بررسی تنوع باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از کشک زرد زابلی (سیستانی) با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA

فریده طباطبایی یزدی[1*]، علیرضا وسیعی[2]، بهروز علیزاده بهبهانی[2]، سید علی مرتضوی[1]

۱- استاد و عضو هئیت علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۴/۷/۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۲۳)

چکیده

کشک زرد زابلی (سیستانی) یک فراورده تخمیری غله‌ای-لبنی محسوب می شود که در استان سیستان بلوچستان مصرف فراوانی دارد. هدف از انجام این پژوهش شناسایی فلور لاکتیکی کشک زرد زابلی، به منظور معرفی سویه‌های بومی این فراورده بوده است؛ که می‌توانند در سطح تجاری (صنعت) استفاده شوند و نیز ممکن است برخی از آن‌ها به عنوان پروبیوتیک مطرح باشند. ۸۳ جدایه که با انجام آزمایش‌های اولیه به نظر می‌رسید جزو باکتری‌های اسید لاکتیک باشند انتخاب شده و برای گروه‌بندی آن‌ها، بررسی‌های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی شامل رشد در دماهای ۱۰°C و ۴۵°C ، رشد در ۶/۵٪ نمک، رشد در pH=۴/۴ و pH=۹/۶، تولید گاز دی اکسید کربن و تخمیر کربوهیدرات‌های مختلف انجام پذیرفت. در پایان ۲۸ جدایه با استفاده از روش تعیین توالی 16S rDNA با موفقیت شناسایی شدند. نتایج نشان داد که این جدایه ها متعلق به جنس های: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (۲۴/۰۹٪)، *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* (۱۳/۲۵٪)، *لاکتوباسیلوس برویس* (۹/۶۳٪)، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* (۱۸/۰۷٪)، *لاکتوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس* (۱۳/۲۵٪)، *لوکونستوک مزنتروئیدس* زیرگونه *مزنتروئیدس* (۹/۶۳٪)، *لوکونستوک سیترئوم* (۲/۴۰٪) و *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* (۹/۶۳٪) شناسایی شدند. در مورد شناسایی باکتری ها، مخصوصا باکتری های خانواده اسید لاکتیک پیشنهاد می شود از هر دو روش مبتنی بر کشت و مولکولی استفاده شود.

کلید واژگان: کشک زرد زابلی، غذای تخمیری، باکترهای اسید لاکتیک، ژن 16S rRNA، جداسازی

* مسئول مکاتبات: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۱- مقدمه

کشک زرد سیستانی یکی از غذاهای مقوی قوم سیستان است که از موادی چون دوغ ترش، آرد گندم، زیره، تخم شوید، گشنیز، فلفل سیاه، سیر، زردچوبه و پیاز تشکیل شده است. این مجموعه را به مدت ۵ روز تا یک هفته در کیسهٔ نخی می‌گذارند، سپس آن را درآورده و پس از ورزدادن، پودر می‌کنند. کشک زرد زابلی به صورت یک غذای کامل و مقوی در مدت کوتاهی طبخ می‌شود. برای مصرف، مقداری از آن را با روغن و پیاز سرخ می کنند، سپس رویش آب می ریزند و می گذارند تا بجوشد. کشک به دلیل داشتن کالری بالا و جلوگیری از ضعف های مکرر برای کسانی که اضافه وزن دارند توصیه می شود. همچنین برای کسانی که دچار سرماخوردگی هستند و یا از بیماریهایی چون دیابت، چربی خون، یوبوست و بیماری های کلیوی رنج می برند، مفید است [۱].

باکتری‌های اسید لاکتیک جزء فراوان‌ترین باکتری‌های مرتبط با انسان می‌باشند که در سطوح مخاطی و دستگاه گوارش انسان حضور پررنگی دارند [۲و۳]. باکتری‌های اسید لاکتیک، اگر چه دارای جنس و گونه های پاتوژن مانند استرپتوکووس می‌باشند. اما اکثر سویه های آن غیر پاتوژن بوده و در فرایند تخمیر مواد غذایی چه بصورت صنعتی و چه بصورت سنتی نقش بسزایی دارند و جز باکتری های مفید در نظر گرفته می‌شوند [٤]. باکتری‌های اسید لاکتیک دارای ویژگی‌های خاص و منحصر بفرد مورفولوژیکی، متابولیکی و فیزیولوژیکی می باشند، به شدت پر توقع هستند و نیاز به یک منبع خارجی از اسیدهای آمینه یا پپتیدها دارند که این منبع می‌تواند از طریق پروتئولیز کازئین، که فراوان‌ترین پروتئین شیر و منبع عمده اسیدهای آمینه است، فراهم گردد. همچنین محصول نهایی حاصل از تخمیر کربوهیدرات‌ها، اسید لاکتیک می‌باشد [۵].

شناسایی فلور میکروبی مواد غذایی تخمیری پیچیده به نظر می‌رسد. روش‌های سنتی دارای محدودیت‌های فراوانی هستند. در شناسایی فلور میکروبی با استفاده از روش های سنتی و مبتنی بر کشت عموما باکتری های غالب شناسایی می شوند. اما سویه-هایی که از نظر تعداد اقلیت هستند، ولی جهت توسعه‌ی عطر و طعم، اهمیت دارند با این روش‌ها قابل شناسایی نیستند. با وجود اینکه استفاده از روش‌های سنتی مشمول محدودیت هایی از قبیل تکرار پذیری پایین و وقت گیر بودن می باشند اما به‌کارگیری این روش‌ها به عنوان پیش درآمدی بر روش‌های دقیق‌تر و دسته‌بندی اولیه میکروارگانیسم‌ها، در اکثر تحقیقات مربوط به شناسایی فلور لاکتیکی مواد غذایی تخمیری امری معمول و مفید می‌باشد [٦]. از زمان کشف PCR و تعیین توالی ژن، مقایسه‌ی توالی ژن در باکتری‌های مختلف نشان داد که ژن 16S ریبوزومی در بین یک گونه و از گونه‌ای به گونه‌ی دیگر به صورت دست نخورده و محافظت شده باقی مانده و به عنوان استاندارد طلایی برای تعیین گونه‌های باکتریایی قابل استفاده است. همچنین وجود مناطق متغیر در ژن‌های ریبوزومی باعث تمایز فیلوژنتیک در سطوح مختلف می‌شود که می‌تواند منبعی برای طبقه بندی باشد. از محاسن این تکنیک کاربرد آن در روش‌های وابسته به کشت و همچنین مستقل از کشت است [۷]. روش‌های ژنوتیپی مبتنی بر تکنیک‌های مولکولی برای انگشت‌نگاری الگوهای اختصاصی DNA که خصوصیّات یک نژاد منفرد را تعیین می‌نماید، قدرتمند بوده و روش اصلی طبقه‌بندی نژادی باکتری‌های اسید لاکتیک را ایجاد می‌کنند [۸].

ژن مربوط به RNA ریبوزومی حفاظت شده‌ترین ژن درون هر سلول است. rDNA توالی‌یابی شده از موجودات مختلف به طور قابل توجهی شباهت نشان می‌دهند. این به این معنی است که توالی‌های بدست آمده از موجودات مختلف می‌توانند با هم مقایسه شده و به صورت گسترده‌ای برای تعیین تاکسونومی، فیلوژنیک و تخمین تنوع بین باکتری‌ها استفاده شود. بنابراین توالی 16S rRNA می‌تواند روابط تکامل بین میکروارگانیسم‌ها را نشان دهد [۹].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

بیلکوآ[1] و همکاران (۲۰۰۸) طی تحقیقی برای شناسایی ۳ جنس از *لاکتوباسیلوس* از روش تکثیر 16S rRNA استفاده کردند و با درصد تطابق بالای ۹۹٪ موفق به شناسایی این جنس‌ها شدند. آن ها کاربرد روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به تنهایی را مبهم معرفی کردند [۱۰].

سنگان[2] و همکاران (۲۰۰۹)، به وسیله ی ترکیبی از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای اولین بار اقدام به تعیین جنس و گونه های ایزوله‌های ترهانا نمود. در مجموع ۲۲۶ ایزوله گرم مثبت و کاتالاز منفی از محیط کشت‌های MRS و M17 جدا شدند. جهت شناسایی و دسته‌بندی ایزوله‌ها به روش مولکولی از PCR چندگانه[3]، PCR مبتنی بر توالی اجزای تکراری و توالی یابی ژن 16S rRNA استفاده گردید بر این اساس ایزوله ها به ۱۱ گروه تقسیم گردیدند که *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بیشترین درصد را به خود اختصاص داد [۱۱].

هدف از انجام این پژوهش بررسی فلور لاکتیکی فراورده تخمیری لبنی-غله ای کشک زرد زابلی، به عنوان یک ماده غذایی سنتی و بومی بوده است، که توان بالایی برای ایجاد خصوصیات مثبت در فرد مصرف کننده دارد.

۲- مواد و روش

۲-۱- نمونه برداری

هفت نمونه کشک زرد از شهرستان زابل تحت شرایط یخچالی و با رعایت استاندارهای لازم به استان خراسان رضوی (مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد) منتقل شدند. لازم به ذکر است که جهت دستیابی به نتایج قابل تعمیم به کل شهرستان زابل، نمونه‌برداری از مناطق جغرافیایی مختلف، انجام شد. ابتدا pH تمام نمونه‌ها اندازه‌گیری و سپس نمونه گیری جهت کشت، از همه‌ی نمونه ها انجام شد.

۲-۲- جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک

هموژنیزاسیون با استفاده از دستگاه همژنایزر مدل Seaward، آلمان، انجام پذیرفت و سپس ۱۰ سی‌سی از هر نمونه درون ۹۰ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل (۰/۸۵٪ وزنی- حجمی کلرید سدیم استریل) رقیق شد و به این ترتیب رقت 10^{-1} به دست آمد. سپس در لوله‌های حاوی ۹ سی‌سی سرم فیزیولوژی تا رقت 10^{-6} رقیق سازی شد. از تمامی رقت‌های به دست آمده، با سه تکرار بر محیط کشت MRS Agar کشت سطحی (۰/۱ سی‌سی بر روی هر پلیت) داده شد. سپس پلیت‌ها در دمای ۳۰°C و ۴۵°C در حالت بی‌هوازی گرمخانه‌گذاری شدند. پس از شمارش پرگنه‌ها، از پلیت‌های MRS حاوی بالاترین رقت، بر مبنای تفاوت در ویژگی‌های مورفولوژیکی شامل رنگ، شکل، تحدب و تعقر پرگنه و عمقی یا سطحی بودن آن، تعدادی پرگنه انتخاب، و بر روی همان نوع محیط کشت جهت خالص سازی بیشتر کشت خطی داده شد. در نهایت برای نگهداری جدایه ها به مدت طولانی وانجام آزمون های بعدی، جدایه ها در MRS broth حاوی گلیسرول ۱۵٪ (V/V) دردمای -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۲].

۲-۳- آزمون‌های تأییدی و بیوشیمیایی و سپس گروه بندی با استفاده از پروفایل تخمیر قند

برای انجام آزمون‌های تأییدی بر روی جدایه‌های موجود، پس از تهیه لام و رنگ آمیزی، ضمن ثبت مشخصات مورفولوژیکی پرگنه، ابتدا جدایه‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی برای ادامه آزمون انتخاب شدند. سپس برای شناسایی جدایه‌ها در حد جنس، رشد در دمای ۱۰°C و ۴۵°C، رشد در غلظت نمک ۶/۵٪، رشد در pH های ۴/۴ و ۹/۶ و آزمایش لوله دورهام جهت بررسی تولید گاز CO_2 انجام پذیرفت (۱۳). گروه‌بندی باکتری-های اسید لاکتیک با استفاده از ده نوع قند متفاوت (گلوکز، ساکارز، گالاکتوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، سوربیتول، رافینوز،

1. Bilková
2. Sengun
3. Multiple PCR

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

مانیتول و ملی‌بیوز) و با استفاده از محیط کشت فنل رد براث (کازئین پپتون+ سدیم کلرید+ فنل رد) (کیولب، کانادا) انجام شد [۱٤].

۲-٤- شناسایی باکتری های اسید لاکتیک با استفاده از تکثیر ژن 16S rRNA

استخراج DNA با استفاده از کیت های استخراج Genomic DNA isolation VI (دنا زیست آسیا، ایران)، صورت پذیرفت. پس از ایجاد رسوب در میکروتیوب‌های حاوی سوسپانسیون میکروبی و حل نمودن در ۲۰۰ میکرولیتر PBS و افزودن محلول آنزیمی مناسب جهت رسیدن به حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر، طبق پروتکل شرکت سازنده، عمل شد. پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر ژن ۱٦S rRNA عبارت بودند از پرایمرهای Universal (۱۲):

پرایمر Forward: (5´-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3) 27FYM

پرایمر Reverse: (5´-GGTTACCTTGTTACGACTT-3) 1492R

که بر اساس نواحی حفظ شده ژن ۱٦S rRNA طراحی شده‌اند. واکنش PCR در کیت تر PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مقادیر بهینه شده ی ذیل، انجام پذیرفت.

آب: ۱٦/۵ میکرولیتر

بافر 10x: ۲/۵ میکرولیتر

dNTP: ۲ میکرولیتر

$MgCl_2$: ۱/۲ میکرولیتر

پرایمر رفت و برگشت: ۱/۲۵ میکرولیتر

Taq Polymerase: ۰/۲ میکرولیتر

DNA Template: ۱/۵ میکرولیتر

سپس میکروتیوب حاوی مخلوط واکنش‌دهنده‌های PCR را داخل دستگاه ترموسایکلر قرار داده و برنامه دمایی به صورت ذیل تنظیم گردید (۱۲):

۱. فعال‌سازی: دمای ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل

۲. گسترش که شامل واسرشته‌سازی: دمای ۹٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، **اتصال** پرایمر[4]:دمای ٥٤°C به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه[5]: دمای ۷۲°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل

۳. گسترش نهایی: دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل

الکتروفورز در ولتاژ ۹۵ ولت و زمان ٤٥ دقیقه انجام پذیرفت. سپس ژل در دستگاه ژل داک رویت شد [۱۵ و ۱٦].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج شمارش، شناسایی و گروه بندی جدایه‌های کشک زرد زابلی با روش‌های مبتنی بر کشت

با رسیدن pH نمونه ها به زیر ٤/٦ پایان تخمیر اعلام شد. نتایج حاصل از تعیین pH وشمارش باکتری‌های نمونه‌های مختلف کشک زرد زابلی در جدول ۱، نشان داده شده است. همانگونه که مشخص است، جمعیت باکتری های مزوفیل در نمونه های کشک زرد زابلی غالب تر از باکتری های ترموفیل می باشد. غالب ترین جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ۷ و بیشترین میزان شمارش باکترهای اسید لاکتیک در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد متعلق به نمونه شماره ٦ می‌باشد.

4. Annealing
5. Extension

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

جدول ۱ اندازه‌گیری pH و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کشک زرد زابلی (CFU/g) که در دماهای مختلف ۳۰ و ٤٥ درجه سانتی‌گراد که بر روی محیط MRS

	نمونه‌های کشک زرد زابلی						
	نمونه ۱	نمونه ۲	نمونه ۳	نمونه ٤	نمونه ٥	نمونه ٦	نمونه ۷
pH	۳/٤٤	۳/۹۸	٤/۰۰	۳/۲٥	۳/۸۸	۳/٤۰	۳/۰۸
جمعیت باکتریایی(30°C)	۷/٤۲±۰/٤۱	۷/۱۲±۰/۱٥	۷/۱۲±۰/۳۸	۸/۱٥±۰/۳٥	٦/٥٥±۰/۱۳	۷/۹٥±۰/۲۰	۸/٥۰±۰/۰٥
جمعیت باکتریایی(45°C)	٤/۰٥±۰/۱۱	۳/۹٥±۰/۰٥	٤/۱۳±۰/۰۸	٤/۰۲±۰/۱٥	۳/۰۳±۰/۳۰	٤/۱٥±۰/۱٦	٤/۰٥±۰/۱۳

پس از بررسی مورفولوژی جدایه‌ها، انجام آزمون رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، از بین ۱۸٥ جدایه، ۸۳ جدایه از مرحله انتهایی تخمیر که گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند برای انجام آزمون‌های بعدی انتخاب شدند. بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر کربوهیدرات، نتایج متفاوتی بدست آمد که این نتایج از نظر مشابهت با سایر گونه‌های موجود در خانواده باکتری‌های اسید لاکتیک، نسبت به تحقیقات مشابه مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌ها متعلق به ٤ جنس لاکتوباسیلوس، لاکتوکوکوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس بودند. جنس لاکتوباسیلوس با توجه به گستردگی بالایی که در طبیعت دارد نتایج متنوع تری نسبت به آزمون های مختلف از خود نشان داد. همه جدایه های میله ای شکل توانایی رشد در pH=٤/٤ را دارا بودند.

جدایه‌های کوکسی شکلی که توانایی تولید گاز داشتند به عنوان جنس *لوکونستوک* در نظر گرفته شدند. جدایه‌های که به عنوان جنس *لوکونستوک* در نظر گرفته شدند، قادر به رشد در دمای ۱۰°C، ٦/٥٪ نمک و pH=٤/٤ بودند و جدایه‌های مربوط به جنس *لاکتوکوکوس* توانایی زنده مانی در کلیه‌ی دماهای مورد استفاده و درصد نمک ذکر شده را داشتند [۱۷]. تمامی سویه‌هایی که با توجه به رنگ آمیزی گرم و آزمون‌های بیوشیمیایی، به جنس *پدیوکوکوس* نسبت داده شدند، توانایی رشد در pH=۹/٦ و دمای ۱۰°C و pH=٤/٤ را نداشتند [۱۸].

جدول ۲ نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند مربوط به جدایه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک ایزوله شده از کشک زرد زابلی.

شماره گروه	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸
تعداد جدایه‌ها	۲۰	۱۱	۸	۱٥	۱۱	۸	۲	۸
رشد در ۱۰ °C	+	–	+	–	+	+	+	–
رشد در ٤٥ °C	–	+	–	+	+	–	–	۲*
رشد در pH=٤/٤	+	+	+	+	–	+	+	–
رشد در pH=۹/٦	۸*	–	۳	۱۲	+	–	–	+
رشد در غلظت ٦/٥ نمک	۱۳	+	۲	–	+	+	+	+
تولید گاز CO_2 از گلوکز	٦	+	+	–	+	+	+	–
گلوکز	+	+	+	–	+	+	+	+
ساکارز	+	–	+	–	–	+	+	+
گالاکتوز	+	+	٥	–	–	–	+	+
فروکتوز	+	–	+	–	–	۲٤	+	+
لاکتوز	+	+	+	+	+	–	+	٤
مالتوز	+	–	+	–	–	+	+	+
سوربیوتول	+	–	+	–	–	–	+	–
رافینوز	+	–	–	–	–	–	–	–
مانیتول	+	–	–	–	–	۲	–	–
ملی‌بیوز	٦	–	+	–	–	–	–	–

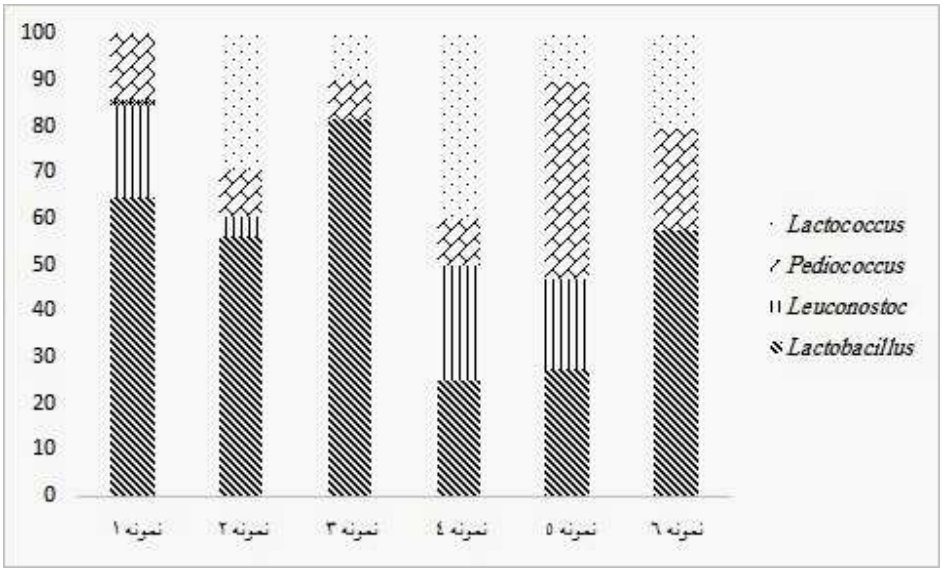
* تعداد جدایه هایی که به آزمون مربوطه جواب مثبت دادند

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

گروه‌بندی باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک به جنس و گونه‌های مجزا براساس ویژگی‌های فنوتیپی برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ صورت گرفت. نتایج این آزمایش‌ها، با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی از قبیل رشد در دماهای مختلف، توانایی رشد در غلظت‌های مختلف نمک و درجه‌های مختلف pH و تخمیر کربوهیدرات، شناسایی تا مرحله گونه و زیر گونه را انجام میداد. همچنین گرایش میکروارگانیسم به سمت یک ماده‌ی خاص مانند ترکیبات اسید چرب، آمینواسید اختصاصی و یا اجزای دیواره سلولی نیز می‌توانند در شناسایی این میکروارگانیسم‌ها مفید واقع شوند. برای مثال *بیفیدوباکتریوم لانگوم*، *بیفیدوباکتریوم اینفانتیس* و *بیفیدوباکتریوم سوئیس* می‌توانند بر اساس ترکیبات پپتیدوگلیکان دیواره‌ی سلولی شناسایی شوند؛ همچنین بررسی پروتئین‌های دیواره‌ی سلولی می‌تواند در افتراق درون‌گونه‌ای *لاکتوباسیلوس*ها موثر باشد؛ و گروه‌بندی لکتین می‌تواند ایزوله-های *لاکتوباسیلوس* را طبقه بندی کند [۱۹]. این حقیقت که بر اساس ویژگی های فنوتیپی، نمی‌توان اطلاعات دقیقی از ژنوتیپ ارگانیسم به دست آورد و روش‌های تعیین هویت فنوتیپی به دلیل متغیر بودن رشد باکتری‌ها، محدود و غیر قابل اعتماد هستند، موضوعی غیر قابل انکار است. گونه‌های خاصی وجود دارند که قابل شناسایی بر اساس صفات فنوتیپی نیستند. پاسخ‌های فنوتیپی می‌تواند تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرد. جهت طراحی روش‌های شناسایی پایدار و قابل اعتماد، بایستی تست‌های ژنتیکی به کار رود. برای شناسایی دقیق این سویه‌ها، روش‌های مدرن بر پایه‌ی PCR و توالی‌یابی ژن نیاز می‌باشد. پیشرفت تکنیک‌های مولکولی که باعث شناسایی و افتراق سریع و قابل اعتماد ایزوله‌ها می‌شود باعث آن شده است که اکنون تعداد زیادی تکنیک بر پایه‌ی ژنتیک برای عملکردهای مختلف وجود داشته باشند [۲۰]. همچنین پرز و همکاران (۲۰۰۰)، در بررسی فلور لاکتیکی پنیر تنریف، به این نتیجه رسیدند که استفاده از روش های سنتی در شناسایی باکتری های اسید لاکتیک موجب بروز اشتباه در شناسایی باکتری‌های جنس لاکتوکوکوس و لاکتوباسیلوس، شد. که دلیل آن تولید سلول‌های میله‌ای خیلی کوتاه یا حتی کروی توسط باکتری‌های لاکتوباسیل تحت شرایط ویژه می باشد که می تواند فرد پژوهشگر را گیج نماید. در روش کشت و شناسایی میکروبی به صورت سنتی، تنها بخشی از تنوع میکروبی در تجزیه‌ها وارد شده و بخش اعظمی از جامعه‌ی میکروبی از دست می‌رود و به تبع آن نیز نتایج حاصله نمی‌تواند تصویر جامعی از آنچه در محیط مورد بررسی رخ می‌دهد، به حساب آید. همچنین در این تحقیق، بسیاری از سویه‌های جنس *استافیلوکوکوس*، به عنوان *پدیوکوکوس* در نظر گرفته شدند [۲۱].

در نهایت، با آزمون تخمیر قند این ۸۳ جدایه به ۸ گروه طبقه-بندی شدند (مبنای انتخاب و مقایسه‌ی قندها جلد سوم کتاب Bergey's Manual of Systematicبود). نتایج مربوط به آزمون‌های بیوشمیایی، فیزیولوژیکی و تخمیر قند در جدول ۲، آورده شده است. برای درک صحیح تر از اکولوژی باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کشک زرد، توزیع جمعیت باکتریایی با استفاده از روش‌های مبتنی بر کشت در شکل ۱، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می‌شود توزیع جمعیتی جنس های مختلف در نمونه های مختلف متفاوت است. در همه نمونه ها جنس لاکتوباسیلوس جمعیت غالب را تشکیل داده است. بجز نمونه شماره ٤ و٥ که به ترتیب جنس های لاکتوکوکوس و پدیوکوکوس غالب اند. لازم به ذکر است که در شکل ۱، نمودار توزیع باکتری های اسید لاکتیک نمونه شماره ۷ آورده نشده است که علت ان عدم پراکندگی مناسب باکتری‌ها در این نمونه بود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]



شکل ۱ توزیع باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در نمونه‌های کشک زرد.

۳-۲- شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش تکثیر ژن 16S rRNA

پس از گروه بندی جدایه ها با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و تخمیر قند از هر گروه چند جدایه انتخاب و پس از استخراج DNA، واکنش PCR به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA انجام گرفت. پس از انتقال آمپلیکون‌های حاصل بر روی ژل تمامی آن‌ها طولی بین ۱۴۰۰bp-۱۲۰۰ داشتند. با توجه به ایجاد باندهای قوی در ژل الکتروفورز کمیت و کیفیت DNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR برای ۲۸ جدایه‌ی انتخاب شده، فراورده‌های واکنش تعیین توالی گردید. نتایج حاصل از تعیین توالی سپس با اطلاعات موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مقایسه شد (جدول ۳). بر اساس نتایج به دست آمده از آنالیز ژن 16S rRNA مشخص شد که ۲٤/۰۹ درصد جدایه ها به عنوان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ۱۳/۲۵ درصد از جدایه ها به عنوان *لاکتوباسیلوس هلویتیکوس*، ۹/٦۳ درصد از جدایه‌ها به عنوان *لاکتوباسیلوس برویس*، ۱۸/۰۷ درصد از جدایه ها به عنوان *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس*، ۱۳/۲۵ درصد از جدایه ها به عنوان *لاکتوکوس لاکتیس* زیرگونه *کرموریس*، ۹/٦۳ درصد از جدایه ها به عنوان *لوکونستوک مزنتروئیدس* زیرگونه *مزنتروئیدس*، ۲/٤۰ درصد از جدایه ها به عنوان *لوکونستوک سیترئوم* و ۹/٦۳ درصد از جدایه ها به عنوان *پدیوکوکوس پنتوزاسئوس* شناسایی شدند.

تخمیرهای لبنی-غله ای اصولا به وسیله‌ی میکروارگانیسم‌های ذاتی موجود در مواد اولیه شروع می شود که به طور طبیعی جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس بر روی مواد غذایی گیاهان یافت می‌شوند. در فرمولاسیون کشک زرد احتمال حضور سوش ها، در دوغ و آرد گندم بالاست [۲۲].

وجود *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در غذاهای متعدد تخمیری گیاهی گزارش شده است. در کشک زرد به علت استفاده از آرد گندم و همچنین، ادویه جات گیاهی انتظار وجود این گونه در تنوع جمعیتی کشک زرد وجود داشت. همچنین *لاکتوباسیلوس دلبروکی* زیرگونه *بولگاریکوس* نیز بیشتر از منابع گیاهی ایزوله شده و دمای مناسب تخمیر برای این جدایه ٤۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد است که با توجه به شرایط آب و هوایی گرم منطقه زابل و توجه به این نکته که شرایط آب و هوایی می تواند در فلور لاکتیکی یک ماده غذایی تخمیری اثرگذار باشند، احتمال شناسایی این سویه دور از انتظار نبود [۲۳ و ۲٤].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

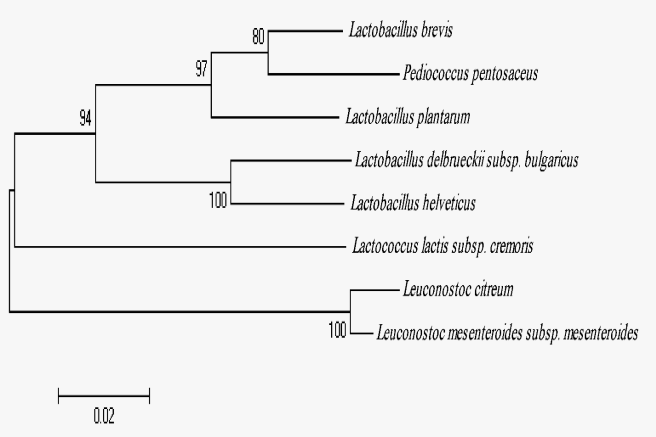
جدول ۳ شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک کشک زرد با استفاده از روش مولکولی.

کد جدایه	نزدیک‌ترین سویه در پایگاه داده NCBI	درصد شباهت (٪)	کد دسترسی
A2	*Lactobacillus plantarum strain TW29-1*	99	KJ026622.1
A21	*Lactococcus lactis subsp. cremoris strain HD20A*	100	KR336812.1
A55	*Lactobacillus plantarum strain IMAU10015*	100	FJ749579
A74	*Lactobacillus helveticus strain D5401*	98	EF536371.1
A90	*Lactobacillus brevis strain ATCC 14869*	99	NR_044704.1
B8	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC*	100	EU483107.1
B15	*Lactobacillus plantarum strain BS16*	100	JX968493.1
B42	*Lactobacillus plantarum strain TW57-4 16S*	98	KJ026699.1
B45	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC*	99	EU483107.1
C11	*Pediococcus pentosaceus strain T22*	100	KJ806301.1
C26	*Lactobacillus helveticus strain IMAU50073*	100	FJ749472.1
C30	*Lactobacillus helveticus strain N720*	100	HM641232.1
D3	*Lactobacillus brevis CCC 96S1L*	98	AF429529.1
D10	*Lactobacillus plantarum strain TW29-1*	99	KJ026622.1
D14	*Lactobacillus helveticus strain D5401*	100	EU183494.1
D34	*Pediococcus pentosaceus ATCC 25745*	99	NR_075052.1
D40	*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512*	98	KP764048.1
E1	*Lactobacillus brevis strain ATCC 8291*	100	AF429549.1
E13	*Lactococcus lactis subsp. cremoris strain CLFP 105*	100	DQ412701.1
E14	*Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC*	100	EU483107.1
E25	*Lactobacillus brevis strain NS01*	100	HQ702478.1
E30	*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512*	98	KP764048.1
F14	*Lactococcus lactis subsp. cremoris strain NCDO 607*	100	NR_040954.1
F16	*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512*	99	KP764048.1
G4	*Leuconostoc citreum strain mmam27*	100	KR095436.1
G8	*Lactobacillus helveticus strain MRTL91*	100	JX020702.1
G19	*Lactococcus lactis subsp. cremoris strain SD1S4L8*	99	KJ095649.1
G54	*pentosaceus ATCC 25745*	98	NR_075052.1

وسیعی و همکاران (۲۰۱٤) اقدام به شناسایی فلور غذایی تخمیری لبنی-غله ای ترخینه نمودند. فلور غالب در تحقیقات آن ها گونه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود. *لاکتوباسیلوس برویس* یکی از گونه های جنس لاکتوباسیلوس است که پتانسیل بالایی برای انتخاب شدن به عنوان پروبیوتیک دارد [۲۵]. این جنس دارای سلول هایی میله ای با انتهای کروی است که به طور معمول در زیر میکروسکوپ به صورت تک با زنجیره ای کوتاه دیده می شود. برای رشد به فاکتورهایی از قبیل کلسیم پانتوتنات، نایسین، تیامین و فولیک اسید نیاز دارد و بیشتر از شیر و فراورده‌های حاصل از آن از قبیل پنیر و کشک، کلم ترش، ترشی جات، دهان روده انسان و موش جداسازی می شود [۲٦]. *لاکتوباسیلوس هلوتیکوس* باکتری هوموفرمنتاتیو اجباری است که بیشتر در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

محصولات تخمیری لبنی جداسازی و شناسایی شده است. تا دمای ۵۰-۵۲ درجه سانتی گراد توانایی رشد کردن دارد که این موضوع با شرایط آب و هوایی زابل و تاثیر مستقیمی که می تواند بر روی فلور لاکتیکی داشته باشد اثر مستقیم دارد [۲۷]. جنس لوکونستوک بیشتر در مراحل ابتدایی تخمیر حضور دارد. به علت مقاومت پایین تری که در مقایسه با سایر اعضای خانواده باکتری های اسید لاکتیک در مقابل pH دارد، و همچنین توانایی رقابت پایین تر برای رشد یا به دست آوردن مواد غذایی باعث می شود عمدتا در فلور نهایی محصول تخمیری جمعیت غالب را شامل نشود اما بنظر می‌رسد سویه‌های این جنس نقش مهمی در ایجاد و گسترش طعم مطلوب در ماده غذایی تخمیری کشک زرد داشته باشند [۲۸ و ۲۹]. عامل بسیار شاخص در شناسایی جنس پدیوکوکوس آرایش تتراد مربوط به آنهاست. همچنین تحمل غلظت بالای نمک و مقاومت به اسید باعث شده این جنس در فرایند تخمیر نقش آفرینی داشته باشد [۳۰]. اکثرا در محصولات لبنی تخمیری شاهد غالب بودن جنس لاکتوباسیل هستیم. ساوادوگو[6] و همکاران (۲۰۰٤) اقدام به شناسایی فلور لاکتیکی نوعی شیر تخمیری از کشور بورکینافاسو[7] نمود. در ارتباط با سیزده سویه‌ی باکتری اسید لاکتیک ایزوله شده از نمونه‌ها، ناحیه-ی بین 16S و 23S rRNA توسط PCR تکثیر شد. *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *استرپتوکوکوس ترموفیلوس*، زیرگونه‌های پدیوکوکوس، *لوکونوستوک مزنتروئیدوس* زیرگونه‌ی *مزنتروئیدوس* شناسایی شدند، که خانواده‌ی لاکتوباسیلوس غالب بود [۳۱]. در نهایت برای فهم هر چه بهتر از قرابت ژنتیکی گونه های موجود، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی‌های جدایه‌های کشک زرد توسط نرم‌افزار Mega 6 ، بر اساس روش آماری neighbor-joining و با نرخ خود راه انداز[8] ۱۰۰۰ تکرار رسم شد (شکل ۲).



شکل ۲ درخت فیلوژتیکی رسم شده بر اساس آنالیز تعیین توالی 16S rDNA.

٤- نتیجه‌گیری

این پژوهش به منظور جداسازی و شناسایی فلور لاکتیکی کشک زرد زابلی (یک نوع فراورده تخمیری غله ای-لبنی) به کمک روش آنالیز ژن 16S rRNA انجام شد. با استفاده از روش‌های مولکولی، باکتری‌های اسید لاکتیک غالب در مرحله نهایی تخمیر شناسایی گردیدند. از میان جدایه‌های توالی‌یابی شده، باکتری‌های ارزشمندی چون *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی*، *لاکتوکوکوس لاکتیس*، *انتروکوکوس لاکتیس* *پدیوکوکوس نتوزاسئوس* و *لوکونوستوک مزنتروئیدز* بدست آمدند که نقش پروبیوتیکی آن‌ها ثابت شده است و بعضی از گونه‌ها از نظر تولید باکتریوسین و یا اگزوپلی‌ساکارید[9]های ارزشمند قابل توجه هستند. اطلاعات و داده‌های میکروبی بدست آمده، می‌تواند در گزینش کشت‌های آغازگر تجاری مناسب برای تولید در مقیاس صنعتی مفید باشد. هر کدام از روش های شناسایی باکتری های مزایا و معایب خود را داراست. روش های مبتنی بر کشت عمدتا وقت گیر و غیر دقیق می باشد. روش های مولکولی با وجود دقت بالا، ممکن است برای پژوهش گر گیج کننده باشد که علت آن به حجم بالای داده های موجود در بانک اطلاعاتی NCBI مربوط می‌باشد.لذا استفاده همزمان از هر دو روش پیشنهاد می گردد.

6. Savadogo
7. Burkina Faso
8. Bootstrap

9. Exopolysaccharide

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

۵- تقدیر و تشکر

مقاله علمی-پژوهشی حاضر مستخرج از طرح پژوهشی با کد ۲/۳۷۸۳۳ مصوب در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

٦- منابع

[1] Karabulut I, Adnan Hayaloglu A, Yildirim H. 2007.Thin□layer drying characteristics of kurut, a Turkish dried dairy by□product. International Journal of Food Science & Technology. 42(9):1080-6.

[2] Wood, B. J. B., and Holzapfel, W.H. 1995. The genera of lactic acid bacteria. 1st ed. *Blackie Academic and Professional, Glasgow*, United Kingdom.

[3] Wood, B.J.B., Warner, P.J. 2003. Genetics of lactic acid bacteria. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, New York, NY.

[4] Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. *Microbiology and functional aspects*. Salminen S, von Wright A. (3th Edition). Marcel Dekker, New York, Pp: 1–72. bacteria. *Milk Science International Journal*, 54: 265–268.

[5] Savijoki, K., Ingmer, H., and Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71: 394-406

[6] Okonogi, S., Klayraung, S. 2008. Probiotic Properties of Lactobacilli Isolated from Thai Traditional Food. *Scientia Pharmaceutica*, 76: 485–503.

[7] De Vuyst, L and Leroy, F. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13:194-199.

[8] Chakrabarti P, Das B K and Kapil A (2009) Application of 16S rDNA based seminested PCR for diagnosis of acute bacterial meningitis. *Indian Journal of Medical Research* 129 (2) 182.

[9] Salama, M., Sandine, W., and Giovannoni, S. 1991. Development and application of oligonucleotide probes for identification of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*. Applied and Environmental Microbiology, 57: 1313–1318.

[10] Bilková, A., Kinova, S. H., Bilka, F., & Bukovsky, M. 2008. Identification of newly isolated lactobacilli from stomach mucus of lamb. *Acta Facult Pharm Univ Comenianae*, 55: 64-72.

[11] Sengun, I. Y., NIielsen, D. S., Karapinar, M., & Jakobsen, M. 2009. Identification of lactic acid bacteria isolated from Tarhana, a traditional Turkish fermented food. *International Journal of food Microbiology*, 135(2): 105-111.

[12] Alegría, A., Álvarez-Martín, P., Sacristán, N., Fernández, E., Delgado, S., Mayo, B., 2009. Diversity and evolution of the microbial populations during manufacture and ripening of Casín, a traditional Spanish, starter-free cheese made from cow's milk. International Journal of Food Microbiology 136, 44–51.

[13] Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria. Microbiology and functional aspects. Salminen S, von Wright A. (3th Edition). Marcel Dekker, New York, pp: 1–72.

[14] Fitzsimons, N.A., Cogan, T.M., Condon, S., Beresford, T., 1999. Phenotypic and genotypic characterization of non-starter lactic acid bacteria in mature cheddar cheese. Applied and Environmental Microbiology 65, 3418 - 3426.

[15] Platero, A., Maqueda, M. Valdivida, E., and Purswani, J. 2009. Polyphasic study of microbial communities of two Spanish farmhouse goats milk cheeses from Sierra de Aracena. *Food Microbiology*, 26: 294-304.

[16] Taheri, H. R., Moravej, H., Tabandeh, F., Zaghari, M., and Shivazad, M., 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poultry Science*, 88(8):1586-1593.

[17] Garvie, E.I. 1986a. Genus *Leuconostoc*. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 8th ed., Vol. 2; Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp, M.E., Holt, J.G., Eds.; Williams and Wilkins: Baltimore pp: 1071–1075.

[18] Garvie, E I. 1986b. Genus *Pediococcus*, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2; Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharp,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[26] Guarneri, T., Rossetti, L., & Giraffa, G. (2001). Rapid identification of Lactobacillus brevis using the polymerase chain reaction. Letters in applied microbiology, 33(5), 377-381.

[27] Vaughan, E. E., Daly, C., & Fitzgerald, G. F. (1992). Identification and characterization of helveticin V, 1829, a bacteriocin produced by Lactobacillus helveticus 1829. Journal of applied bacteriology, 73(4), 299-308.

[28] Facklam, R., & Collins, M. (1989). Identification of Enterococcus species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of clinical microbiology, 27*(4), 731-734.

[29] Mataragas, M., Drosinos, E. H., and Tsakalidou, E. (2004) Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillu curvatus* L442. *Antonie van Leeuwenhoek* 85 191–198.

[30] Anderson, K. E., Sheehan, T. H., Mott, B. M., Maes, P., Snyder, L., Schwan, M. R.. Corby-Harris, V. (2013). Microbial ecology of the hive and pollination landscape: bacterial associates from floral nectar, the alimentary tract and stored food of honey bees (Apis mellifera).

[31] Savadogo, A., Cheik, A. T., Savadogo, P., Barro, N., Outtara, A. S., & Traore A. S. 2004. Identification of exopolysaccharides-producing lactic acid bacteria from Burkina Faso fermented milk samples. *African Journal of Biotechnology*, 3(3): 189-194.

M.E., Holt, J.G., Eds.; Williams and Wilkins, Baltimore, pp: 1075-1079.

[19] Schleifer, K. H., and Stackebrandt, E. 2006. Molecular systematics of procaryotes, *Annual Review of Microbiology*, 37: 143-187.

[20] Giraffa, G. and Neviani E. 2000. Molecular identification and characterization of food-associated lactobacilli. *Italian Journal of Food Science*, 4: 403–423.

[21] Perez, G., Cardell , E., and Zarate, V. 2000. Protein fingerprinting as a complementary analysis to classical phenotyping for the identification of lactic acid bacteria from Tenerife cheese. Lait, 80: 589–600.

[22] Stiles, E. M., and Holzapfel, H. W. 1997. Lactic acid and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36:1-29.

[23] Passos, F., Fleming, H., Ollis, D., Hassan, H., & Felder, R. (1993). Modeling the specific growth rate of Lactobacillus plantarum in cucumber extract. *Applied microbiology and biotechnology, 40*(1), 143-150.

[24] Molin, G. 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v1–3. American Society for Clinical Nutrition. 73 (2), 380–385.

[25] Vasiee, AR, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi A, Edalatian MR. 2014. Isolation, Identification and Characterization of Probiotic Lactobacillus spp. from Tarkhineh. International Food Research Journal.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

Diversity of lactic acid bacteria isolated from yellow zabol kashk using 16S rRNA Gene Sequence Analysis

Tabatabaei Yazdi, F. [1*], Vasiee, A. R. [2], Alizadeh Behbahani, B. [2], Mortazavi, S. A. [1]

1. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. Ph.D student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 94/7/3 Accepted: 94/8/23)

Fermentation is used for centuries to protect quality improvements or flavor modifications of cereals, fruits, vegetables, milk and meat. Yellow Zabol kashk (Sistani) is a grain-dairy fermented product, which is highly consumed in Sistan-Baluchistan province. The aim of this study was to isolate and identify the Lactic Acid Bacteria involved in spontaneous fermentation of this product to introduce the native strains.

These strains could be used in industry or some of them may be considered as probiotic strains. The cell morphology of each strain was investigated. Then gram-positive and catalase-negative isolates were selected. In order to classify 83 selected isolates that seemed Lactic Acid Bacteria according to preliminary experiments, physiological and biochemical tests, including growth at 10°C and 45°C, 6.5% NaCl, pH=4.4 and pH=9.6, carbon dioxide production from Glucose and carbohydrates fermentation were performed. Twenty eight selected isolate identified genotypically based on 16S rRNA gene sequencing. The results showed that the isolates belong to: *Lactobacillus plantarum* (24.09 %), *Lactobacillus helveticus* (13.25 %), *Lactobacillus brevis* (963 %), *Lactobacillus delbrueckii* (18.07 %), *Lactococcus lactis* (13.25 %), *Leuconostoc mesenteroides* (9.63 %), *Leuconostoc citreum* (2.40 %) and *Pediococcus pentosaceus* (9.63 %). To identify the bacteria, especially lactic acid bacteria it is suggested using both culture and molecular-based method.

Keywors: Yellow kashk, Fermented product, Lactic Acid Bacteria, 16S rRNA gene, Isolation

* Corresponding Author E-Mail Address: tabatabai@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]