence]

Reverse overhang:5’GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-[locus-specific sequence].

واکنش AmpliconPCR توسط مخلوط کردن ۲,۵µl (۵ng/µl) از DNA میکروبی،۵µl از هریک از پرایمرهای اشاره شده در بالا (با غلظت۱µM) و ۱۲,۵µl از 2x KAPA readymix به وسیله دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شاملمرحله فعال سازی[2] در دمای ۹۵°C به مدت ۳ دقیقه، ۲۵ سیکل مراحل واسرشته‌سازی[3] در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال[4] در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه[5] در ۷۲ °C به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت مرحله توسعه نهایی[6] در ۷۲ °C به مدت ۵ دقیقه برای هر نمونه به همراه کنترل انجام گردید.

۲-٤-۲-۲- انجام Index PCR

بعد از تمیزسازی محصول PCR، شاخص‌های دوگانه[7] و آداپتورهای توالی‌یابی Illuminaتوسط کیت Nextera XT Indexبه آن الحاق گردید. لیستی از توالی شاخص‌های مورد استفاده در جدول ۱ نشان داده شده است.

واکنش PCR به حجم ۵۰µL حاوی ۲۵µl از 2x KAPA HiFihotstartreadymixو۵µlاز DNA،۵µlاز هریک از پرایمرهای Nextera XT index 1 و Nextera XT index 2و ۱۰µl آب با درجه PCR به وسیله دستگاه ترموسایکلر با برنامه دمایی شاملمرحله فعال سازی[8] در دمای ۹۵ °C به مدت ۳ دقیقه، ۸ سیکل مراحل واسرشته‌سازی[9] در ۹۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال[10] در ۵۵ °C به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه[11] در ۷۲°C به مدت ۳۰ ثانیه، ودر نهایت مرحله توسعه نهایی[12] در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام گردید.

1. Genomics Facility , Advanced Analysis Centre, University of Guelph

2. Activation
3. Denaturation
4. Annealing
5. Extension
6. Final extension
7. dual indices
8. Activation
9. Denaturation
10. Annealing
11. Extension
12. Final extension

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Table 1 A list of index sequences is provided for generating sample sheets to demultiplex

Index 1 (i7) Sequence	Index 2 (i5) Sequence
N701 TAAGGCGA	S501 TAGATCGC
N702 CGTACTAG	S502 CTCTCTAT
N703 AGGCAGAA	S503 TATCCTCT
N704 TCCTGAGC	S504 AGAGTAGA
N705 GGACTCCT	S505 GTAAGGAG
N706 TAGGCATG	S506 ACTGCATA
N707 CTCTCTAC	S507 AAGGAGTA
N708 CAGAGAGG	S508 CTAAGCCT
N709 GCTACGCT	
N710 CGAGGCTG	
N711 AAGAGGCA	
N712 GTAGAGGA	

۲-٤-۲-۳- توالی‌یابی IlluminaMiSeq

توالی یابی براساس IlluminaMiSeqدر مرکز آنالیز پیشرفته ژنومیکس دانشگاه گولف که قبلا اشاره گردیدصورت گرفت.

۲-۵- آنالیز داده‌ها

داده‌های خام توالی یابی شده به روش NGS توسط cloud-based software, 2016 Illumina, MSR; Metagenomics,version;2.4.60.8 مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز متاژنومیکس بر روی داده‌های 16SrRNA از ناحیه آمپلیکون V3 و V4، ارگانیسم‌ها را به کمک پایگاه داده-Greengenes رده‌بندی کرد. نتایج طبقه بندی ریزسازواره‌ها در سطوح سلسله، رده، راسته، خانواده، جنس و گونه به صورت جداول و به شکل گرافیکی ارائه گردید. میانگین و نوار خطا از درصد فراوانی نسبی گونه‌های باکتریایی از نمونه توسط نرم افزار Microsoft Excel 2010حاصل گردید.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج شناسایی فنوتیپی جنس‌های لاکتیکی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی

بر اساس شناسایی اولیه (مشاهده میکروسکوپی و تست کاتالاز) ۵۸ جدایه میکروبی مشکوک به جدایه لاکتیکی شناسایی شدند. که در مرحله بعد توسط تست‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیبه صورت ٦٤٪ Lactobacillus، ۵٪Pediococcus، ٤/۵٪ Leuconostoc و ۲٦/۵٪ جدایه‌ها غیرقابل شناسایی طبقه‌بندی شدند (جدول ۲).

Table 2 Phenotypic characteristics differentiating lactic acid bacteria isolates of pickled vegetable with tomato juice at genus level

Genus	Lactobacillus	Leuconostoc	Pediococcus	Non-lactic acid bactria genus
Relative abundance	64%	4.5%	5%	26.5 %
Morphology	Rods	Cocci	Cocci	Mix
CO_2 from glucose*	±	+	−	
Growth				
at 10°C	±	+	±	
at 45°C	±	-	±	
in 6.5% NaCl	±	±	±	
in 18% NaCl	-	-	-	
at pH 4.4	±	±	+	
at pH 9.6	−	-	−	

+ positive; - negative; ± varies between species
*test for homo- or heterofermentation of glucose: - homofermentation, + heterofermentation

۳-۲- نتایج شناسایی مولکولی مستقل از کشت جامعه میکروبی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی

درکل تعداد سه خوانش خام ۳۰٦۱۵۵، ۳۱۹۱۰۰ و ۲۸۱۰۸۰ از توالی یابی illumine توسط Miseqplatform از ۳ نمونه حاصل گردید. نتایج یک آنالیز مولکولی توسط تکنیک NGSتا سطح جنس در جدول ۳ نمایش داده می شود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Table 3 Molecular classification results by taxonomic level for pickled vegetable with tomato juice.

Sequencing Statistics

Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering
306,155	251,357	82.1 %

Classification Rate Summary

Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level
Kingdom	251,094	99.90 %
Phylum	250,441	99.64 %
Class	250,141	99.52 %
Order	249,148	99.12 %
Family	248,206	98.75 %
Genus	244,345	97.21 %
Species	206,513	82.16 %

Top Class Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacilli	233,456	92.88 %
Gammaproteobacteria	12,496	4.97 %
Unclassified at Class level	1,216	0.48 %
Betaproteobacteria	911	0.36 %
Alphaproteobacteria	590	0.23 %
Flavobacteriia	587	0.23 %
Sphingobacteriia	514	0.20 %
Nostocophycideae	498	0.20 %

Top Family Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillaceae	214,975	85.53 %
Leuconostocaceae	15,740	6.26 %
Enterobacteriaceae	6,388	2.54 %
Unclassified at Family level	3,151	1.25 %
Moraxellaceae	3,104	1.23 %
Pseudomonadaceae	749	0.30 %
Shewanellaceae	676	0.27 %
Flavobacteriaceae	587	0.23 %

Top Kingdom Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Bacteria	250,843	99.80 %
Unclassified at Kingdom level	263	0.10 %
Viruses	251	0.10 %

Top Phylum Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Firmicutes	233,915	93.06 %
Proteobacteria	14,167	5.64 %
Bacteroidetes	1,109	0.44 %
Unclassified at Phylum level	916	0.36 %
Cyanobacteria	560	0.22 %
DNA	251	0.10 %
Actinobacteria	249	0.10 %
Tenericutes	96	0.04 %

Top Order Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillales	231,971	92.29 %
Enterobacteriales	6,388	2.54 %
Pseudomonadales	3,859	1.54 %
Unclassified at Order level	2,209	0.88 %
Bacillales	899	0.36 %
Alteromonadales	815	0.32 %
Burkholderiales	755	0.30 %
Flavobacteriales	587	0.23 %

Top Genus Classification Results

Classification	Number of Reads	% Total Reads
Lactobacillus	193,848	77.12 %
Pediococcus	18,889	7.51 %
Leuconostoc	14,093	5.61 %
Unclassified at Genus level	7,012	2.79 %
Acinetobacter	3,016	1.20 %
Enterobacter	2,510	1.00 %
Erwinia	885	0.35 %
Dickeya	869	0.35 %

همچنین، سهم جنس‌های لاکتوباسیلوس، پدیوکوکوس و لوکونوستوک و تنوع گونه‌های آن به عنوان جنس‌های غالب در نمونه در بین سایر گونه‌های باکتریایی از سلسله تا گونه به شکل چارت خورشیدی(A) و چارت نواری (B) که توسط آنالیز NGS به دست آمده است در شکل۱ در یک نگاه کلی به خوبی قابل مشاهده است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

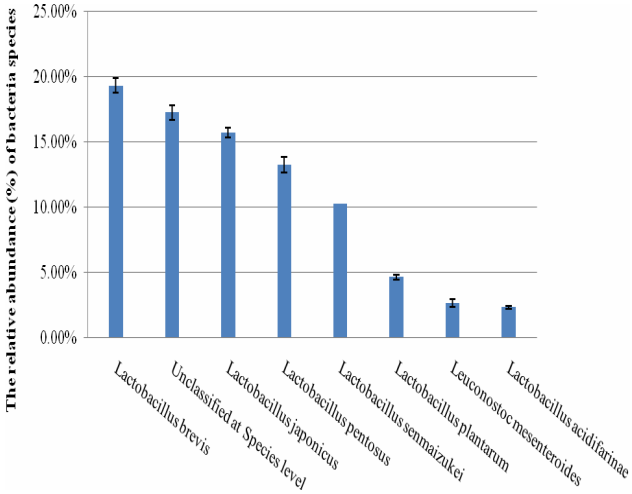


Fig 2 The relative abundance (%) of bacterial species from pickled vegetable with tomato juice.

عدد روی میله‌ها نشان دهنده سن گره‌ها می‌باشد و دورترین برگ دارای سن نزدیک صفر است و گره های نزدیک به ریشه درخت بیشترین سن را دارند. براساس شکل‌های مذکور، در نمونه یک گونه *Chalotrixparietina* مشاهده شده است که در دو نمونه دیگر گزارش نگردید ولی براساس درخت فیلوژنتیکی آن‌ها، سایر گونه‌های مشاهده شده در هر سه نمونه مشترک است.

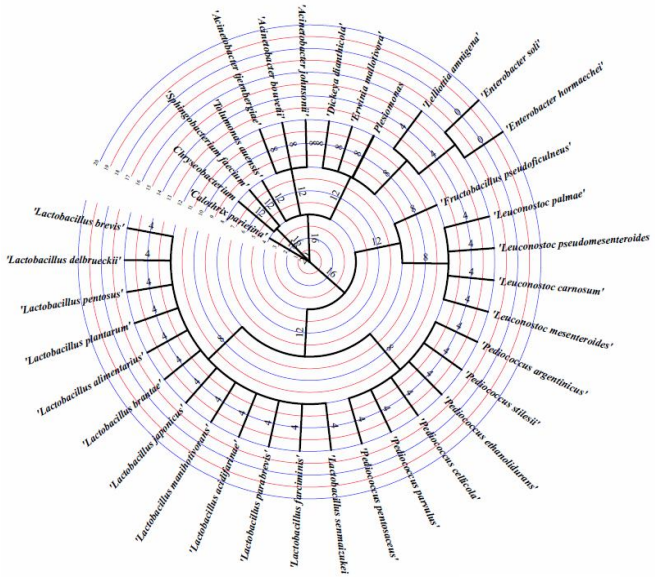
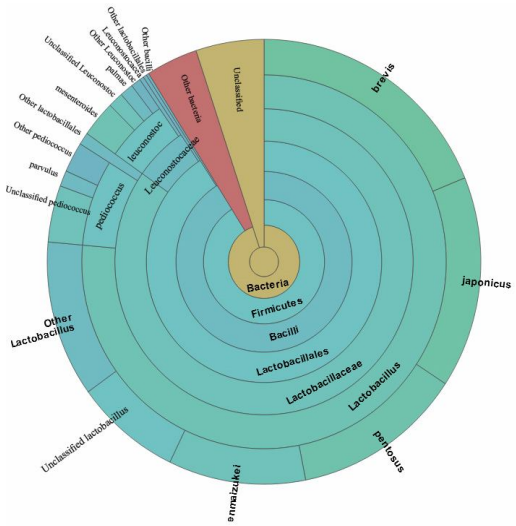


Fig 3 A phylogenetic tree based on next generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons from bacterial community in pickled vegetable with tomato juice(sample 1)



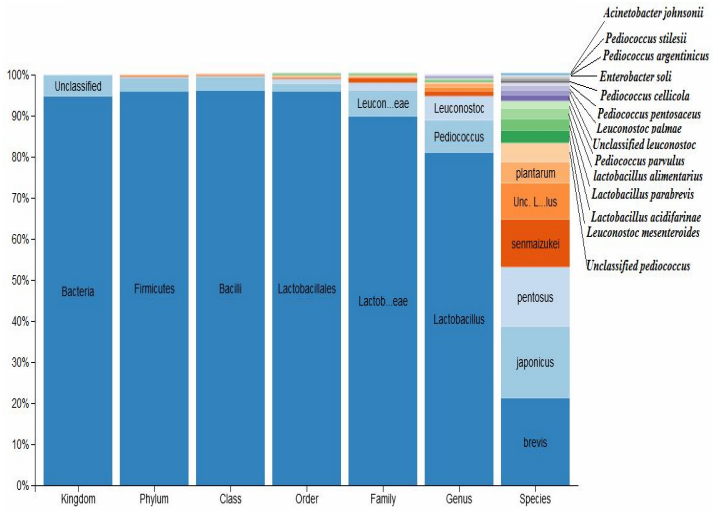


Fig 1 The sunburst chart of the microbial community relative abundance from pickled vegetable with tomato juice (A) andthe bar chart of top 20 bacterial classification results of pickled vegetable with tomato juice within each taxonomic level (B)

در شکل ۲ درصد میانگین فراوانی نسبی گونه‌های غالب باکتری از ۳ نمونه شوری سبزیجات با آب گوجه‌فرنگی به همراه نوار خطای آن‌ها نشان داده می‌شود.

درخت تکامل ژنتیکی دارای ریشه، شاخه و برگ برای گونه‌های شناسایی شده با بیشترین فراوانی از سه نمونه شوری سبزیجات با آب گوجه‌فرنگی که براساس داده‌های حاصل از نسل جدید توالی‌یابی و با بهره گیری از دو سایت https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/CommonTree/wwwcmt.cg و http://itol.embl.de/upload.cgi حاصل گردیده‌اند، در شکل‌های۳، ٤ و ٥ نشان داده شده اند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

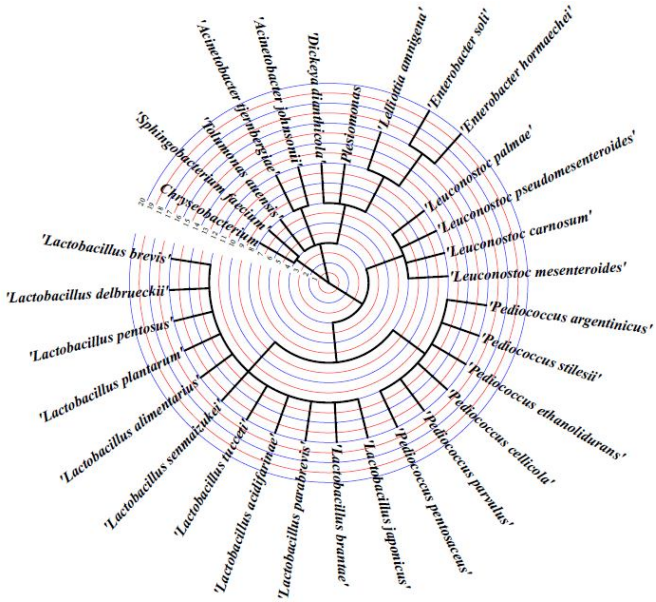


Fig 4 A phylogenetic tree based on next generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons from bacterial community in pickled vegetable with tomato juice (sample 2)

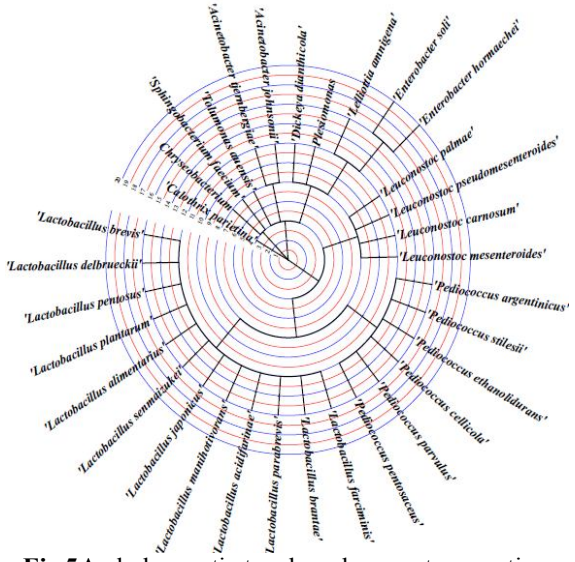


Fig 5A phylogenetic tree based on next generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons from bacterial community in pickled vegetable with tomato juice (sample 3)

۳- بحث

با توجه به مقایسه نتایج روش فنوتیپی و روش مولکولیدر سطح جنس برخی موارد عدم تطابق دیده می‌شود (جداول ۲ و ۳) و نتایج توزیع تنوع ژنتیکی به روش مولکولی با روش فنوتیپی اختلاف دارد. نتایج شناسایی فنوتیپی به دلیل محدودیتهایی از دقت پایین‌تری نسبت به شناسایی مولکولی برخودار است.مورائس و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطالعه‌ای جهت مقایسه دقت دو روش فنوتیپی شامل سیستم API50CHL(شامل تخمیر ۴۹ کربوهیدرات در کنار هیدرولیز اسکولین) و روش بیولوژی (شامل یک پلیت منحصر به فرد برای گرم مثبت‌ها و گرم منفی‌ها جهت تخمیر ۹۶ کربوهیدرات) با دو روش مولکولی توالی‌یابی 16SrDNA و SpeciesspecificPCRreactions برای تعدادی باکتری اسید لاکتیک مشخص انجام دادند. در این مطالعه قابلیت اعتماد به دو روش مولکولی مورد استفاده ۱۰۰٪ بود و تست‌های فنوتیپی قابلیت اعتماد پایین‌تری نشان داد[۹].بطورکلی روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستندکه از آنجمله می توان به موارد زیر اشاره کرد:

تکرارپذیری ضعیف، تغییر شکل باکتری از حالت کروی به میله‌ای کوتاه در طی رشد و بالعکس [۹]، قدرت پایین تمایز[۱۰]، تاثیر پذیری واکنش آنزیمی در تخمیر کربوهیدرات‌ها وابسته به زمان و دمای گرمخانه‌گذاری [۱۱] و عدم بیان برخی ژن‌ها (دخیل در تولید آنزیم‌های تخمیر کننده کربوهیدرات‌ها) در برخی باکتری‌ها که مرتبط با شرایط محیطی می‌باشد[۹]. همچنین اکثر باکتری‌های اسید لاکتیک نیازهای تغذیه‌ای مشابهی برای رشد خود داشته و نتایج شناسایی براساس روش‌های بیوشیمیایی در بسیاری موارد قطعی نبوده و می‌توانند نتایج یکسانی حاصل کنند [۹].

بر اساس جداول ۲ و ۳، هر دو روش‌های فنوتیپی و NGS نتایج مشابهی در شناسایی ترتیب جنس‌های غالب یعنیLactobacillus، Pediococcusو Leuconostoc نشان دادند. ۲۶/۵٪ باقیمانده از جدایه‌های غیرقابل شناسایی توسط روش فنوتیپی، احتمالا مربوط به جنس‌های غیرلاکتیکی قابل کشت بر روی محیط‌های M17 و MRS می‌باشند که توسط روش پیشرفته و دقیق NGS جنس‌های Enterobacter، Erwiniaو Dickeya شناسایی گردیدند.

براساس نتایج شناسایی مستقل از کشت توسط NGS به ترتیب گونه‌های غالب باکتریایی شامل ۱۹/۳۲٪

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Lactobacillusbrevis، ٪۱۷/۲۶ باکتری غیرقابل طبقه بندی، ٪۱۵/۷۱ *Lactobacillusjaponicus*، ٪۱۳/۲۵ *Lactobacilluspentosus*، ٪۱۰/۲۶ *Lactobacillussenmaizukei*، ٪٤/٦۰ *Lactobacillusplantarum*، ٪۲/٦۵ *Leuconostocmesenteroides* و ٪۲/۳۲ *Lactobacillusacidifarinae* بودند (شکل ۲) که چنانچه شناسایی فنوتیپی توسط روش‌های وابسته به کشت تا سطح گونه انجام می‌شد ممکن بود بسیاری از این گونه‌های باکتریایی توسط کشت قادر به بازیافت از نمونه نبوده و در نتیجه شناسایی نمی‌گردیدند.به دلایل متعددی که در زیر اشاره می‌شود روش مولکولی مستقل از کشت نسبت به روش‌های وابسته به کشت بیشتر مورد تایید بوده و نتایج آن معرف بهتری از جامعه میکروبی نمونه می‌باشد.شناسایی باکتری‌ها به روش وابسته به کشت دارای معایبی است. از جمله اینکه به دلیل تنش‌های محیطی و حتی اختصاصی بودن برخی محیط‌های کشت، برخی باکتری‌ها ضعیف شده، یا از بین رفته و قادر به رشد بر روی محیط کشت، تشکیل کلنی و قابل شناسایی نمی باشند. مطالعات نشان داده است که اکثریت عظیمی از تنوع زیستی میکروبی بوسیله روش‌های مبتنی بر پایه کشت از دست رفته و اطلاعات حاصل از شناسایی آن‌ها کامل نمی‌باشد. همچنین بسیاری از باکتری‌ها را نمی‌توان در شرایط آزمایشگاه کشت داد که این موضوع در درک فیزیولوژی، ژنتیک و اکولوژی جامعه میکروبی محدودیت ایجاد می‌نماید. بنابراین روش‌های شناسایی مولکولی مستقل از کشت بسیار در این زمینه مفید می‌باشند. استفاده از دانش وابزاری جامع به نام متاژنومیکس راه حل مناسب رفع این مشکل است. متاژنومیکس اجازه مطالعه اکولوژی میکروبی در سطح بسیار بالاتر و جزئی تر از قبل را می‌دهد. هدف ما در این مطالعه نیز استفاده از تکنیک متاژنومیکس بر پایه نسل جدید توالی‌یابی جهت شناسایی دقیق و کامل جامعه میکروبی نمونهبود.در مطالعه حاضربا استفاده از تکنیک NGSعلاوه بر جنس‌های لاکتیکی نظیر Pediococcus، Leuconostoc و Lactobacillus، حضور جنس‌های غیر لاکتیکی نظیر Acinetobacter، Enterobacter، Erwinia و Dickeya نیز در فرایند تخمیر تایید گردید. مشابه تحقیق ما، براساس مطالعات انجام شده در دنیا بر روی فرایندهای تخمیری شور سبزیجات ثابت شده است که جنس Lactobacillus بطور عمده در کنار جنس‌های Pediococcus و Leuconostoc وجود دارند که در عمل تخمیر ایفای نقش می‌کنند [۱،۱۲]. همانطور که درجدول ۳ مشاهده می‌شود در فرایند تخمیر شوری مورد مطالعه ما مشابه سایر مطالعات، بیشترین سهم را جنس Lactobacillus و سپس جنس‌های Pediococcus و Leuconostoc دارند. در بین گونه‌های باکتریایی شناسایی شده غالب به ترتیب ٪۱۹/۳۲ *Lactobacillusbrevis*، ٪۱۵/۷۱ *Lactobacillusjaponicus*، ٪۱۳/۲۵ *Lactobacilluspentosus*، ٪۱۰/۲۶ *Lactobacillussenmaizukei*، ٪٤۰/٦۰ *Lactobacillusplantarum*، ٪۲/٦۵ *Leuconostocmesenteroides* و ٪۲/۳۲ *Lactobacillusacidifarinae* بیشترین سهم را در تخمیر دارند. براساس مطالعات قبلی انجام شده در بین میوه‌ها و سبزیجات تخمیر شده به صورت خودبه خودی، باکتری *Lactobacillusplantarum* از گوجه‌فرنگی، هویج، بادمجان، چغندر قرمز، خیار، پاپایا، کلم، رازیانه، کیوی، آناناس، آلو و گیلاس; باکتری*Lactobacilluspentosus*از بادمجان، پاپایا و خیار;باکتری*Lactobacillusbrevis* از گوجه‌فرنگی، بادمجان، کلم، خیار، هندوانه; باکتری *Leuconostocmesenteroides*از کلم سفید، هویج، فلفل، خیار ، بادمجان، کاهو و توت‌ها; باکتری *Pediococcuspentosaceus* از لوبیاسبز تازه، گوجه فرنگی، گیلاس و کلم; باکتری‌های *Enterococcusfaecalis* و*Enterococcusfaecium*از گوجه‌فرنگی و لوبیای سبز تازه جدا گردیده اند[۱۳]. مشابه مطالعه ما، تحقیقات گذشته بر روی فراورده‌های تخمیری شوری سبزیجات نظیر ساورکرات حضور گونه‌های میکروبی مشابه را ثابت کرده است. بطوریکهتخمیر توسط*mesenteroidesLeuconostoc*شروع می‌شود. این باکتری قند را به اسید لاکتیک، اسید استیک، الکل، دی اکسید کربن و سایر متابولیت‌های میکروبیکه در طعم کلم ترش شرکت می‌کنند تبدیل می‌کند. دی اکسیدکربن به حفظ شرایط بی‌هوازی در تخمیر کلم برگ کمک می‌کند. زمانی که اسید تجمع می‌یابد، از رشد *mesenteroidesLeuconostoc* ممانعت می‌شود. اما تخمیر با رشد *Lactobacillusbrevis* و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Pediococcuscervisiae و سرانجام *Lactobacillusplantarum* ادامه می‌یابد. مطالعه انجام شده بر روی فرایند تخمیرخیار شور نشان داده است که که قندی که از خیاربه محیط بیرون منتشر می‌شود، به طور متوالی توسط *Mesemteroides ,Lactobacillusplantarum, Lactobacillusbrevis, pediococcuscervisiaeLeuconostoc* تخمیر می‌شود. بسته به شرایط تخمیر، حدود ۰/٦ تا ۱/۲ ٪ اسید لاکتیک در طی ۷ تا ۱٤روز تشکیل می‌شود. چون pH تا ۳/۲ پایین آمده است، متابولیسم *L.plantarum* متوقف می‌شود[۱۲]. همچنین مطالعات انجام شده اخیر برای شناسایی فلور میکروبی زیتون‌های سبز تخمیر شده بر اساس تکنیک RFLP- PCR برروی ژن ۱٦SrRNA، علاوه بر آنکه حضور فلور میکروبی ناهمگنی را تایید کرد، نشان داد که فلور غالب قوی در این جدایه‌ها متعلق به *Lb.casei* می باشد. گونه‌های انتروکوکوس شامل *E.faecium, E. caseliflavus* و *E. hirae* نیز شناسایی شدند[۱]. در مطالعه دیگری حضور *Lb. plantarum, Lb. paraplantarum ,Lb. pentosus* در ۲۵ نمونه زیتون سبز توسط تکنیک FluorescentinsituhybridizationFISH با پروب های شناسایی ویژه در سطح گونه تایید شد. همچنین بررسی و شناسایی کلنی‌های رشد یافته روی پلیت‌های حاوی rogosaagar توسط PCR-DGGE نشان داد که *Ln. pseudomesenteroides* در میوه زیتون وجود دارد. در این مطالعهجنس‌های دیگرنظیر Pediococcus, Pseudomonas, Raoultella نیز شناسایی شدند. این مطالعه نشان داد که هدایت اصلی تخمیر این نوع زیتون توسط لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد که از سایر منابع نظیر منابع گیاهی و تانک های تخمیر علاوه بر ابزارهای مورد استفاده در تولید منشا می‌گیرند[۱،۱٤].

NamBui و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه خود در جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس‌های غذای تخمیری گیاهی به نام کیمچی سنتی موفق به شناسایی گونه جدیدی از جنس Lactobacillus به نام *Lactobacilluskoreensis* شدند آن‌ها همچنین نشان دادند که *Lactobacillusbrevis*نیز یکی از فلور باکتریایی اصلی این تخمیر می‌باشد[۱۵].

در مطالعهمانقش *Lactobacillusbrevis*به عنوان فلور غالب تایید شد که احتمالا از اواسط تخمیر تا انتهای تخمیرحضورداشته است، همچنین *Lactobacillusplantarum* نیز به میزان نسبتا کمتری شناسایی شد که احتمالا نظیر سایر تخمیرهایمشابه سبزیجات در انتهای تخمیر شروع به فعالیت کرده اما نتوانسته است فلور میکروبی غالب را تشکیل دهد. حضور گونه‌های متفاوت دیگری نظیر *Lactobacillusjaponicus*، *Lactobacilluspentosus*، *Lactobacillussenmaizukei* و *Lactobacillus*acidifarinae (شکل ۱) که قبلا در مطالعات مشابه کمتر گزارش شده است می‌تواند نشان دهد که دقت بالای روش NGS قادر به شناسایی این گونه شده است ویااین محیط تخمیری شرایط منحصر به فردی را برای رشد این گونه‌های نامتداول میکروبی در محصول تخمیری شور سبزیجات فراهم کرده است. باکتری *senmaizukeiLactobacillus* تشخیص داده شده در مطالعه ماکه اخیرا شناسایی شده است اولین بار از محصول شور ژاپنی جدا و شناسایی گردید[۱٦].

در اکثر مطالعات مشابه انجام شده تنها حضور گونه‌های *Pediococcuscervisiae* و *Pediococcuspentosaceus* در تخمیر گزارش شده است در صورتیکه در مطالعه ما گونه‌های متفاوت دیگری از پدیوکوکوس شامل *PediococcusPentosaceus, Pediococcusparvulus, Pediococcuscellicola, Pediococcusargentinicus* تایید شد که *Pediococcusparvulus* سهم بیشتری داشته است (شکل ۱). به علاوه حضور گونه *Leuconostocpalmae* که در گذشته در محصولات تخمیری شور سبزیجات گزارش نگردیده بود نیز درخور توجه است. حضور *Enterobactersoli* نیز می‌تواند به دلیل وجود آلودگی‌های محیط زیستی به باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه باشد که از طریق آبیاری با فاضلاب، خاک، دام، ظروف آلوده انتقال، دست آلوده کارگران و هوای آلوده به مواد اولیه تولید این محصول تخمیری شامل هویج، گل کلم، کلم برگ منتقل شده باشد.Erwiniaاز جنس‌های نامتداول میکروبی گزارش شده در این نوع محصول تخمیری است که در محصولات تخمیری مشابه گزارش نگردیده است. البته از آنجاییکه هویج از مواد اولیه تهیه این محصول است و در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

مطالعات بر روی محصولات مشابه از هویج استفاده نشده است حضور جنسErwinia و گونه *Erwiniacarotovora*، گونه متداول جدا شده از هویج، دور از ذهن نیست[۱۷].

٤- نتیجه‌گیری

براساس نتایج این مطالعه بر روی محصول شور سبزیجات نشان داده شد که این محصول اکوسیستم پیچیده‌ای از باکتری‌ها را دربر دارد. قدرت بالای تکنیک NGS در شناسایی جامعه میکروبی این محصول تخمیری حضور بسیاری از گونه‌های میکروبی نظیر *Lactobacillus japonicas*, *Lactobacillus senmaizukei, Lactobacillus* acidifarinae, *PediococcusPentosaceus, Pediococcusparvulus, Pediococcuscellicola, Pediococcusargentinicus* را تایید کرد که در سایر مطالعات انجام شده بر روی شور سبزیجات تهیه شده از مواد اولیه مشابه نمونه مورد مطالعه ما کمتر مشاهده شده یا اصلا گزارش نگردیده است. این تکنیک همچنین حضور جنس‌های غیرلاکتیکی نظیر *Erwinia*و Dickeya را در تخمیر نشان داد. از آنجاییکه تکنیک‌های مورد استفاده در مطالعات مشابه قبلی بیشتر براساس روش‌های وابسته به کشت و با تمرکز بر شناسایی فلور لاکتیکی می‌باشند به دلایل اشاره شده در قبل نتوانسته‌اند در شناسایی کل جامعه میکروبی موفق عمل کنند و این نشان می‌دهد که تکنیک NGS در درک جوامع میکروبی و مطالعات محصولات تخمیری موفق‌ترعمل می‌کند. بهتر است اکولوژی میکروبی این شوری سبزیجات با آب گوجه‌فرنگی در طی مراحل مختلف تخمیر نیز در مطالعات آتی بررسی گردد. تا اطلاعات جامع و کامل‌تری از دینامیک این تخمیر حاصل گردد. همچنین براساس نتایج مطالعه ماحضور باکتری‌هایی نظیر *Lactobacillusplantarum*، *Lactobacilluspentosus*، *Leuconostocmesenteroides* و *Lactobacillusbrevis* که قبلا ویژگی پروبیوتیکی آن‌ها ثابت شده است نشان می‌دهد که مصرف این فراورده تخمیری می‌تواند به عنوان یک غذای عملگر با ویژگی پروبیوتیک بودن آن توصیه شود. پیشنهاد می‌شود برای اطمینان از ویژگی عملگر بودن این ماده غذایی، خصوصیات پروبیوتیکی جدایه‌های لاکتیکی در مطالعات آتی بررسی گردد.

٥- منابع

[1] Cocolin, L., Ercolini, D. (Eds.). (2007). Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods. Springer Science & Business Media.

[2] Khedid, K., Faid, M., Mokhtari, A., Soulaymani, A.,&Zinedine, A. (2009). Characterization of lactic acid bacteria isolated from the one humped camel milk produced in Morocco. *Microbiological research*, 164(1), 81-91.

[3] Ashmaig, A., Hasan,A., & Gaali El, E. (2009). Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional Sudanese fermented camel's milk (Gariss). *African Journal of Microbiology Research*, 3(8), 451-457.

[4] Nilchian, Z., Rahimi, E., Razavi, S. H &MomeniShahraki. M. (2016). Isolation and Identification of *L. plantarum*from Iranian Fermented Cucumbers by Conventional Culture and PCR Methods. *Journal of Food Biosciences and Technology*, 6(1), 69-76.

[5] Vasiee, A.R., Mortazavi, A., Tabatabaei-yazdi, F. and EdalatianDovom. M.R. (2018). Detection, identification and phylogenetic analysis of lactic acid bacteria isolated from Tarkhineh, Iranian fermented cereal product, by amplifying the 16s rRNA gene with universal primers and differentiation using rep-PCR. *International Food Research Journal*, 25(1), 423-432

[6] Harrigan, W. (1998). Laboratory methods in food microbiology: Gulf Professional Publishing.

[7] Salminen, S.,& Von Wright, A. eds. (2004). Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. CRC Press. Marcel Dekker, 139, 73-103.

[8] Cardinal. M. J., Meghrous, J., Lacroix, C., &Simard, R. E. (1997). Isolation of Lactococcus Lactis Strains Producing Inhibitory Activity against Listeria. *Food Biotechnology,* 11(2), 129-46.

[9] Moraes, P. M., Perin, L. M., Silva, J. A.,& Nero, L. A. (2013). Comparison of phenotypic and molecular tests to identify lactic acid bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 109-12.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

[10] Mohania, D., Nagpal, R., Kumar, M., Bhardwaj, A., Yadav, M., Jain, S., Marotta, F., Singh, V., Parkash, O.,&Yadav, H. (2008). Molecular approaches for identification and characterization of lactic acid bacteria. *Journal of digestive Diseases*, 9(4), 190-198.

[11] Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M.,& Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS microbiology letters*, 251(2), 267-271.

[12] Banwart, G. (2012). Basic food microbiology. Springer Science & Business Media.

[13] Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M., &Gobbetti, M. (2013). Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. *Food Microbiology*, 33(1), 1-10.

[14] Blana, V. A., Grounta, A., Tassou, C. C., Nychas, G. J. E., &Panagou, E. Z. (2014). Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food microbiology*, 38, 208-218.

[15] Bui, T. P. N., Kim, Y. J., In, J. G., & Yang, D. C. (2011). Lactobacillus koreensis sp. nov., isolated from the traditional Korean food kimchi. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(4), 772-776.

[16] Weckx, S., Van der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., & De Vuyst, L. (2010). Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Applied and environmental microbiology*, 76(16), 5402-5408.

[17] Perombelon, M.C .M. The Prokaryotes. Second Edition. p2899- 2921.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Identification of microbial diversity of fermented pickled vegetable with tomato juice using Next-Generation Sequencing technique

Hesami, Sh. [1*], Davati, N. [2]

1. Assistant professor, Department of Biology, Faculty of Science, Bu-Ali Sina University.Hamedan, Iran.
2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University.Hamedan, Iran.

(Received: 2018/03/05 Accepted:2018/07/24)

A total of 58 bacteria fromthree fermented vegetables samples were isolated. These isolates were identified as 64% Lactobacillus, 5% Pediococcus, 4.5% Leuconostoc and 26.5% unclassified bacteria based on phenotypic characterizations using morphological and biochemical tests. This identification was completed by culture-independent molecular method based on next-generation sequencing of 16S ribosomal RNA gene amplicons. The V3 and V4 regions of 16S rRNA gene were amplified and sequenced using IlluminaMiSeq platform. These data were analyzed employingBaseSpace software andGreengenes database. The analysis revealed 77.12% Lactobacillus, 7.51% Pediococcus, 5.61% Leuconostoc, 1.20% Acinetobacter, 1.00% Enterobacter, 0.35% Erwinia, 0.35% Dickeyaas the predominant genera and 2.79% unclassified bacteria. At species level, 19.32% *Lactobacillus brevis*, 15.71% *Lactobacillus japonicus*, 13.25% *Lactobacillus pentosus*, 10.26% *Lactobacillus senmaizukei*, 4.6% *Lactobacillus plantarum*, 2.65% *Leuconostocmesenteroides* and 2.32% *Lactobacillus acidifarinae*and 17.26% unclassified bacteria were identified. The same identification resultswereobtainedby both phenotypic andNext- generation sequencing assays at genus level.In this study, application of next generation sequencing in identification of whole microbial community of this fermented product revealed that lactic acid bacteria include Lactobacillus, Pediococcusand Leuconostoc as dominant flora, were involved in fermentation process. Non-lactic acid bacteria such as Acinetobacter,Enterobacter,Erwinia and Dickeyageneramayplay important role in fermented pickled vegetable with tomato juice ripening. Moreover, probiotic bacteria such as *Lactobacillus plantarum,Lactobacilluspentosus,Leuconostocmesenteroides* and *Lactobacillus brevis*were identified in this fermented product.

Keywords: Next-Generation Sequencing, Pickled vegetable, Tomato juice, Fermentation.

* Corresponding Author E-Mail Address: shesami@basu.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]