

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 زیست‌شناسی، 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: ۹۶/۱۲/۱۴ 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 *Lactobacillus* ۶۴٪، *Pediococcus* ۵٪، *Leuconostoc* ۴/۵٪ و ۲۶/۵٪ جدایه‌های غیرقابل تشخیص شناسایی گردیدند. این شناسایی توسط روش مولکولی مستقل از کشت براساس نسل جدید توالی‌یابی آمپلیکون‌های ژن 16S rRNA کامل گردید. نواحی V3 و V4 از ژن 16S rRNA تکثیر شد و توسط پلتفرم Illumina MiSeq توالی‌یابی شدند. داده‌ها با نرم افزار BaseSpace و بانک اطلاعاتی greengenes بررسی گردیدند. این آنالیز حضور *Lactobacillus* ۷۷/۱۲٪، *Pediococcus* ۷/۵۱٪، *Leuconostoc* ۵/۶۱٪، *Acinetobacter* ۱/۲۰٪، *Enterobacter* ۰/۳۵٪، *Erwinia* ۰/۳۵٪ و *Dickeya* به عنوان جنس‌های غالب و همچنین ۲/۷۹٪ باکتری غیرقابل طبقه‌بندی را در محصول نشان داد. در سطح گونه به صورت *Lactobacillus brevis* ۱۹/۳۲٪، *Lactobacillus japonicus* ۱۵/۷۸٪، *Lactobacillus pentosus* ۱۳/۲۵٪، *Lactobacillus plantarum* ۴/۶۰٪، *Leuconostoc mesenteroides* ۲/۳۲٪، *Lactobacillus acidifarinae* ۱۷/۲۶٪ باکتری غیر قابل طبقه‌بندی شناسایی شدند. شناسایی در سطح جنس توسط هر دو سنجش فنوتیپی و مولکولی (NGS) نتایج مشابهی را نشان 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*، *Pediococcus* و *Leuconostoc* فرایند تخمیر را هدایت می‌کنند. به علاوه باکتری‌های غیرلاکتیکی شامل *Acinetobacter*، *Erwinia*، *Dickeya* نیز می‌توانند در فرایند رسیدگی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی نقش داشته باشند. باکتری‌هایی پروبیوتیکی نظیر *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus pentosus* و *Leuconostoc mesenteroides* نیز در این فراورده تخمیری شناسایی گردیدند.

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

*مسئول مکاتبات: shesami@basu.ac.ir

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 آرومای 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 می‌شود 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 در تنوع 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 فرآورده‌های تخمیری دارند و فعالیت‌های متابولیکی آن‌ها منجر به تولید مواد فرآر موثر در توسعه طعم، آروما و ساختار فرآورده 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 غالباً بی‌هوای 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 پلانٹاروم 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 بیوسستم‌های 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 بی‌هوای در طی کل فرآیند 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 اولیه تنوع جامعه میکروبی محیط 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 قرار می‌دادند. 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 بر شناخت تنوع زیستی آن، درک صحیحی از توالی‌های میکروبی در طی تخمیر ارائه 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 می‌تواند ناشی از اختلاف مواد اولیه، روش و شرایط

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

۶- جهت انجام دوره رسیدگی و انجام تخمیر ابتدا به مدت ۲۴ ساعت درب ظرف را نیمه باز قرار داده، سپس درب ظرف کاملاً بسته شده و به مدت ۴ 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، کاملاً 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. هر نمونه در آب پیتونه تا رقت 10^{-7} رقیق سازی شد و سپس جهت شناسایی فلور لاکتیکی نمونه تا سطح جنساز رقت‌های مختلف در محیط‌های MRS آگار و M17 آگار کشت داده شد. سیستم‌های گازپیک نوع A در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. هر کلنی متفاوت از لحاظ رنگ، اندازه، تحدب، تفرع 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 [۶].

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 10°C و 45°C ، دو غلظت $1/5$ و $1/18$ کلرور سدیم و $\text{pH}=9/6$ و $\text{pH}=4/4$. بررسی تولید گاز دی اکسید کربن از قند گلوکز جهت تشخیص هومو فرمنتاتیو و هترو فرمنتاتیو بودن جدایه‌ها 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].

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 نیز کمک 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 تحقیق استفاده از روش نسل جدید توالی‌یابی به عنوان جدیدترین تکنیک مولکولی مستقل از کشت است که برای اولین بار در شناسایی اکولوژی میکروبی شوری سبزیجات با آب گوجه‌فرنگی مورد استفاده قرار می‌گیرد. 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 می‌شود 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 می‌ریزیم. 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.

۴- چند عدد فلفل قلمی تند، ۲ گرم گل‌پر و ۲,۳۰ گرم غذاخوری فلفل سیاه خوب را مخلوط می‌کنیم.

آمپلیکون V3 و V4، ارگانیسیم‌ها را به کمک پایگاه داده- Greengenes رده‌بندی کرد. نتایج طبقه‌بندی 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 2010 حاصل 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 فیزیولوژی به صورت ۶۴٪ *Lactobacillus*، ۵٪ *Pediococcus*، ۴/۵٪ *Leuconostoc* و ۲۶/۵٪ جدایه‌ها غیرقابل شناسایی طبقه‌بندی شدند (جدول ۲).

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	

۲-۴-۳- توالی‌یابی IlluminaMiSeq

توالی‌یابی براساس IlluminaMiSeq در مرکز آنالیز پیشرفته ژنومیکس دانشگاه گولف که قبلاً اشاره گردید صورت گرفت.

۲-۵- آنالیز داده‌ها

داده‌های خام توالی‌یابی شده به روش NGS توسط cloud-based software, 2016 Illumina, MSR; متاژنومیکس، version; 2.4.60.8 مورد آنالیز قرار گرفت. آنالیز متاژنومیکس بر روی داده‌های 16SrRNA از ناحیه

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

Genus	<i>Lactobacillus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	Non-lactic acid bacteria 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

درکل تعداد سه خوانش خام ۳۰۶۱۵۵، ۳۱۹۱۰۰ و ۲۸۱۰۸۰ از توالی‌یابی illumine توسط Miseqplatform از ۳ نمونه حاصل گردید. نتایج یک آنالیز مولکولی توسط تکنیک NGS تا سطح جنس در جدول ۳ نمایش داده می‌شود.

۲-۳- نتایج شناسایی مولکولی مستقل از کشت

جامعه میکروبی شوری سبزیجات با آب گوجه فرنگی

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

Sequencing Statistics			Top Kingdom Classification Results		
Total Reads	Reads Passing Quality Filtering	% Reads Passing Quality Filtering	Classification	Number of Reads	% Total Reads
306,155	251,357	82.1 %	Bacteria	250,843	99.80 %
Classification Rate Summary			Unclassified at Kingdom level	263	0.10 %
Taxonomic Level	Reads Classified to Taxonomic Level	% Total Reads Classified to Taxonomic Level	Viruses	251	0.10 %
Kingdom	251,094	99.90 %	Top Phylum Classification Results		
Phylum	250,441	99.64 %	Classification	Number of Reads	% Total Reads
Class	250,141	99.52 %	Firmicutes	233,915	93.06 %
Order	249,148	99.12 %	Proteobacteria	14,167	5.64 %
Family	248,206	98.75 %	Bacteroidetes	1,109	0.44 %
Genus	244,345	97.21 %	Unclassified at Phylum level	916	0.36 %
Species	206,513	82.16 %	Cyanobacteria	560	0.22 %
Top Class Classification Results			DNA	251	0.10 %
Classification	Number of Reads	% Total Reads	Actinobacteria	249	0.10 %
Bacilli	233,456	92.88 %	Tenericutes	96	0.04 %
Gammaproteobacteria	12,496	4.97 %	Top Order Classification Results		
Unclassified at Class level	1,216	0.48 %	Classification	Number of Reads	% Total Reads
Betaproteobacteria	911	0.36 %	Lactobacillales	231,971	92.29 %
Alphaproteobacteria	590	0.23 %	Enterobacteriales	6,388	2.54 %
Flavobacteriia	587	0.23 %	Pseudomonadales	3,859	1.54 %
Sphingobacteriia	514	0.20 %	Unclassified at Order level	2,209	0.88 %
Nostocophycideae	498	0.20 %	Bacillales	899	0.36 %
Top Family Classification Results			Alteromonadales	815	0.32 %
Classification	Number of Reads	% Total Reads	Burkholderiales	755	0.30 %
Lactobacillaceae	214,975	85.53 %	Flavobacteriales	587	0.23 %
Leuconostocaceae	15,740	6.26 %	Top Genus Classification Results		
Enterobacteriaceae	6,388	2.54 %	Classification	Number of Reads	% Total Reads
Unclassified at Family level	3,151	1.25 %	Lactobacillus	193,848	77.12 %
Moraxellaceae	3,104	1.23 %	Pediococcus	18,889	7.51 %
Pseudomonadaceae	749	0.30 %	Leuconostoc	14,093	5.61 %
Shewanellaceae	676	0.27 %	Unclassified at Genus level	7,012	2.79 %
Flavobacteriaceae	587	0.23 %	Acinetobacter	3,016	1.20 %
			Enterobacter	2,510	1.00 %
			Erwinia	885	0.35 %
			Dickeya	869	0.35 %

چارت خورشیدی (A) و چارت نواری (B) که توسط آنالیز NGS به دست آمده است در شکل ۱ در یک نگاه کلی به خوبی قابل مشاهده است.

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

نتایج توزیع تنوع ژنتیکی به روش مولکولی با روش فنوتیپی اختلاف دارد. نتایج شناسایی فنوتیپی به دلیل محدودیتهایی از دقت پایین تری نسبت به شناسایی مولکولی برخوردار 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 Species-specific PCR reactions 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 پایین تری نشان داد [۹]. بطور کلی روش‌های فنوتیپی دارای محدودیت‌ها و معایبی در شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که از آنجمله می‌توان 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 می‌تواند نتایج یکسانی حاصل کند [۹].

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

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

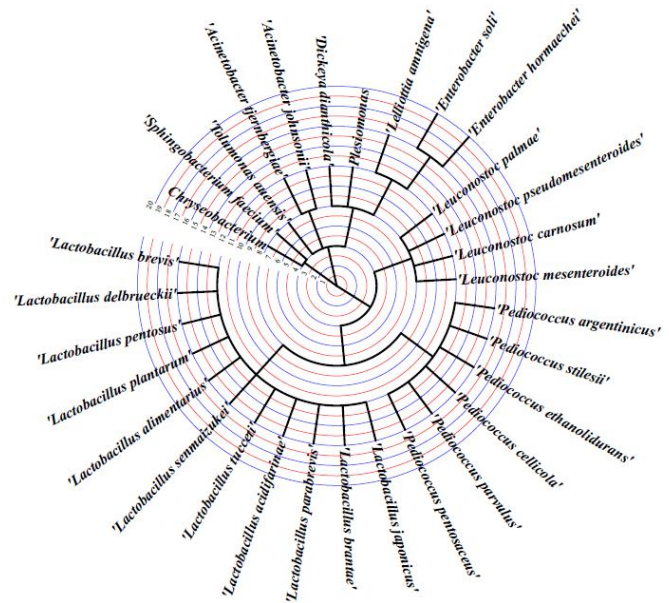


Fig 4 A phylogenetic tree based on next generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons from bacterial community in pickled vegetable with tomato juice (sample 2)

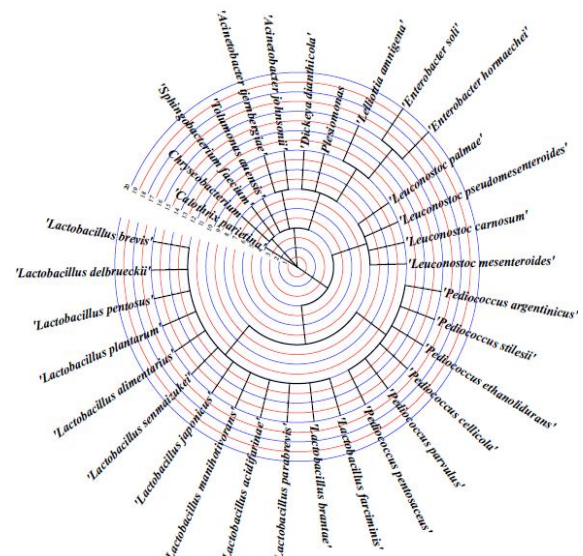


Fig 5 A phylogenetic tree based on next generation sequencing of 16S rRNA gene amplicons from bacterial community in pickled vegetable with tomato juice (sample 3)

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

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 در جدول 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 *Lactobacillus brevis* ۱۹/۳۲٪، *Lactobacillus japonicus* ۱۳/۲۵٪، *Lactobacillus pentosus* ۱۰/۲۶٪، *Lactobacillus senmaizukei* ۴/۶۰٪، *Lactobacillus plantarum* ۲/۶۵٪ و *Leuconostoc mesenteroides* ۲/۳۲٪ بیشترین سهم را در تخمیر دارند. براساس مطالعات قبلی انجام شده در بین میوه‌ها و سبزیجات تخمیر شده به صورت خودبه خودی، باکتری *Lactobacillus plantarum* از گوجه‌فرنگی، هویج، بادمجان، چغندر قرمز، خیار، پاپایا، کلم، رازیانه، کیوی، آناناس، آلو و گیلاس؛ باکتری *Lactobacillus pentosus* از بادمجان، پاپایا و خیار؛ باکتری *Lactobacillus brevis* از گوجه‌فرنگی، بادمجان، کلم، خیار، هندوانه؛ باکتری *Leuconostoc mesenteroides* از کلم سفید، هویج، فلفل، خیار، بادمجان، کاهو و توت‌ها؛ باکتری *Pediococcus pentosaceus* از لوبیاسبز تازه، گوجه‌فرنگی، گیلاس و کلم؛ باکتری‌های *Enterococcus faecalis* و *Enterococcus faecium* از گوجه‌فرنگی و لوبیای سبز تازه جدا گردیده‌اند [۱۳]. مشابه مطالعه ما، تحقیقات گذشته بر روی فراورده‌های تخمیری شوری سبزیجات نظیر ساورکرات حضور گونه‌های میکروبی مشابه را ثابت کرده است. بطوریکه تخمیر توسط *Leuconostoc mesenteroides* شروع می‌شود. این باکتری قند را به اسید لاکتیک، اسید استیک، الکل، دی‌اکسید کربن و سایر متابولیت‌های میکروبیکیه در طعم کلم ترش شرکت می‌کنند تبدیل می‌کند. دی‌اکسید کربن به حفظ شرایط بی‌هوازی در تخمیر کلم برگ کمک می‌کند. زمانی که اسید تجمع می‌یابد، از رشد *Leuconostoc mesenteroides* ممانعت می‌شود. اما تخمیر با رشد *Lactobacillus brevis* و

Lactobacillus brevis ۱۷/۲۶٪ باکتری غیرقابل طبقه بندی، *Lactobacillus japonicus* ۱۳/۲۵٪، *Lactobacillus pentosus* ۱۰/۲۶٪، *Lactobacillus senmaizukei* ۴/۶۰٪، *Lactobacillus plantarum* ۲/۳۲٪ و *Leuconostoc mesenteroides* ۲/۳۲٪ 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 نمی‌باشند. 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 و ابزاری جامع به نام متازنومیکس راه حل مناسب رفع این مشکل است. متازنومیکس اجازه مطالعه اکولوژی میکروبی در سطح بسیار بالاتر و جزئی‌تر از قبل را می‌دهد. هدف ما در این مطالعه نیز استفاده از تکنیک متازنومیکس بر پایه نسل جدید توالی‌یابی جهت شناسایی دقیق و کامل جامعه میکروبی نمونه بود. در مطالعه حاضر با استفاده از تکنیک NGS علاوه بر جنس‌های لاکتیکی نظیر *Pediococcus*، *Lactobacillus* و *Leuconostoc* لاکتیکی نظیر *Erwinia*، *Enterobacter*، *Acinetobacter* و *Dickeya* نیز در فرایند تخمیر تایید گردید. مشابه تحقیق ما، براساس مطالعات انجام شده در دنیا بر روی فرایندهای تخمیری

در مطالعه نقش *Lactobacillus brevis* به عنوان فلور غالب تایید شد که احتمالاً از اواسط تخمیر تا انتهای تخمیر حضور داشته است، همچنین *Lactobacillus plantarum* نیز به میزان نسبتاً کمتری شناسایی شد که احتمالاً نظیر سایر تخمیرهای مشابه سبزیجات در انتهای تخمیر شروع به فعالیت کرده اما نتوانسته است فلور میکروبی غالب را تشکیل دهد. حضور گونه‌های متفاوت دیگری نظیر *Lactobacillus japonicus*، *Lactobacillus senmaizukei*، *Lactobacillus pentosus* و *Lactobacillus acidifarinae* (شکل ۱) که قبلاً در مطالعات مشابه کمتر گزارش شده است می‌تواند نشان دهد که دقت بالای روش NGS قادر به شناسایی این گونه شده است و یابان محیط تخمیری شرایط منحصر به فردی را برای رشد این گونه‌های نامتداول میکروبی در محصول تخمیری شور سبزیجات فراهم کرده است. باکتری *Lactobacillus senmaizukei* تشخیص داده شده در مطالعه ماکه اخیراً شناسایی شده است اولین بار از محصول شور ژاپنی جدا و شناسایی گردید [۱۶].

در اکثر مطالعات مشابه انجام شده تنها حضور گونه‌های *Pediococcus pentosaceus* و *Pediococcus cervisiae* در تخمیر گزارش شده است در صورتیکه در مطالعه ما گونه‌های متفاوت دیگری از پدیوکوکوس شامل *Pediococcus pentosaceus*، *Pediococcus parvulus*، *Pediococcus cellicola*، *Pediococcus argentiniensis* تایید شد که *Pediococcus parvulus* سهم بیشتری داشته است (شکل ۱). به علاوه حضور گونه *Leuconostoc palmae* که در گذشته در محصولات تخمیری شور سبزیجات گزارش نگردیده بود نیز درخور توجه است. حضور *Enterobacter soli* 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. *Erwinia* از 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

Pediococcus cervisiae و سرانجام *Lactobacillus plantarum* ادامه می‌یابد. مطالعه انجام شده بر روی فرایند تخمیر خیار شور نشان داده است که که قندی که از خیار به محیط بیرون منتشر می‌شود، به طور متوالی توسط *Mesenteroides*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus brevis*، *Pediococcus cervisiae*، *Leuconostoc* تخمیر می‌شود. بسته به شرایط تخمیر، حدود ۰/۶ تا ۱/۲٪ اسید لاکتیک در طی ۷ تا ۱۴ روز 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 بر روی ژن *SrRNA* ۱۶، علاوه بر آنکه حضور فلور میکروبی ناهمگنی را تایید کرد، نشان داد که فلور غالب قوی در این جدایه‌ها متعلق به *Lb. casei* می‌باشد. 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 Fluorescent in situ hybridization (FISH) با پروب‌های شناسایی ویژه در سطح گونه تایید شد. همچنین بررسی و شناسایی کلنی‌های رشد یافته روی پلیت‌های حاوی *rogo agar* توسط PCR-DGGE نشان داد که *Ln. pseudomesenteroides* در میوه زیتون وجود دارد. در این مطالعه جنس‌های دیگر نظیر *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 تانک‌های تخمیر علاوه بر ابزارهای مورد استفاده در تولید منشا می‌گیرند [۱۴، ۱۵].

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 *Lactobacillus koreensis* شدند آن‌ها همچنین نشان دادند که *Lactobacillus brevis* نیز یکی از فلور باکتریایی اصلی این تخمیر می‌باشد [۱۵].

۵- 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 & Momeni Shahraki, 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 Edalatian Dovom, 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., Meghrou, 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.

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

۴- نتیجه گیری

بر اساس 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*, *Pediococcus Pentosaceus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus cellicola*, *Pediococcus argentinicus* 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 اصلاً گزارش نگردیده است. این تکنیک همچنین حضور جنس‌های غیرلاکتیکی نظیر *Erwinia Dickeya* را در تخمیر نشان داد. از آنجاییکه تکنیک‌های مورد استفاده در مطالعات مشابه قبلی بیشتر بر اساس 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 موفق‌تر عمل 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 بر اساس نتایج مطالعه ماحضور باکتری‌هایی نظیر *Lactobacillus plantarum* و *Lactobacillus pentosus* که قبلاً 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 جداپه‌های لاکتیکی در مطالعات آتی بررسی گردد.

- 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.
- [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

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 from three 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 Illumina MiSeq platform. These data were analyzed employing BaseSpace software and Greengenes database. The analysis revealed 77.12% *Lactobacillus*, 7.51% *Pediococcus*, 5.61% *Leuconostoc*, 1.20% *Acinetobacter*, 1.00% *Enterobacter*, 0.35% *Erwinia*, 0.35% *Dickeya* as 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% *Leuconostoc mesenteroides* and 2.32% *Lactobacillus acidifarinae* and 17.26% unclassified bacteria were identified. The same identification results were obtained by both phenotypic and Next-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*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* as dominant flora, were involved in fermentation process. Non-lactic acid bacteria such as *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia* and *Dickeya* genera may play important role in fermented pickled vegetable with tomato juice ripening. Moreover, probiotic bacteria such as *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus*, *Leuconostoc mesenteroides* 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