

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

فریده طباطبایی یزدی^{۱*}، علیرضا وسیعی^۲، بهروز عزیزاده بهبهانی^۲، سید علی مرتضوی^۱

۱- استاد و عضو هیئت 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 ۶/۷۵٪ نمک، رشد در pH=۹/۶ و pH=۴/۴، تولید گاز دی‌اکسید 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 جدایه‌ها متعلق به جنس‌های: لاکتوباسیلوس پلاتناروم (۲۴/۰۹٪)، لاکتوباسیلوس هلویتیکوس (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 سیتروئوم (۲/۴۰٪) و پدیدوکوکوس پنتوزاسئوس (۹/۶۳٪) شناسایی شدند. در مورد شناسایی باکتری‌ها، مخصوصاً باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک پیشنهاد می‌شود 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

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 کیسه نخی می گذارند، سپس آن را درآورده و پس از ورز دادن، پودر می کنند. کشک زرد زابلی به صورت یک غذای کامل و مقوی در مدت کوتاهی طبخ می شود. 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، یبوست و بیماری های کلیوی رنج می برند، مفید است [۱].

باکتری های اسید لاکتیک جزء فراوان ترین باکتری های مرتبط با انسان می باشند که در سطوح مخاطی و دستگاه گوارش انسان حضور پررنگی دارند [۲ و ۳]. باکتری های اسید لاکتیک، اگر چه دارای جنس و گونه های پاتوژن مانند استرپتوکوکوس می باشند. 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 می شوند [۴]. باکتری های اسید لاکتیک دارای ویژگی های 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 می تواند از طریق پروتئولیز کازئین، که فراوان ترین پروتئین شیر و منبع عمده اسیدهای آمینه است، فراهم گردد. همچنین محصول نهایی حاصل از تخمیر کربوهیدرات ها، اسید لاکتیک می باشد [۵].

شناسایی فلور میکروبی مواد غذایی تخمیری پیچیده به نظر می رسد. روش های سنتی دارای محدودیت های فراوانی هستند.

در شناسایی فلور میکروبی با استفاده از روش های سنتی و مبتنی بر کشت عموماً باکتری های غالب شناسایی می شوند. اما سویه هایی که از نظر تعداد اقلیت هستند، ولی جهت توسعه ی عطر و طعم، اهمیت دارند با این روش ها قابل شناسایی نیستند. با وجود اینکه استفاده از روش های سنتی مشمول محدودیت هایی از قبیل تکرار پذیری پایین و وقت گیر بودن می باشند اما به کارگیری این روش ها به عنوان پیش درآمدی بر روش های دقیق تر و دسته بندی اولیه میکروارگانیزم ها، در اکثر تحقیقات مربوط به شناسایی فلور لاکتیکی مواد غذایی تخمیری امری معمول و مفید می باشد [۶].

از زمان کشف PCR و تعیین توالی ژن، مقایسه ی توالی ژن در باکتری های مختلف نشان داد که ژن 16S ریبوزومی در بین یک گونه و از گونه ای به گونه ای دیگر به صورت دست نخورده و محافظت شده باقی مانده و به عنوان استاندارد طلایی برای تعیین گونه های باکتریایی قابل استفاده است. همچنین وجود مناطق متغیر در ژن های ریبوزومی باعث تمایز فیلوژنتیک در سطوح مختلف می شود که می تواند منبعی برای طبقه بندی باشد. از محاسن این تکنیک کاربرد آن در روش های وابسته به کشت و همچنین مستقل از کشت است [۷]. روش های ژنوتیپی مبتنی بر تکنیک های مولکولی برای انگشت نگاری الگوهای اختصاصی DNA که خصوصیات یک نژاد منفرد را تعیین می نماید، قدرتمند بوده و روش اصلی طبقه بندی نژادی باکتری های اسید لاکتیک را ایجاد می کنند [۸].

ژن مربوط به RNA ریبوزومی حفاظت شده ترین ژن درون هر سلول است. rDNA توالی یابی شده از موجودات مختلف به طور قابل توجهی شباهت نشان می دهند. این به این معنی است که توالی های بدست آمده از موجودات مختلف می توانند با هم مقایسه شده و به صورت گسترده ای برای تعیین تاکسونومی، فیلوژنیک و تخمین تنوع بین باکتری ها استفاده شود. بنابراین توالی 16S rRNA می تواند روابط تکامل بین میکروارگانیزم ها را نشان دهد [۹].

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 30°C و 45°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، تحذب 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 جدایه‌ها به مدت طولانی و انجام آزمون‌های بعدی، جدایه‌ها در MRS broth حاوی گلیسرول ۱۵٪ (V/V) در دمای 80°C - درجه سانتی‌گراد 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 10°C و 45°C ، رشد در غلظت نمک $6/5\%$ ، رشد در pH های $4/4$ و $9/6$ 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،

بیلکوآ^۱ 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. آن‌ها کاربرد روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی به تنهایی را مبهم معرفی کردند [۱۰].

سنگان^۲ و همکاران (۲۰۰۹)، به وسیله ترکیبی از روش‌های فنوتیپی و ژنوتیپی برای اولین بار اقدام به تعیین جنس و گونه‌های 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^۳، PCR مبتنی بر توالی اجزای تکراری و توالی یابی ژن 16S rRNA استفاده گردید بر این اساس ایزوله‌ها به ۱۱ گروه تقسیم گردیدند که لاکتوباسیلوس فرمتوم بیشترین درصد را به خود اختصاص داد [۱۱].

هدف از انجام این پژوهش بررسی فلور لاکتیکی فراورده تخمیری لبنی-غله‌ای 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 استانداردهای 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 نمونه‌گیری جهت کشت، از همه‌ی نمونه‌ها انجام شد.

1. Bilková
2. Sengun
3. Multiple PCR

DNA Template: ۱/۵ میکرولیتر

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

۱. فعال سازی: دمای 95°C به مدت ۵ دقیقه، یک سیکل
 ۲. گسترش که شامل واسرشته سازی: دمای 94°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر: دمای 54°C به مدت ۳۰ ثانیه، توسعه: دمای 72°C به مدت ۲ دقیقه، ۳۵ سیکل
 ۳. گسترش نهایی: دمای 72°C به مدت ۱۰ دقیقه، یک سیکل
- الکتروفورز در ولتاژ ۹۵ ولت و زمان ۴۵ دقیقه انجام پذیرفت. سپس ژل در دستگاه ژل داگ رویت شد [۱۵ و ۱۶].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج شمارش، شناسایی و گروه بندی جدایه های کشک زرد زابلی با روش های مبتنی بر کشت

با رسیدن pH نمونه ها به زیر ۴/۶ پایان تخمیر اعلام شد. نتایج حاصل از تعیین pH و شمارش باکتری های نمونه های 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 باکتری های اسید لاکتیک در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد متعلق به نمونه شماره ۷ و بیشترین میزان شمارش باکترهای اسید لاکتیک در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد متعلق به نمونه شماره ۶ می باشد.

مانیتول و ملی بیوز) و با استفاده از محیط کشت فنل رد برات (کازئین پیتون+ سدیم کلرید+ فنل رد) (کیولب، کانادا) انجام شد [۱۴].

۲-۴- 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 میکروتیوب های 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 16S rRNA عبارت بودند از پرایمرهای Universal (۱۲):

پرایمر Forward (۳):

27FYM (5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG

پرایمر Reverse (3):

1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT

که بر اساس نواحی حفظ شده ژن 16S rRNA طراحی شده اند. واکنش PCR در کیت تر PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر با مقادیر بهینه شده ی ذیل، انجام پذیرفت.

آب: ۱۶/۵ میکرولیتر

بافر 10x: ۲/۵ میکرولیتر

dNTP: ۲ میکرولیتر

MgCl₂: ۱/۲ میکرولیتر

پرایمر رفت و برگشت: ۱/۲۵ میکرولیتر

Taq Polymerase: ۰/۲ میکرولیتر

جدول ۱ اندازه‌گیری pH و شمارش باکتری‌های اسید لاکتیک نمونه‌های کشک زرد زابلی (CFU/g) که در دماهای مختلف ۳۰ و ۴۵ درجه

سانتی‌گراد که بر روی محیط MRS

نمونه‌های کشک زرد زابلی

| نمونه ۱ | نمونه ۲ | نمونه ۳ | نمونه ۴ | نمونه ۵ | نمونه ۶ | نمونه ۷ | pH |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------------------|
| ۳/۴۴ | ۳/۹۸ | ۴/۰۰ | ۳/۲۵ | ۳/۸۸ | ۳/۴۰ | ۳/۰۸ | |
| ۷/۴۲±۰/۴۱ | ۷/۱۲±۰/۱۵ | ۷/۱۲±۰/۳۸ | ۸/۱۵±۰/۳۵ | ۶/۵۵±۰/۱۳ | ۷/۹۵±۰/۲۰ | ۸/۵۰±۰/۰۵ | جمعیت باکتریایی (30°C) |
| ۴/۰۵±۰/۱۱ | ۳/۹۵±۰/۰۵ | ۴/۱۳±۰/۰۸ | ۴/۰۲±۰/۱۵ | ۳/۰۳±۰/۳۰ | ۴/۱۵±۰/۱۶ | ۴/۰۵±۰/۱۳ | جمعیت باکتریایی (45°C) |

آزمون‌های مختلف از خود نشان داد. همه جدایه‌های میله‌ای شکل توانایی رشد در pH=۴/۴ را دارا بودند.

جدایه‌های کوکسی‌شکلی 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، ۶/۵٪ نمک و pH=۴/۴ بودند و جدایه‌های مربوط به جنس *لاکتوکوکوس* توانایی زنده ماندن در کلیه 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=۹/۶ و دمای ۱۰°C و pH=۴/۴ را نداشتند [۱۸].

پس از بررسی مورفولوژی جدایه‌ها، انجام آزمون رنگ آمیزی گرم و تست کاتالاز، از بین ۱۸۵ 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 ۴ جنس *لاکتوباسیلوس*، *لاکتوکوکوس*، *لوکونوستوک* و *پدیوکوکوس* بودند. جنس *لاکتوباسیلوس* با توجه به گستردگی بالایی که در طبیعت دارد نتایج متنوع تری نسبت به

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

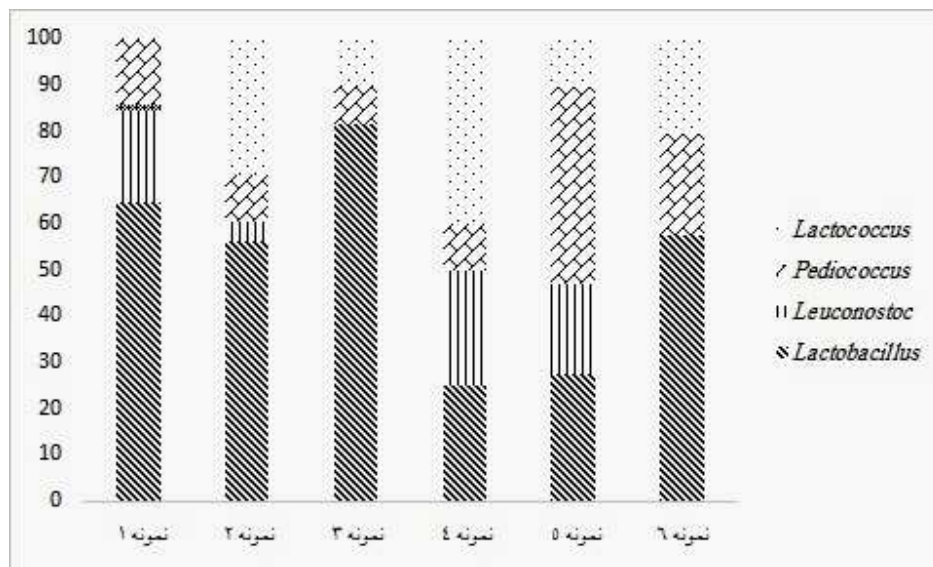
| شماره گروه | ۱ | ۲ | ۳ | ۴ | ۵ | ۶ | ۷ | ۸ |
|------------------------------------|----|----|---|----|----|----|---|----|
| تعداد جدایه‌ها | ۲۰ | ۱۱ | ۸ | ۱۵ | ۱۱ | ۸ | ۲ | ۸ |
| رشد در ۱۰°C | + | - | + | - | + | + | + | - |
| رشد در ۴۵°C | - | + | - | + | + | - | - | ۲* |
| رشد در pH=۴/۴ | + | + | + | + | - | + | + | - |
| رشد در pH=۹/۶ | *۸ | - | ۳ | ۱۲ | + | - | - | + |
| رشد در غلظت ۶/۵ نمک | ۱۳ | + | ۲ | - | + | + | + | + |
| تولید گاز CO ₂ از گلوکز | ۶ | + | + | - | + | + | + | - |
| گلوکز | + | + | + | - | + | + | + | + |
| ساکارز | + | - | + | - | + | + | + | + |
| گالاکتوز | + | + | ۵ | - | - | - | - | + |
| فروکتوز | + | - | + | - | - | ۲۴ | + | + |
| لاکتوز | + | + | + | + | + | - | + | ۴ |
| مالتوز | + | - | + | - | - | + | + | + |
| سوربیتول | + | - | + | - | - | - | + | - |
| رافینوز | + | - | - | - | - | - | - | - |
| مانیتول | + | - | - | - | - | ۲ | - | - |
| ملی‌بیوز | ۶ | - | + | - | - | - | - | - |

* تعداد جدایه‌هایی که به آزمون مربوطه جواب مثبت دادند

فلور لاکتیکی پنیر تریف، به این نتیجه رسیدند که استفاده از روش های سنتی در شناسایی باکتری های اسید لاکتیک موجب بروز اشتباه در شناسایی باکتری های جنس لاکتوکوکوس و لاکتوباسیلوس، شد. که دلیل آن تولید سلول های میله ای خیلی کوتاه یا حتی کروی توسط باکتری های لاکتوباسیل تحت شرایط ویژه می باشد که می تواند فرد پژوهشگر را گمراه نماید. در روش کشت و شناسایی میکروبی به صورت سنتی، تنها بخشی از تنوع میکروبی در تجزیه ها وارد شده و بخش اعظمی از جامعه میکروبی از دست می رود و به تبع آن نیز نتایج حاصله نمی تواند تصویر جامعی از آنچه در محیط مورد بررسی رخ می دهد، به حساب آید. همچنین در این تحقیق، بسیاری از سویه های 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 مقایسه ی قندها جلد سوم کتاب *Bergey's Manual of Systematic* بود). نتایج مربوط به آزمون های بیوشیمیایی، فیزیولوژیکی و تخمیر قند در جدول ۲، آورده شده است. برای درک صحیح تر از اکولوژی باکتری های اسید لاکتیک نمونه های کشک زرد، توزیع جمعیت باکتریایی با استفاده از روش های مبتنی بر کشت در شکل ۱، آورده شده است. همانگونه که مشاهده می شود 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 ۴ و ۵ 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 آن عدم پراکندگی مناسب باکتری ها در این نمونه بود.

گروه بندی باکتری های خانواده اسید لاکتیک به جنس و گونه های مجزا براساس ویژگی های فنوتیپی برای اولین بار در سال ۱۹۱۹ صورت گرفت. نتایج این آزمایش ها، با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی از قبیل رشد در دماهای مختلف، توانایی رشد در غلظت های مختلف نمک و درجه های مختلف pH و تخمیر کربوهیدرات، شناسایی تا مرحله گونه و زیر گونه را انجام میداد. همچنین گرایش میکروارگانیسم به سمت یک ماده ی خاص مانند ترکیبات اسید چرب، آمینواسید اختصاصی و یا اجزای دیواره سلولی نیز می توانند در شناسایی این میکروارگانیسم ها مفید واقع شوند. برای مثال *بیفیدوباکتریوم لانگوم*، *بیفیدوباکتریوم ایفانتیس* و *بیفیدوباکتریوم سوئیس* می توانند بر اساس ترکیبات پپتیدوگلیکان دیواره ی سلولی شناسایی شوند؛ همچنین بررسی پروتئین های دیواره ی سلولی می تواند در افتراق درون گونه ای لاکتوباسیلوس ها موثر باشد؛ و گروه بندی لکتین می تواند ایزوله های لاکتوباسیلوس را طبقه بندی کند [۱۹]. این حقیقت که بر اساس ویژگی های فنوتیپی، نمی توان اطلاعات دقیقی از ژنوتیپ ارگانیسم به دست آورد و روش های تعیین هویت فنوتیپی به دلیل متغیر بودن رشد باکتری ها، محدود و غیر قابل اعتماد هستند، موضوعی غیر قابل انکار است. گونه های خاصی وجود دارند که قابل شناسایی بر اساس صفات فنوتیپی نیستند. پاسخ های فنوتیپی می تواند تحت تاثیر شرایط محیطی قرار گیرد. جهت طراحی روش های شناسایی پایدار و قابل اعتماد، بایستی تست های ژنتیکی به کار رود. برای شناسایی دقیق این سویه ها، روش های مدرن بر پایه ی PCR و توالی یابی ژن نیاز می باشد. پیشرفت تکنیک های مولکولی که باعث شناسایی و افتراق سریع و قابل اعتماد ایزوله ها می شود باعث آن شده است که اکنون تعداد زیادی تکنیک بر پایه ی ژنتیک برای عملکردهای مختلف وجود داشته باشند [۲۰]. همچنین پرز و همکاران (۲۰۰۰)، در بررسی



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

لوکونوستوک مزترونیئیس زیرگونه مزترونیئیس، ۲/۴۰ درصد از جدایه‌ها به عنوان لوکونوستوک سیتروئوم و ۹/۶۳ درصد از جدایه‌ها به عنوان پدیوکوکوس پتوزاستوس شناسایی شدند. تخمیرهای لبنی-غله‌ای اصولاً به وسیله میکروارگانیسم‌های ذاتی موجود در مواد اولیه شروع می‌شود که به طور طبیعی جنس‌های لاکتوباسیلوس، لوکونوستوک و پدیوکوکوس بر روی مواد غذایی گیاهان یافت می‌شوند. در فرمولاسیون کشک زرد احتمال حضور سوش‌ها، 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 ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد است که با توجه به شرایط آب و هوایی گرم منطقه زابل و توجه به این نکته که شرایط آب و هوایی می‌تواند در فلور لاکتیکی یک ماده غذایی تخمیری اثرگذار باشند، احتمال شناسایی این سویه دور از انتظار نبود [۲۳ و ۲۴].

۲-۳- شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش تکثیر

ژن 16S rRNA

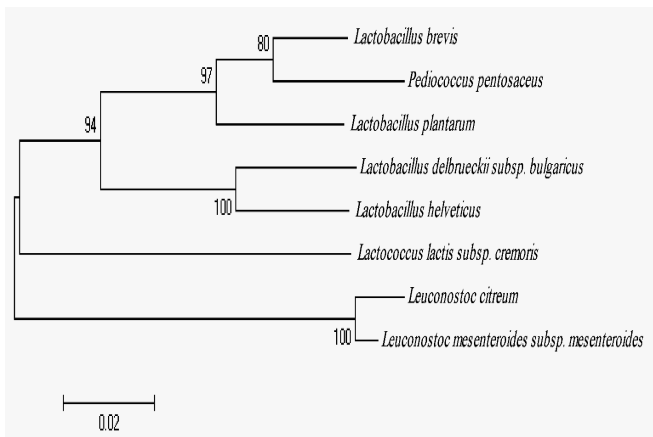
پس از گروه بندی جدایه‌ها با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی و تخمیر قند از هر گروه چند جدایه انتخاب و پس از استخراج DNA، واکنش PCR به منظور تکثیر ناحیه 16S rRNA انجام گرفت. پس از انتقال آمپلیکون‌های حاصل بر روی ژل تمامی آن‌ها طولی بین ۱۴۰۰-۱۲۰۰ bp داشتند. با توجه به ایجاد باندهای قوی در ژل الکتروفورز کمیست و کیفیت DNA استخراج شده مورد تایید قرار گرفت. پس از انجام واکنش PCR برای جدایه‌ی انتخاب شده، فرآورده‌های 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 ۲۴/۰۹ درصد جدایه‌ها به عنوان لاکتوباسیلوس پلانتاروم، ۱۳/۲۵ درصد از جدایه‌ها به عنوان لاکتوباسیلوس هلویتیکوس، ۹/۶۳ درصد از جدایه‌ها به عنوان لاکتوباسیلوس برویس، ۱۸/۰۷ درصد از جدایه‌ها به عنوان لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه بولگاریکوس، ۱۳/۲۵ درصد از جدایه‌ها به عنوان لاکتوکوکوس لاکتیس زیرگونه کرموریس، ۹/۶۳ درصد از جدایه‌ها به عنوان

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

| کد جدايه | نزدیک ترین سویه در پایگاه داده NCBI | درصد شباهت (%) | کد دسترسی |
|----------|--|----------------|-------------|
| A2 | <i>Lactobacillus plantarum strain TW29-1</i> | 99 | KJ026622.1 |
| A21 | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris strain HD20A</i> | 100 | KR336812.1 |
| A55 | <i>Lactobacillus plantarum strain IMAU10015</i> | 100 | FJ749579 |
| A74 | <i>Lactobacillus helveticus strain D5401</i> | 98 | EF536371.1 |
| A90 | <i>Lactobacillus brevis strain ATCC 14869</i> | 99 | NR_044704.1 |
| B8 | <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC</i> | 100 | EU483107.1 |
| B15 | <i>Lactobacillus plantarum strain BS16</i> | 100 | JX968493.1 |
| B42 | <i>Lactobacillus plantarum strain TW57-4 16S</i> | 98 | KJ026699.1 |
| B45 | <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC</i> | 99 | EU483107.1 |
| C11 | <i>Pediococcus pentosaceus strain T22</i> | 100 | KJ806301.1 |
| C26 | <i>Lactobacillus helveticus strain IMAU50073</i> | 100 | FJ749472.1 |
| C30 | <i>Lactobacillus helveticus strain N720</i> | 100 | HM641232.1 |
| D3 | <i>Lactobacillus brevis CCC 96S1L</i> | 98 | AF429529.1 |
| D10 | <i>Lactobacillus plantarum strain TW29-1</i> | 99 | KJ026622.1 |
| D14 | <i>Lactobacillus helveticus strain D5401</i> | 100 | EU183494.1 |
| D34 | <i>Pediococcus pentosaceus ATCC 25745</i> | 99 | NR_075052.1 |
| D40 | <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512</i> | 98 | KP764048.1 |
| E1 | <i>Lactobacillus brevis strain ATCC 8291</i> | 100 | AF429549.1 |
| E13 | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris strain CLFP 105</i> | 100 | DQ412701.1 |
| E14 | <i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus strain LC</i> | 100 | EU483107.1 |
| E25 | <i>Lactobacillus brevis strain NS01</i> | 100 | HQ702478.1 |
| E30 | <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512</i> | 98 | KP764048.1 |
| F14 | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris strain NCDO 607</i> | 100 | NR_040954.1 |
| F16 | <i>Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides strain IMAU11512</i> | 99 | KP764048.1 |
| G4 | <i>Leuconostoc citreum strain mmam27</i> | 100 | KR095436.1 |
| G8 | <i>Lactobacillus helveticus strain MRTL91</i> | 100 | JX020702.1 |
| G19 | <i>Lactococcus lactis subsp. cremoris strain SDIS4L8</i> | 99 | KJ095649.1 |
| G54 | <i>pentosaceus ATCC 25745</i> | 98 | NR_075052.1 |

زیر میکروسکوپ به صورت تک با زنجیره ای کوتاه دیده می شود. برای رشد به فاکتورهایی از قبیل کلسیم پانتوتات، نایسین، تیامین و فولیک اسید نیاز دارد و بیشتر از شیر و فرآورده های حاصل از آن از قبیل پنیر و کشک، کلم ترش، ترشی جات، دهان روده انسان و موش جداسازی می شود [۲۶]. لاکتوباسیلوس هلویتیکوس باکتری هوموفرمنتاتیو اجباری است که بیشتر در

وسیعی و همکاران (۲۰۱۴) 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



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

۴- نتیجه گیری

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 روش های مولکولی، باکتری های اسید لاکتیک غالب در مرحله نهایی تخمیر شناسایی گردیدند. از میان جدایه های توالی یابی شده، باکتری های ارزشمند چون لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس دلبروکسی، لاکتوکوکوس لاکتیس، انتروکوکوس لاکتیس پدیوکوکوس نتوزاسئوس و لوکونوستوک مزنتروئیدز بدست آمدند که نقش پروبیوتیکی آن ها ثابت شده است و بعضی از گونه ها از نظر تولید باکتریوسین و یا آگزوپلی ساکارید های ارزشمند قابل توجه هستند. اطلاعات و داده های میکروبی بدست آمده، می تواند در گزینش کشت های 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 عمدتاً 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 می باشد. لذا استفاده همزمان از هر دو روش پیشنهاد می گردد.

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 لوکونوستوک 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 عمدتاً در فلور نهایی محصول تخمیری جمعیت غالب را شامل نشود اما بنظر می رسد سویه های 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]. اکثراً در محصولات لبنی تخمیری شاهد غالب بودن جنس لاکتوباسیل هستیم. ساوادوگو^۶ و همکاران (۲۰۰۴) اقدام به شناسایی فلور لاکتیکی نوعی شیر تخمیری از کشور بورکینافاسو^۷ نمود. در ارتباط با سیزده سویه باکتری اسید لاکتیک ایزوله شده از نمونه ها، ناحیه ی بین 16S و 23S rRNA توسط PCR تکثیر شد. لاکتوباسیلوس دلبروکسی، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، استرپتوکوکوس ترموفیلوس، زیرگونه های پدیوکوکوس، لوکونوستوک مزنتروئیدوس زیرگونه ی مزنتروئیدوس شناسایی شدند، که خانواده ی لاکتوباسیلوس غالب بود [۳۱]. در نهایت برای فهم هر چه بهتر از قرابت ژنتیکی گونه های موجود، درخت فیلوژنتیکی با استفاده از توالی های جدایه های کشک زرد توسط نرم افزار Mega 6، بر اساس روش آماری neighbor-joining و با نرخ خود راه انداز^۸ ۱۰۰۰ تکرار رسم شد (شکل ۲).

6. Savadogo
7. Burkina Faso
8. Bootstrap

9. Exopolysaccharide

- [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., Nielsen, 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,

۵- تقدیر و تشکر

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

۶- 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.

- [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 *Lactobacillus 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*.

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* (9.63 %), *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.

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

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