شناسایی ریزسازواره های نمونه های دوغ صنعتی ایرانی

نیلوفر باقری پور فلاح[۱]، سید امیر محمد مرتضویان فارسانی[۲*]، هدایت حسینی[۲]، فرزانه شهراز[۳]، ایاد بهادری منفرد[۴]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی انیستیتو تحقیقات تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علو پزشکی شهید بهشتی
۲- دانشیار انیستیتو تحقیقات تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
۳- کارشناس آزمایشگاه انیستیتو تحقیقات تغذیه و علوم غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
٤- استادیار دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی

(تاریخ دریافت: ۹۲/۷/۹ تاریخ پذیرش: ۹۳/۱۲/۹)

چکیده

دوغ یک نوشیدنی سنتی ایرانی است که از طریق تخمیر لاکتیکی شیر پاستوریزه تولید می شود. به منظور شناسایی و جداسازی ریزسازواره های موجود در نمونه های دوغ های صنعتی ایران از روش واکنش PCR و توالی یابی استفاده شد. نمونه های دوغ مورد آزمون متشکل از ۱۷ نام تجاری بود. پس از انجام شناسایی مقدماتی با استفاده از روش های مشاهده میکروسکوپی و بیوشیمیایی، برای تایید نتایج حاصل از نمونه ها محیط های کشت خالص تهیه و شناسایی با استفاده از روش PCR و توالی یابی ادامه یافت. براساس نتایج حاصل از توالی خوانی ژن 16S rRNA باکتری های لاکتوباسیلوس (*ل. برویس، ل. فرمنتوم، ل. پاراکازئی، ل. گالیناروم*) از خانواده باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک، باسیلوس های اسپوردار گرم مثبت (*ب. لیچینه فرمیس، ب. آنتراسیس* و *ب. سوبتیلیس*) و باکتری های تولیدکننده اسیداستیک (*استوباکتر تروپیکالیس* و *استوباکتر ایندونزینسیس*) شناسایی شدند. علاوه بر آن براساس نتایج حاصل از توالی خوانی ژن D1/D2 26S rDNA مخمرهای *پیشیا فرمنتنس*، *کریپتوکوکوس مگنوس* و *ساکارومایسس یونیسپوروس* در نمونه های دوغ صنعتی یافت شدند. یافته های این مطالعه نشان داد که علاوه بر باکتری های لاکتیکی غیراستارتری، سایر انواع باکتری ها و مخمرها در نمونه های دوغ صنعتی ایران حضور داشته باشند.

کلید واژگان: دوغ صنعتی ایران، PCR، باکتری‌های غیراستارتری لاکتیکی، باسیلوس‌های اسپوردار گرم مثبت، استوباکترها و مخمرها

*مسئول مکاتبات: mortazvn@sbmu.ac.ir

۱- مقدمه

دوغ یک فرآورده شیر تخمیری است که حاصل اختلاط ماست با آب قابل شرب و نمک خوراکی ویا اختلاط شیر با آب قابل شرب و نمک خوراکی قبل از تیمار حرارتی و تخمیر است. ریزسازواره های معمول مورد استفاده بهه عنوان استارتر در تولید دوغ همان استارترهای سنتی تولید ماست یعنی استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی بولگاریکوس هستند [۱]. دوغ نوشیدنی سنتی ایران است. دوغ به دیگر کشورهای جهان نظیر افغانستان، آذربایجان، ارمنستان، عراق، سوریه، ترکیه و بالکان و تااندازه ای به آسیای مرکزی و خاوریانه صادر می شود [۲]. میزان مصرف سرانه و تولید صنعتی دوغ در سال های اخیر رشد قابل توجهی داشته است و در سال ۱۳۹۰، تنها ۱٤۰۰۰۰۰ تن دوغ در ایران تولید که از این میزان ۱۲۵۰۰۰۰ تن در داخل کشور مصرف و ۱۵۰۰۰۰ تن صادر شده است [۲].

دوغ بصورت دوغ ساده، دوغ طعم دار و دوغ گرمادیده یا گرماندیده ویا دوغ گازدار یا بدون گاز طبقه بندی می شود. دوغ ساده در طعم های مختلف در اشکال اسانس یا عصاره ها (نظیر نعنا، پونه و کاکوتی) تولید می شود. دوغ طعم دار حاوی طعم های طبیعی نظیر گیاهان معطر، ادویجات و چاشنی ها است. دوغ‌های گازدار یا بدون گاز ویا گرمادیده یا گرماندیده، دوغ‌هایی هستند که حاوی گاز دی‌اکسیدکربن هستند یا نیستند و بعد از تخمیر گرما می بینند یا نمی بینند [۱].

باتوجه به اینکه آلودگی مواد غذایی به ریزسازواره ها یک مشکل اساسی است، لذا بهره گیری از روش های شناسایی مناسب و دقیق از اهمیت بالایی برخوردار است. روش های بسیاری برای شناسایی ریزسازواره ها در انواع مواد غذایی توسعه داده شده است [۸-۳]. از میان این روش ها، تکنیک واکنش زنجیری پلیمراز خاص بوده و دارای حساسیت بالایی است که در آن نتایج در عرض چند ساعت حاصل می شود. هدف های ژنومی متفاوتی توسط این روش تاکنون تکثیر یافته است. آنالیز 16S rRNA و آنالیز توالی های حاصل برای مطالعه ریزسازواره های مختلف موجود در نمونه ها بطور گسترده استفاده می شود [۱۰-۹]. آنالیز محدوده 16S rRNA نشان داده شده است که ابزاری قدرتمند برای بررسی تمایزات بیولوژیکی می باشد. این روش مزایای بسیاری دارد: ساختار DNA در مراحل فیزیولوژیکی ثابت باقی می ماند، ترکیب آن به شرایط محیط کشت بستگی ندارد و مناطقی با درجات مختلف دارد که به شناسایی اختصاصی گونه امکان می دهد [۱۱].

ژو و همکاران (۲۰۰٦) از روش ملکولی PCR-DGGE و توالی یابی ژن 16S rDNA برای شناسایی انواع باکتری ها و توالی یابی ژن 26S rDNA برای شناسایی انواع مخمر موجود در کفیر ناحیه تبت بهره بردند. محققین توانستند ۸ گونه باکتریایی متعلق به باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک و ۵ مخمر را در نمونه های کفیر شناسایی کنند. مقایسه توالی ها نشان داد که گونه های غالب عبارت بودند از *لوکونوستوک مزنتروئیدیس* (*Leuconostoc mesenteroides*)، *لاکتوکوکوس لاکتیس* (*Lactococcus lactis*)، *لاکتوباسیلوس کفیری* (*Lactobacillus kefiri*)، *ل. کازئی* (*Lactobacillus casei*)، *کلایورومایسس ماریکسیانوس* (*Kluyveromyces marxianus*)، *ساکارومایسز یونیسپوروس* (*Saccharomyces unisporus*)، *ساکارومایسز سروزیه* (*Saccharomyces cerevisiae*) و *کاندیدا هیومیلیس* (*Candida humilis*) [۱۲]. البرادعی و همکاران (۲۰۰۸) توانستند با استفاده از روش ملکولی PCR-DGGE و توالی یابی ژن 16S rRNA تنوع باکتریایی موجود در شیر تخمیری سنتی کشور مصر به نام *زابادی* را جداسازی و شناسایی کنند. آن ها نشان دادند که درصد بالایی از گونه های باکتریایی شناسایی شده به خانواده باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک تعلق داشت و عبارت بودند از *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* (*Streptococcus thermophilus*)، *لاکتوکوکوس گارویه* (*Lactococcus garvieae*)، *ل. رافینولاکتیس* (*Lactococcus raffinolactis*)، *ل. لاکتیس* (*L. lactis*)، *لوکونوستوک سیتروم* (*Leuconostoc citreum*) و *لاکتوباسیلوس دلبروکه‌ئی بولگاریکوس* (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) و *ل. ججونی* (*Lactobacillus johnsonii*) [۱۳]. یوچیدا و همکاران (۲۰۰۹) با بهره گیری از روش شناسایی ملکولی RAPD-PCR سعی در شناسایی فلورمیکروبی باکتریایی نمونه های

شیر تخمیری سنتی کشور ژاپن معرف به ماست دریای کاسپین داشتند. این محققین توانستند با این روش نشان دهند که در نمونه های شیر تخمیری باکتری های *لاکتوباسیلوس لاکتیس* (*Lactobacillus lactis*)، *ل. ساکی* (*L. sakei*)، *ل. پلانتاروم* (*L. plantarum*)، *ل. کازئی* (*L. casei*)، *ل. کفیری* (*L. kefiri*)، *لوکونوستوک مزنتروئیدیس* (*Leuconostoc mesenteroides*) و *استوباکتر استی* (*Acetobacter aceti*) حضور داشتند [۱٤]. بانیکو و ویلتووا (۲۰۰۹) در مطالعه سعی کردند با استفاده از روش ملکولی PCR ریزسازواره های آلوده کننده ماست و راه های ورود احتمالی آن ها را شناسایی کنند. این محققین نشان دادند که ریزسازواره های آلوده کننده ماست عبارت بودند از *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus*) و *ب. لیچنه فرمیس* (*Bacillus licheniformis*). آن ها همچنین نشان دادند که شیر پاستوریزه مصرفی در تولید ماست از منابع اصلی آلوده کننده می باشد [۱۵]. حسینی و همکاران (۲۰۱۲) با بهره گیری از روش ملکولی PCR-DGGE و توالی یابی ژن 16S rDNA سعی کردند باکتری های آلوده کننده کفیر ایرانی را جداسازی و شناسایی کنند. آن ها نشان دادند که انواع باسیلوس شامل *ب. سرئوس* (*Bacillus cereus*)، *ب. سوبتیلیس* (*B. subtilis*) و *ب. تورینجینسیس* (*B. thuringiensis*) باکتری های آلوده کننده کفیر ایرانی می باشند [۱٦].

باتوجه به اینکه تاکنون مطالعه ای در شناسایی ریزسازواره های آلوده کننده دوغ های صنعتی ایران صورت نگرفته است، در پژوهش حاضر سعی شد تا با بهره گیری از واکنش زنجیری پلیمراز 16S rRNA، تکثیر و توالی یابی برای شناسایی این ریزسازواره ها در نمونه های دوغ صنعتی ایران شناسایی شوند.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- جمع آوری نمونه ها

۵۱ نمونه دوغ صنعتی ایرانی از ۱۷ نام تجاری (قابل دسترس در تهران) تمامی هفته اول تولید بطور تصادفی انتخاب و جمع آوری شدند. نمونه ها توسط جعبه حاوی یخ به محل انجام آزمایش منتقل شدند. این نمونه ها از نام های تجاری معروف مناطق شمالی، مرکزی، شرقی و غربی کشور جمع آوری و نمونه گیری در هفته اول تولید انجام شد. نمونه ها در آزمایشگاه تا قبل از شروع آزمایشات در یخچال ۱±٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند [۱٦].

۲-۲- شناسایی مقدماتی و بیوشیمیایی

۱ ml از هر نام تجاری دوغ به منظور ایجاد امکان رشد باکتری های اسید لاکتیک و دیگر ریزسازواره های موجود در نمونه های دوغ و بررسی های میکروسکوپی نظیر شکل و آزمایش گرم به ترتیب در محیط های MRS مایع (۳۰ و ٤۵ درجه سلسیوس به مدت ٤۸ h در شرایط میکروآئروفیلیک) (مرک، آلمان) و BH مایع (در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ h) (مرک، آلمان) انکوباتور گذاری (ژال تجهیز، ایران) شدند. پس از انجام مشاهدات میکروسکوپی، در ادامه ۰/۱ ml از محیط های مایع به محیط های MRS آگار (۳۰ و ٤۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ h) (مرک، آلمان) برای رشد باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک، NA آگار (۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ h) (مرک، آلمان) برای رشد باسیلوس های گرم منفی، MYP (۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ h) (مرک، آلمان) برای رشد باسیل های گرم مثبت و YGC (۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز) (مرک، آلمان) برای رشد مخمرها برای بررسی های بعدی بیوشیمیایی و شناسایی ملکولی تلقیح و انکوباتورگذاری شدند [۱۷].

محیط های کشت باکتری های اسید لاکتیک ٤ الی ۵ بار خالص سازی شدند و پس از اطمینان از خلوص آنها بررسی های بعدی بر روی آنها انجام گرفت. برای شناسایی باکتری های لاکتیکی، روش های فنوتیپی شامل بررسی های مورفولوژیک و آزمون های بیوشیمیایی با توجه به فراهم بودن امکانات انجام گرفت. بدین ترتیب که کلیه کلنی های خالص شده رنگ امیزی گرم و تست کاتالاز را پشت سر گذاشته و کلنی های خالص گرم مثبت و کاتالاز منفی جدا شدند. سپس جهت شناسایی بیشتر یک لوپ از هر کلنی خالص به محیط MRS مایع تلقیح و قابلیت رشد کلنی در دو دمای ۱۰ و ٤۵ درجه سلسیوس، رشد در pH ۹/٦ و ٤/٤، رشد در محیط حاوی ٦/۵ و ٤ درصد نمک و تولید گاز دی اکسیدکربن از گلوکز مورد بررسی قرار گرفت. بر روی کلنی های رشد داده

شده بر محیط کشت MYP پس از انجام رنگ آمیزی گرم، تست های بیوشیمیایی شامل احیای نیترات، مانیتول، سیمون سیترات، ووژس پرسکوئر، همولیز بتا، ژلاتین، نشاسته و دیسک آنتی بیوتیک (سیگما آلدریچ، آمریکا) انجام گرفتند [۱۷].

۲-۳- شناسایی جداسازی شده های باکتریایی با استفاده از روش Polymerase Chain Reaction (PCR)

۲-۳-۱- استخراج DNA

۵ Mm از محیط کشت در BH مایع و MRSمایع که در دمای ۳۰ و ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ h انکوباتورگذاری شده بود، در ۵۰۰۰ g سانتریفیوژ (ژربر، آلمان) شد. سلول های ته نشین شده مجدد در ۵۰۰ µL بافر TE (pH ۸) (۱۰ mM از Tris-HCl، ۱ mM از EDTA)، معلق و سپس با افزودن ۵۰ µL از ۱۰٪ SDS و ۱۰ µL از محلول پروتئیناز K (۱۰ mg/ml) لیز شد. سپس مخلوط در دمای ۵۵ درجه سلسیوس برای مدت ۱ h انکوبارگذاری شد. سپس، ۱۰۰ µL از محلول CTAB/NaCl اضافه شد و مخلوط مجدد در دمای ٦۵ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انکوبارگذاری شد. پروتئین زدایی از طریق استخراج با یک حجم از الکل فنل-کلروفرم-ایزوآمیل (۲۵:۲٤:۱) انجام شد. فاز آبی با استفاده از الکل کلروفرم-ایزوآمیل (۲٤:۱) دوبار استخراج شد. در نهایت، DNA با افزودن ۰/۱ حجم از استات سدیم ۳ M به فاز آبی و یک حجم از کربینول دی متیل سرد رسوب داده شد. DNA با سانتریفیوژ کردن محلول در ۱۰۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه جداسازی و جمع آوری و سپس با اتانول ۷۰٪(سیگما آلدریچ،آمریکا) شستشو و سپس در ۲۰ µL از آب استریل دوبار تقطیر حل شد) [۱۸].

۲-۳-۲- تکثیر DNA استخراج شده با استفاده از PCR

توالی های 16S rRNA از طریق روش PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی 27 F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') و 1495 R (5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3') (سینا ژن، ایران) تکثیر شدند. توالی ها ۱۵۰۰ bp تقریبی میان پرایمرها مرتبط با تعدا نوکلئوتیدها، ۲۷ نوکلئوتید در فاصله ۱۵۱۵-۱٤۹۵، براساس توالی 16S rRNA اشرشیاکلی بودند. ۲۵ µL از مخلوط PCR با ۰/۳ µL از پلیمراز Tag (۵ U/µL، تاکارا، توکیو، ژاپن)، ۲/۵ µL از ۱۰ × بافر PCR (بدون Mg^{2+})، ۲ µL از dNTP (۲/۵ mM)، ۲ µL از $MgCl_2$ (۲۵ mM)، ۰/۳ µL پرایمر پیشرو (۵۰ pM)، ۰/۳ پرایمر عکس (۵۰ pM)، ۱ µL تمپلیت DNA (۱۰۰ ng/µL) و ۱٦/٦ µL از ddH_2O (سیگما آلدریچ،آمریکا) مخلوط شد. شرایط واکنش عبارت بود از: ۹٤ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه، ۹٤ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۵۸ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه، ۷۲ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه، ۳۱ دوره و سپس ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه، ٤ درجه سلسیوس برای ۳۰ دقیقه. محصولات واکنش با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز ۱٪ (مرک، آلمان) کنترل و با استفاده از رنگ آمیزی با ژل رد (GelRed) (سینا ژن، ایران) مشاهده شدند. توالی یابی با همکاری مرکز ذخایر ژنتیک ایران انجام گرفت [۱۹].

۲-۳-۳- توالی یابی

محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی PCR (Qiagen, Netherlands) طبق دستورالعمل سازنده کیت خالص سازی شدند. ابتدا ۵۰۰ µl از بافر PB به ۱۰۰ µl از نمونه PCR اضافه و مخلوط شد. سپس ستون اسپین QIAquick در یک لوله جمع آوری ۲ ml قرار داده شد. برای اتصال DNA، نمونه وارد ستون QIAquick شد و برای ٦۰-۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. مایع معلق شده در سطح خارج و ستون QIAquick مجددا به همان لوله منتقل شد. سپس ۰/۷۵ ml از بافر PE به ستون QIAquick برای شستشو افزوده و مجددا برای ٦۰-۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و مجددا ستون QIAquick به همان لوله بازگردانده و برای ۱ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شد. سپس ستون QIAquick در یک لوله سانتریفیوژ ۱/۵ ml تمیز منتقل شد. در ادامه ۵۰ µl از بافر EB (۱۰ mM از Tris-Cl، ۸/۵ pH) به مرکز غشاء QIAquick افزوده و ستون برای ۱ دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA رقیق شود (کیاژن، هلند) [۲۰].

نوارهای DNA بطور مستقیم توسط Macrogen با استفاده از سیستم توالی یابی MegaBACE^{TM} 1000 اتوماتیک توالی یابی شدند (Amersham Bioscience, USA). نرم افزار chromaspro 1.7.5 (http://technelysium.com.au/page_id=27/) برای مرتب کردن توالی ها با توالی های جداسازی شده های آزمایشی و توالی های همسان موجود در سایت EzBioCloud استفاده شد. جستجوی توالی ها در EzBioCloud صورت گرفت (http://www.ezbiocloud.net) [۲۱].

۲-٤- شناسایی جداسازی شده های مخمری با استفاده از PCR

۲-٤-۱- استخراج DNA

جداسازی اسیدنوکئیک از سلول های مخمری کشت داده شده در محیط کشت عصاره مالت ییست مایع (۳ گرم اکسترکت مخمر، ۳ گرم اکسترکت مالت، گرم پپتون و ۱۰ گرم گلوکز در لیتر آب مقطر) انجام شد. سلول ها در ۲۰ µL آب مقطر معلق و با استفاده از نوک پیپت لیز شدند که در ادامه برای ۱۰ دقیقه در دمای ۹٦ درجه سلسیوس جوشانده شدند. استخراج DNA ژنومی طبق روش پیشنهادی لابوشنگن و آلبرتین (۲۰۰۷) انجام شد. گونه های مخمری بر روی محیط های کشت اکسترکت ییست (۱۰ گرم در لیتر)، پپتون (۲۰ گرم در لیتر) بعلاوه D-گلوکز (۲۰ گرم در لیتر) در لوله های آزمایش درب دار ۱٦ ml در دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای ٤۸ h همراه با تکان خوردن کشت داده شدند. سلول ها با استفاده از سانتریفیوژ در g ۲۰۰۰۰ از محیط کشت جداسازی و با افزودن ۵۰۰ µL از بافر لیز DNA (۱۰۰ mM از Tris-HCl، pH ۸، ۵۰ mM از EDTA، pH ۸، و ۱٪) و گوی های شیشه ای لیز شدند. این محلول به شدت هم زده شد و برای ۵ دقیقه در یخ گذاشته شد. استات آمونیوم (۷۵۰ µL، ۷ M،) به محلول اضافه ، و سپس محلول در دمای ٦۵ درجه سلسیوس برای ۵ دقیقه انکوباتورگذاری و سپس برای ۵ دقیقه در یخ سرد شد. بعد کلروفرم اضافه شد و مخلوط در ۲۰۰۰۰ g برای ۲ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مواد شناور به یک لوله جدید انتقال داده شدند و DNA با افزودن ایزوپروپانول رسوب داده و برای ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس در g ۲۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد. رسوب جداشده با اتانول ۷۰٪ (v/v) شستشو و در ۱۰۰ µL TE مجدد حل شد (Tris-HCl ۱۰ mM و EDTA ۱ mM، pH ۸) (سیگما آلدریچ، آمریکا) [۲۲].

۲-٤-۲- تکثیر DNA استخراج شده با استفاده از PCR

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز PCR برای محدوده 26S rDNA D1/D2 با استفاده از پرایمرهای قارچی NL-1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') و NL-4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (سینا ژن، ایران) انجام شد. به منظور انجام واکنش PCR یک محلول ۵۰ µL حاوی DNA ۱۰ ng، ۲/۵ Mm، $MgCl_2$ ۰/۲۵ Mm، دئوکسی نوکلئوتید تری فسفات (dNTP)، ۰/۱ µM از هر پرایمر و ۰/۵ U Taq polymerase آماده شد. تکثیر توسط GenAmp PCR (مدل ۲٤۰۰) در ۳۵ دوره با شرایط زیر انجام شد: دمای جفت شدن ۵۲ درجه سلسیوس، دمای گسترش ۷۲ درجه سلسیوس برای ۲ دقیقه و دمای دناتوراسیون ۷٤ درجه سلسیوس برای ۱ دقیقه [۲۳]. محصولات PCR بر آگاروز ۱/۵٪ در بافر TAE 1X (Tris-acetate ۰/۰٤ M، EDTA ۰/۰۰۱ M، pH ۸) و رنگ امیزی با ژل رد انجام شد (سیگما آلدریچ، آمریکا)[۲٤].

۲-٤-۳- توالی یابی

محصولات PCR با استفاده از کیت خالص سازی PCR (Qiagen, Netherlands) طبق دستورالعمل سازنده کیت خالص سازی شدند. ابتدا ۵۰۰ µl از بافر PB به ۱۰۰ µl از نمونه PCR اضافه و مخلوط شد. سپس ستون اسپین QIAquick در یک لوله جمع آوری ۲ ml قرار داده شد. برای اتصال DNA، نمونه وارد ستون QIAquick شد و برای ٦۰-۳۰ ثانیه سانتریفیوژ شد. مایع معلق شده در سطح خارج و ستون QIAquick مجددا به همان لوله منتقل شد. سپس ۰/۷۵ ml از بافر PE به ستون QIAquick برای

شستشو افزوده و مجددا برای ٦٠-٣٠ ثانیه سانتریفیوژ شد. مایع رویی خارج و مجددا ستون QIAquick به همان لوله بازگردانده و برای ١ دقیقه با حداکثر سرعت سانتریفیوژ شد. سپس ستون QIAquick در یک لوله سانتریفیوژ ml ١/٥ تمیز منتقل شد. در ادامه µl ٥٠ از بافر EB (mM ١٠ از Tris-Cl، ٨/٥ pH) به مرکز غشاء QIAquick (کیاژن، هلند) افزوده و ستون برای ١ دقیقه سانتریفیوژ شد تا DNA رقیق شود[٢٠].

نوارهای DNA بطور مستقیم توسط Macrogen با استفاده از سیستم توالی یابی MegaBACE^{TM} 1000 اتوماتیک توالی یابی شدند (Amersham Bioscience, USA). نرم افزار chromaspro 1.7.5 (/http://technelysium.com.au/?page_id=27) برای مرتب کردن توالی ها با توالی های جداسازی شده های آزمایشی و توالی های همسان موجود در سایت CBS استفاده شد. جستجوی توالی ها در CBS صورت گرفت (www.cbs.knaw.nl) [٢٥].

٢-٥- روش تجزیه آماری

طرح آماری مورد استفاده در این تحقیق طرح کاملاً تصادفی بود. آنالیز واریانس یکطرفه برای مقایسه اختلاف معنی دار مورد استفاده قرار گرفت. روش دانکن برای مقایسه pH نمونه های دوغ در سطح ٥٪ استفاده شد. نرم افزار آماری مورد استفاده SPSS 16.0.0 بود [٢٦].

٣- نتایج و بحث

٣-١- pH نمونه های دوغ

همانطور که در جدول ١ آورده شده است، pH نمونه های دوغ جمع آوری شده در محدوده ٤/٠٤-٣/٤٧٥ قرار دارد. آنالیز آماری نشان داد که pH نمونه ها با یکدیگر در سطح ٥٪ اختلاف معنی دار داشتند. و بالاترین میزان pH با ترتیب به نمونه های ٢ و ٥ تعلق داشت (جدول ١).

جدول ١ pH نمونه های دوغ جمع آوری شده

شماره نمونه	٢	٥	١	٤	١٤	١٥
pH	٤/٠٤±٠/٠١٣^{a}	٣/٨٣٦±٠/٠١١^{b}	٣/٦٤٥±٠/٠١٢^{c}	٣/٦٥١±٠/٠١^{c}	٣/٦٥٥±٠/٠٠٩^{c}	٣/٦٥٠±٠/٠١١^{c}

حروف غیر یکسان در ردیف، در سطح ٥ درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

ادامه جدول ١

شماره نمونه	٣	٨	٩	١٢	١٦	١٧
pH	٣/٥٥٤±٠/٠١٣^{d}	٣/٥٥١±٠/٠١٢^{d}	٤/٥٥٠±٠/٠١٤^{d}	٣/٥٤٨±٠/٠٠٨^{d}	٣/٥٤٧±٠/٠١^{d}	٣/٥٤٤±٠/٠٠٩^{d}

حروف غیر یکسان در ردیف، در سطح ٥ درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

ادامه جدول ١

شماره نمونه	١٣	٧	١٠	١١	٦
pH	٤/٠٤±٠/٠١٣^{ed}	٣/٨٣٦±٠/٠١١^{e}	٣/٦٤٥±٠/٠١٢^{fe}	٣/٦٥١±٠/٠١^{fe}	٣/٦٥١±٠/٠١^{f}

حروف غیر یکسان در ردیف، در سطح ٥ درصد با یکدیگر اختلاف معنی دار دارند.

۳-۲- باکتری

۳-۲-۱- لاکتوباسیلوس ها

آنالیزهای بیوشیمیایی جداسازی شده ها برپایه خصوصیاتی نظیر قابلیت تولید دی اکسیدکربن از گلوکز، قابلیت رشد در دماهای ۱۰ و ٤٥ درجه سلسیوس، قابلیت رشد در غلظت نمک ٤ و ٦/٥ درصد و قابلیت رشد در ٤/٤ و ٩/٦ pH صورت گرفت. که نتایج آن در جدول ۲ آورده شده است. مقایسه جدول ۲ با جدول ارایه شده توسط کنت تودار (۲۰۰۸) [۲۷] بیانگر حضور انواع لاکتوباسیلوس در نمونه های دوغ صنعتی ایران است.

جدول ۲ شناسایی بیوشیمیایی باکتری های اسید لاکتیک

شماره نمونه	شکل	رنگ آمیزی گرم	تولید CO_2 از گلوکز	رشد در دمای (C°)		رشد در محلول نمکی		رشد در pH		نزدیک ترین ریزسازواره شناسایی شده
				۱۰	٤٥	٤٪	٦/٥٪	٤/٤	٩/٦	
۲، ۳، ٤، ۷، ۹، ۱۰، ۱۳ و ۱٦	میله ای	+	−	−	+	+	−	+	+	لاکتوباسیلوس
۱، ۷، ۱۲، ۱۳ و ۱٤	میله ای	+	−	+	−	+	+	−	+	لاکتوباسیلوس
۱، ۸، ۱۱ و ۱٥	میله ای	+	−	−	+	+	−	−	+	لاکتوباسیلوس
٦، ۱۲، ۱٤ و ۱۷	میله ای	+	−	+	+	+	−	+	+	لاکتوباسیلوس
٤، ٥، ٦، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱٥ و ۱۷	میله ای	+	−	+	+	+	+	+	+	لاکتوباسیلوس
۲ و ۳	میله ای	+	−	+	−	+	+	+	+	لاکتوباسیلوس
٤، ٥، ۹ و ۱۷	میله ای	+	−	−	+	+	−	+	+	لاکتوباسیلوس

پس از جداسازی و استخراج DNA نمونه های مشکوک به باکتری های لاکتوباسیلوس و با وارد ساختن توالی های حاصل برای هر جداسازی شده در سایت EzBioCloud گونه های لاکتوباسیلوس موجود در هر یک از نمونه های دوغ شناسایی شد (جدول ۳) که عبارت بودند از: *ل. فرمنتوم*، *ل. پاراکازئی*، *ل. برویس* و *ل. گالیناروم*. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می شود، *ل. فرمنتوم* به شماره دسترسی AJ575812 به ترتیب با درصد تشابه ۱۰۰٪ در نمونه های ۲، ۳، ٤، ۷، ۹، ۱۰ و ۱۳، با درصد تشابه ۹۹/۷۳٪ در نمونه های ۱، ۸، ۱۱ و ۱٥و با درصد تشابه ۹۹/۷۲٪ در نمونه های دوغ ٦، ۱۲، ۱٤، ۱٦ و ۱۷ شناسایی شد. *ل. پاراکازئی* به شماره دسترسی ACGY01000162 به ترتیب با درصد تشابه ۹۹/۹۳٪ در نمونه های ۱، ۷، ۱۲، ۱۳ و ۱٤ و با درصد تشابه ۱۰۰٪ در نمونه های ٦، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱٥ و ۱۷ شناسایی شد. در نمونه های ٤، ٥، ۹ و ۱۷ ل. برویس با درصد تشابه ۱۰۰٪ و به شماره دسترسی CP000416 و ل. گالیناروم در نمونه های ۲ و ۳ به شماره دسترسی AJ417737 و با درصد تشابه ۹۹/٥۲٪ شناسایی شدند. همانطور که مشاهده می‌شود، یافته های توالی‌یابی جداسازی شده ها شناسایی مقدماتی بیوشیمیایی مبنی بر حضور لاکتوباسیلوس ها و تشکیل فلورمیکروبی غالب در نمونه های دوغ صنعتی ایران را تایید می کنند.

باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک بطور گسترده در صنایع لبنی مورد استفاده قرار می گیرند. اوگیر و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از روش TTGE نشان دادند که باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک فلورمیکروبی غالب در انواع محصولات لبنی مورد آزمون را تشکیل می دادند [۲۸].

جدول ۳ شناسایی باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از نمونه ها براساس توالی ژن 16S rRNA

شماره نمونه	اندازه توالی	درصد تشابه	گونه شناسایی شده	شماره دسترسی
۲، ۳، ٤، ۷، ۹، ۱۰، ۱۳ و ١٦	۹۳۹ نوکلئوتید	۱۰۰	*ل. فرمنتوم CECT 562*	AJ575812
۱، ۷، ۱۲، ۱۳ و ١٤	١٤٧٢ نوکلئوتید	۹۹/۹۳	*ل. پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی* ATCC 25302	ACGY01000162
۱، ۸، ۱۱ و ۱۵	١٤٩٤ نوکلئوتید	۹۹/۷۳	*ل. فرمنتوم CECT 562*	AJ575812
٦، ۱۲، ١٤ و ۱۷	١٤٢٣ نوکلئوتید	۹۹/۷۲	*ل. فرمنتوم CECT 562*	AJ575812
٤، ۵، ٦، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۵ و ۱۷	١٤٤٦ نوکلئوتید	۱۰۰	*ل. پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی* ATCC 25302	ACGY01000162
۲ و ۳	١٤٤٢ نوکلئوتید	۱۰۰	*ل. برویس* ATCC 367	CP000416
٤، ۵، ۹ و ۱۷	١٤٦٦ نوکلئوتید	۹۹/۵۲	*ل. گالیناروم زیرگونه پاراکازئی* ATCC 39199	AJ417737

البرادعی و همکاران (۲۰۰۸) با بهره گیری از روش PCR-DGGE گزارش دادند که فلورمیکروبی غالب در شیر تخمیری سنتی به نام زابادی به انواع باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک تعلق داشت [۱۳] و همچنین در مطالعه صورت گرفته توسط گارسیا و همکاران (۲۰۰۹) با استفاده از روش RT-PCR نشان دادند که فلور میکروبی غالب در نمونه های شیر تخمیری باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک بودند [۲۹]. در مطالعه حاضر نیز نشان داده شد که فلورمیکروبی غالب شناسایی شده در نمونه های دوغ صنعتی ایران براساس خواص بیوشیمیایی به گونه های لاکتیکی تعلق داشت (جدول ۲) و توالی یابی محصولات PCR گونه های لاکتیکی جداسازی شده از نمونه ها براساس 16S rRNA نشان داد که فلورمیکروبی لاکتیکی عبارت بودند از: انواع لاکتوباسیلوس شامل *ل. پاراکازئی* (١٤ نمونه)، *ل. فرمنتوم* (١٦ نمونه)، *ل. برویس* (٤ نمونه) و *ل. گالیناروم* (۲ نمونه) (جدول ۳). از آنجایی که کاریدی (۲۰۰۳) در تحقیقات خود به این موضوع اشاره کرد که رشد لاکتوباسیلوس ها در pH پایین بیشتر از سایر جنس های لاکتیکی است [۳۰].

باکتری های تولیدکننده اسیدلاکتیک شناسایی شده در تحقیق حاضر، جزو انواع غیراستارتری از باکتری های اسیدلاکتیک می باشند [۳۱]. بطور کلی، این باکتری ها فاقد مقاومت حرارتی در برابر تیمارهای حرارتی نظیر پاستوریزاسیون می باشند. بنابراین این باکتری ها اساسا بعد از اعمال فرآیند حرارتی از منابعی نظیر محیط کارخانه، تجهیزات فرآوری، آب، هوا و یا شیر پاستوریزه؛ بواسطه عدم کارایی فرآیند حرارتی بر روی شیر خام در غیرفعال کردن کامل این باکتری ها، وارد محصول نهایی می شوند [۳۲]. همانطور که بیان شد یکی از منابع اصلی آلوده کننده سطوح تجهیزات فرآوری محصولات لبنی است. درحقیقت، باکتری های غیراستارتری لاکتیکی با تشکیل بیوفیلم های مقاوم برروی سطوح (تیمارهای حرارتی، ترکیبات ضدمیکروبی، محلول های ضدعفونی کننده تجهیزات) خود به محصول نهایی می رسانند [۳۳].

تحمل *ل. گالیناروم* تا غلظت نمک ٤٪ [۱۷] و تحمل نمک سایر انواع لاکتوباسیلوس شناسایی شده در تحقیق حاضر تا غلظت نمک ٦/۵٪، براساس آزمایشات بیوشیمیایی صورت گرفته (جدول ۲)، بیانگر قابلیت رشد این ریزسازواره ها در نمونه های دوغ صنعتی ایران با درنظر گرفتن محدوده غلظت نمک آن ها (۱-۰/٦٪) است. حضور گونه های لاکتیکی شناسایی شده در این تحقیق پیشتر توسط سایر محققین در دیگر نمونه های تخمیری محصولات لبنی گزارش شده است. چن و همکاران (۲۰۱۰) توانستند *ل. فرمنتوم* را با استفاده از روش PCR و توالی یابی 16S rRNA در نمونه های شیر تخمیری سنتی ناحیه تبت جداسازی و شناسایی کنند [۱۹]. ماتارا و همکاران (۲۰۰٤) *ل. پاراکازئی* و *ل. فرمنتوم* را در نمونه های شیر تخمیری سنتی کشور کنیا به نام کوله نائوتو شناسایی کردند [۳٤]. ایسونو و همکاران (۱۹۹٤) حضور *ل. برویس* در نمونه های شیر تخمیری تولید شده در شمال کشور تانزانیا را گزارش دادند [۳۵].

۳-۲-۲- باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار

آنالیزهای بیوشیمیایی برپایه خصوصیاتی همچون احیای نیترات، سیمون سیترات، همولیز نشاسته، ذوب ژلاتین، ووژس پرسکوئر، مصرف مانیتول، همولیز بتا و دیسک آنتی بیوتیک صورت گرفت. همانطور که در جدول ٤ آورده شده است، باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار در ۷ نمونه از نمونه های دوغ صنعتی شناسایی شدند. مقایسه نتایج حاصل با جدول ارایه شده توسط مک فادین (۱۹۷٦) [۳٦] نشان داد که در

نمونه های ۱، ۵ و ۱٤ با توجه به منفی بودن آزمون های سیمون سیترات و ووژس پرسکوئر و مثبت بودن سایر آزمون ها باسیلوس احتمالی *باسیلوس سیرکولانس* (*Bacillus circulans*) است. در نمونه های ۲ و ٤ منفی بودن آزمون های سیمون سیترات، همولیز نشاسته، مصرف مانیتول و دیسک آنتی بیوتیک و مثبت بودن سایر تست ها وجود *باسیلوس فرموس* (*B. firmus*) قوت یافت و در نمونه های ۹ و ۱۲ با توجه به اینکه آزمون های ذوب ژلاتین و همولیز بتا مثبت می باشند ریزسازواره مورد آزمون می تواند *باسیلوس اسفریکوس* (*B. sphaericus*) باشد.

جدول ٤ شناسایی بیوشیمیایی باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار

شماره نمونه	رنگ آمیزی گرم	احیای نیترات	سیمون سیترات	هیدرولیز نشاسته	ذوب ژلاتین	ووژس پرسکوئر	مصرف مانیتول	همولیز بتا	دیسک آنتی بیوتیک	نزدیک ترین ریزسازواره شناسایی شده
۱، ۵ و ۱٤	+	+	−	+	+	−	+	+	+	*باسیلوس سیرکولانس*
۲ و ٤	+	+	−	−	+	+	−	+	−	*باسیلوس اسفریکوس*
۹ و ۱۲	+	−	−	−	+	−	−	+	−	*باسیلوس فرموس*

پس از استخراج گونه های باکتری مشکوک که توسط روش های بیوشیمیایی انواع باسیلوس شناسایی شدند و درنتیجه وارد ساختن توالی های بدست آمده در سایت EzBioCloud گونه های باسیلوس متفاوتی شناسایی شد (جدول ۵). همانطور که در جدول ۵ نیز آورده شده است، برخلاف شناسایی بیوشیمیایی گونه شناسایی شده در نمونه های ۱، ۵ و ۱٤ ب. سوبتیلیس با درصد تشابه ۹۹/۹۱٪ و به شماره دسترسی EU138467 است که پیشتر تصور می شد براساس آنالیزهای بیوشیمیایی *ب. سیرکولانس* (جدول ٤) باشد. در نمونه های ۲ و ٤ نیز برخلاف آنچکه در شناسایی بیوشیمیایی ارایه شد (جدول ٤) باسیلوس اسپوردار گرم مثبت مورد نظر براساس توالی حاصل از توالی یابی محصولات PCR با درصد تشابه ۱۰۰٪ *ب. آنتراسیس* به شماره دسترسی AB190217 بود. همچنین نتایج حاصل از وارد ساختن توالی های جداسازی شده های مشکوک به *ب. فرموس* در نمونه های ۹ و ۱۲، براساس آنالیزهای بیوشیمیایی (جدول ٤)، در سایت فوق نشان داد که جداسازی شده مذکور با درصد تشابه ۹۹/۸٦٪ و به شماره دسترسی AE017333 *ب. لیچینه فرمیس* بود که بدین شکل نتایج حاصل از آنالیزهای بیوشیمیایی را تایید نکرد (جدول ٤).

بررسی های بیوشیمیایی وجود انواع باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار در نمونه های دوغ صنعتی ایران را تایید کرد (جدول ٤). آزمون های بیوشیمیایی نشان دادند که ٤۱٪ نمونه ها (۷ نمونه) آلوده به این ریزسازواره ها بودند. توالی یابی براساس 16S rRNA حضور ۳ گونه باسیلوس شامل *ب. سوبتیلیس* (۳ نمونه)، *ب. لیچینه فرمیس* (۲ نمونه) و *ب. آنتراسیس* (۲ نمونه) را در نمونه های دوغ نشان داد (جدول ۵). پیشتر حضور انواع آلودگی به باسیلوس گرم مثبت اسپوردار (*ب. سوبتیلیس* و *ب. سرئوس* (*B. cereus*)) تا ۲۸٪ در نمونه های کفیر ایرانی توسط حسینی و همکاران (۲۰۱۲) براساس روش DGGE و توالی یابی 16S rRNA [۱٦] و بانیکو و ویلتلووا (۲۰۰۹) که توانستند *ب. لیچینه فرمیس* را در نمونه های ماست جداسازی و شناسایی کنند [۱۵]، گزارش شده بود. این گزارشات بیانگر قابلیت رشد گونه های باسیلوس گرم مثبت اسپوردار در pH های پایین همانند pH نمونه های دوغ مطالعه حاضر (جدول ۱) می باشند.

یکی از منابع باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار شیر گرمادیده است. باسیلوس های شناسایی شده در این تحقیق (*ب. سوبتیلیس*، ب. لیچینه فرمیس و *ب. آنتراسیس*) از انواع باکتری های اسپوروترموتالرنت (sporothermotolerant) می باشند. در کارخانجات لبنی برای حذف و یا به حداقل رساندن تعداد اسپورهای موجود در شیر خام از دستگاه باکتریفیوژ استفاده می کنند که می تواند ۹۹-۹۵٪ اسپورها را خارج سازد؛ با این وجود، اسپورهای باقی مانده با توجه به ساختار مقاوم به حرارتشان می توانند وارد شیر گرمادیده شوند [۳۷]. قابلیتشان در تشکیل اندوسپورهای مقاوم به حرارت را در برابر تیمارهای حرارتی نظیر پاستوریزاسیون (۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۵ ثانیه)،استریلیزاسیون (۱۲۰-۱۱۵ درجه سلسیوس برای ۲۰-۱۵ دقیقه) و تیمار حرارتی فرادما (۱٤۲-۱۳۵ درجه سلسیوس برای ۵-٤ ثانیه) امکان بقا را برای آن ها فراهم کرده و بدین شکل وارد شیر حرارت دیده و محصول نهایی می شوند [۳۸].

جدول ۵ شناسایی باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار جداسازی شده از نمونه ها براساس توالی ژن 16S rRNA

شماره نمونه	اندازه توالی	درصد تشابه	گونه شناسایی شده	شماره دسترسی
۱، ۵ و ۱٤	۱٤۳۳ نوکلئوتید	٪۹۹/۹۱	*باسیلوس سوبتیلیس* زیرگونه ایناکواسوریوم BGSC 3A28	EU138467
۲ و ٤	۱٤۹۷نوکلئوتید	٪۱۰۰	*باسیلوس آنتراسیس* ATCC 14578	AB190217
۹ و ۱۲	۱٤۳۰ نوکلئوتید	٪۹۹/۸٦	*باسیلوس لیچینه فرمیس* ATCC 14580	AE017333

طبیعت خاص این ریزسازواره های اسپوردار باعث می شود که جلوگیری از حضور آن ها در محصولات لبنی ناممکن شود. ویلتلووا و همکاران (۲۰۰۲) وجود *ب. سرئوس* و *ب. لیچینه فرمیس* را در شیر فرادما تولیدی در جمهوری چک گزارش دادند [۳۹]. در تحقیق صورت گرفته توسط شاه (۲۰۰۹) برروی شیر پاستوریزه حضور *ب. آنتراسیس* نشان داده شد [٤۰]. براساس مطالعه حسینی و همکاران (۲۰۱۲) برروی شیرهای پاستوریزه مورد استفاده برای تولید کفیر ایرانی آلودگی به گونه های باسیلوس گرم مثبت اسپوردار (۳۸٪) گزارش شد [۱٦]. بنابراین می توان نتیجه گرفت یکی از منابع آلوده کننده نمونه های دوغ مطالعه حاضر به گونه های باسیلوس گرم مثبت اسپوردار می تواند شیر مصرفی در تولید آن ها باشد.

یکی دیگر از منابع محتمل آلوده کننده و طریقه ورود این گونه های اسپوردار به محصول نهایی می تواند هوای کارخانجات تولیدکننده دوغ باشد، از آنجایی که حسینی و همکاران (۲۰۱۲) وجود انواع گونه های باسیلوس ازجمله *ب. سوبتیلیس* و *ب. سرئوس* را در هوای کارخانجات تولیدکننده کفیر ایرانی گزارش دادند [۱٦]. علاوه بر شیر پاستوریزه و هوا، از دیگر راه های ورود این ریزسازواره ها می توان به مواد اولیه [٤۱]،آب [٤۲]، سطوح تجهیزات فرآوری محصولات لبنی، دستگاه پرکن و لوله های آلوده به بیوفیلم های باسیلوس های اسپوردار چسبیده به سطح [۳۳] اشاره داشت.

قابلیت رشد باسیلوس های شناسایی شده در این تحقیق در نمونه های دوغ صنعتی ایران با توجه به دلایل زیر دور از انتظار نیست. (i) تحمل نمک ب. لیچینه فرمیس تا غلظت ۷٪ [۱۷] که با توجه به محدوده غلظت نمک در نمونه های جمع آوری شده در این تحقیق (۱-۰/٦٪) و مقدار نمک مجاز دانسته شده در استاندارد ملی ایران (۱-۰/۲٪) (٤) امکان رشد آن محدود نمی شود؛ (ii) قابلیت رشد ب. لیچینه فرمیس و ب. سوبتیلیس در pHهای پایین [۱۵].

با توجه به بیماری زا بودن باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار شناسایی شده در تحقیق حاضر، حضور این ریزسازواره ها در دوغ صنعتی ایران از نظر خطر سلامتی حائز اهمیت است. به ارتباط *باسیلوس لیچینه فرمیس* و *ب. سوبتیلیس* با برخی سندرم های کلینیکی نظیر ناراحتی های روده ای اشاره شده است [٤۳]. *باسیلوس آنتراسیس* پاتوژن باکتریایی گرم مثبت اسپورزا است که می تواند باعث بروز عوارض تنفسی و روده ای در انسان شود [٤۰]. همچنین با توجه به توانایی *باسیلوس لیچینه فرمیس* و *ب. سوبتیلیس* در تولید توکسین های مقاوم به حرارت این ریزسازوارها می توانند در انسان مسمومیت غذایی ایجاد کنند [٤٤].

اگرچه گزارشی مبنی بر ایجاد فساد در محصولات تخمیری با pH پایین توسط باسیلوس های گرم مثبت اسپوردار شناسایی شده در این مطالعه یافت نشد، گزارشاتی مبنی بر توانایی این ریزسازواره ها در ایجاد فساد در سایر محصولات لبنی بواسطه تولید آنزیم های پروتئولتیک و لیپولتیک مقاوم به حرارت وجود دارد ([٤۵]. برای مثال ایجاد فساد ترش در شیر تغلیظ شده توسط ب. لیچینه فرمیس گزارش شده است [٤٦]. ب. سوبتیلیس نیز عامل ایجاد فساد لخته ای شیرین در شیر و خامه معرفی شد [٤۷]. در نهایت بایستی آلودگی دوغ های صنعتی ایران به باسیلوس های اسپوردار گرم مثبت در ماه های سرد سال بیشتر مورد توجه قرار گیرد، از آنجایی که گزارشاتی مبنی بر جداسازی بیشتر *ب. لیچینه فرمیس* در این ماه ها وجود دارد [٤۸].

۳-۲-۳- باسیلوس های گرم منفی

احتمال وجود انواع باسیلوس های گرم منفی با کشت بر روی محیط کشت NA آگار و انجام رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. بررسی های کشتی و رنگ آمیزی گرم نشان داد که نمونه های ۲، ۳ و ٤ مشکوک به داشتن باسیلوس های گرم منفی بودند. این جداسازی شده ها برای انجام شناسایی

تکمیلی براساس توالی یابی 16S rRNAخالص سازی و در یخچال نگهداری شدند.

با استقرار توالی های حاصل در سایت EzBioCloud در جدول ٦ آورده شده است که تاییدی بر نتیجه رنگ آمیزی گرم و فرضیه وجود باسیلوس های گرم منفی در برخی نمونه های دوغ جمع آوری شده بود. همانطور که در جدول ٦ مشاهده می شود، باکتری های گرم منفی شناسایی شده به خانواده استوباکترها تعلق داشته و عبارتند از: دو گونه *ا. تروپیکالیس* و *ا. ایندونزینسیس*. *ا. تروپیکالیس* به شماره دسترسی AB032354 و با درصد تشابه ۹۹/۸٪ در نمونه ۲ و *ا. ایندونزینسیس* با درصد تشابه ۹۹/۷٪ و به شماره دسترسی AB032356 در نمونه های ۳ و ٤ شناسایی شدند.

جدول ٦ شناسایی استوباکتر گرم منفی جداسازی شده از نمونه ها براساس توالی ژن 16S rRNA

شماره نمونه	اندازه توالی	درصد تشابه	گونه شناسایی شده	شماره دسترسی
۲	۱٤٦۹ نوکلئوتید	۹۹/۸	*استوباکتر تروپیکالیس* NRIC 0312	AB032354
۳ و ٤	۱۳٦۸ نوکلئوتید	۹۹/۷	*استوباکتر ایندونزینسیس* NRIC 0313	AB032356

استوباکترها از دیگر انواع باکتری های آلوده کننده دوغ صنعتی ایران بودند که در این تحقیق جداسازی و شناسایی شدند. اگرچه استوباکترها بواسطه تمایلشان به شرکت در فرایندهایی نظیر اکسیداسیون اتانول، اسیداستیک، استات و لاکتات به دی اکسیدکربن و آب، و اکسیداسیون گلوکز به دهیدروکسی استون [٤۹] عمدتا در میوه جاتی چون انگور،موز، انبه و در محصولاتی نظیر شراب و سرکه یافت می شوند [۵۰]. استوباکترها در ۱۷/٦٪ نمونه ها (۳ نمونه) شناسایی شدند. *ا. تروپیکالیس* و *ا. ایندونزینسیس* براساس توالی یابی 16S rRNA به ترتیب در یک و دو نمونه شناسایی شدند (جدول ٦).

اگرچه این نخستین باری است که حضور این ریزسازواره ها در محصولات لبنی مشاهده می شود، گزارشاتی مبنی بر شناسایی سایر گونه های استوباکتر در انواع محصولات لبنی تخمیری موجود است. در مطالعه ای برای تعیین فلور میکروبی موجود در کفیر برزیلی حضور *ا. لووانینسیس* (*Acetobacter lovaniensis*) (۳۲ جداسازی شده) گزارش شد [۵۱]. حضور *ا. استی* (*A. aceti*) توسط محققین در شیر تخمیری ناحیه تبت [۵۲] و شیر تخمیری کشور ژاپن موسوم به ماست دریای کاسپین (۲ نمونه) [۱٤] تایید شد. مشاهده شد شیر تخمیری ناحیه قفقاز دارای *ا. اورینتالیس* (*A. orientalis*) [۵۳] و شیر ترش تخمیری کشور سودان دارای *ا. پوموروم* (*A. pomorum*) (۱ نمونه) [۵٤] می باشند. همچنین انواع گونه های استوباکتر نظیر *ا. استی*، *ا. لووانینسیس* و *ا. اورینتالیس* با استفاده از روش PCR-DGGE در محصول تخمیری معروف به *ماشیتا* که در غرب کشور اوگاندا تولید می شود، جداسازی شده است [۵۵].

با توجه به گزارشات ذکر شده در بالا مبنی بر جداسازی گونه های مختلف استوباکتر از انواع محصولات لبنی تخمیری و قابلیت رشد گونه های استوباکتر شناسایی شده در مطالعه حاضر (*ا. تروپیکالیس* و *ا. ایندونزینسیس*) در محدوده ۹-۳ pH [۵۰] یعنی همان محدوده pH نمونه های دوغ صنعتی ایران (جدول ۱) حضور این گونه ها در نمونه های دوغ ناممکن نیست. محدوده دمای رشد *ا. تروپیکالیس* و *ا. ایندونزینسیس* ۳۷-۲۰ درجه سلسیوس است و در دمای بالاتر از ٤۰ درجه سلسیوس و در دمای کمتر از ۲۰ درجه سلسیوس غیرفعال می شوند [۵۰]. بنابراین می توان نتیجه گرفت گونه های جداسازی و شناسایی شده در نمونه های دوغ ایرانی بعد از اعمال فرایند حرارتی وارد نمونه ها شده باشند. اگرچه تحقیقی مبنی بر بیان چگونگی ورود گونه های استوباکتر به محصولات لبنی تخمیری یافت نشد. همانطور که درباره چگونگی ورود باکتری های لاکتیکی غیراستارتری حساس به تیمار حرارتی بحث شد، راه های احتمالی ورود استوباکترها می تواند محیط کارخانجات، تجهیزات فرآوری، دستگاه پرکن، هوا و مواد بسته بندی باشد.

۳-۳- مخمرها

وجود مخمر در نمونه های دوغ صنعتی ایران با کشت برروی محیط کشت YGC مورد بررسی قرار گرفت. سپس DNA کلونی های رشد یافته جداسازی و بعد از وارد کردن توالی های بدست آمده در سایت CBS مخمرهای جداسازی شده از

نمونه ها شناسایی و عبارت بودند از: *پیشیا فرمنتس*،*کریپتوکوکوس مگنوس* و *ساکارومایسس یونیسپورا*. *ساکارومایسس یونیسپورا* در ۵ نمونه (۱،، ۵، ۸ و ۱۵) با درصد تشابه ۱۰۰٪ و به شماره دسترسی CBS398 مخمری بود که در بالاترین تعداد نمونه یافت شد. بعد از آن *پیشیا فرمنتس* به شماره دسترسی CBS4611 و با درصد تشابه ۹۹/۸٪ در ٤ نمونه (۳، ۵، و ١٦) قرار داشت و در نهایت *کریپتوکوکوس مگنوس* به شماره دسترسی CBS4685 و با درصد تشابه ۱۰۰٪در نمونه های ۱۵ و ۱۷ شناسایی شد (جدول ۷).

شیر و محصولات شیری محیط مناسبی برای رشد انواع مخمرها می باشند. چن و همکاران (۲۰۱۰) توانستند با استفاده از کیت API *پیشیا فرمنتس* را در شیرخام جداسازی کنند [٥٦]. آلوارز مارتین و همکاران (۲۰۰۷) با بهره گیری از روش RFLP در نمونه پنیر آبی [٥٧] این مخمر را شناسایی کردند. همچنین کالن و همکاران در دو مطالعه مجزا در سال های (۲۰۰٦) و (۲۰۰۷) توانستند به ترتیب *ساکارومیسس یونیسپوروس* را در نمونه های پنیر با استفاده از توالی یابی براساس D1/D2 26S rRNA [٥٨] و *کریپتوکوکوس مگنوس* را در نمونه های شیر بز توسط روش SSCP-PCR [٥٩] شناسایی کنند.

در مطالعه حاضر بالاترین جمعیت میکروبی آلوده کننده شناسایی شده در نمونه های دوغ صنعتی ایران به مخمرها (٤٧٪ نمونه ها، ۸ نمونه) تعلق داشت. توالی یابی براساس D1/D2 26S rDNA حضور *ساکارومیسس یونیسپوروس*، *پیشیا فرمنتس* و *کریپتوکوکوس مگنوس* به ترتیت در ۵، ٤ و ۲ نمونه از نمونه های دوغ را نشان داد (جدول ۷). حضور برخی از گونه های مخمری شناسایی شده در این تحقیق در محصولات لبنی تخمیری دیگر نظیر *ساکارومیسس یونیسپوروس* و *پیشیا فرمنتس* در انواع کفیر، کومیس، ماست و انواع شیر تخمیری پیشتر نیز گزارش شده بود [٦٢-٦٠].

جدول ۷ شناسایی مخمرهای جداسازی شده از نمونه ها براساس ژن D1/D2 26S rDNA

شماره نمونه	اندازه توالی	درصد تشابه	گونه شناسایی شده	شماره دسترسی
۲، ۵، ١٤ و ١٦	۵۱۹ نوکلئوتید	٪۹۹/۸۰۷	*پیشیا فرمنتنس*	CBS4611
۱۵ و ۱۷	٦٢٢ نوکلئوتید	٪۱۰۰	*کریپتوکوکوس مگنوس*	CBS4685
۱، ۲، ۵، ۸ و ۱۵	۵۸۵ نوکلئوتید	٪۱۰۰	*ساکارومایسس یونیسپوروس*	CBS398

اگرچه در منابع علمی مدرکی مبنی بر فسادزا و یا بیماری زا بودن گونه های مخمری شناسایی شده در مطالعه حاضر یافت نشد، با توجه به گزارشات موجود مبنی بر پتانسیل فسادزا و بیماری زا بودن انواع مخمر بواسطه قابلیت رشدشان در غلظت های بالای نمک،محتوای رطوبت کم، pH و دماهای پایین [٦٣] حضور مخمرها در دوغ های صنعتی ایران بایستی محدود شود. مخمرها می توانند باعث تولید گاز و ایجاد بادکردگی و تغییر شکل در بسته بندی، بروز طعم مخمری و دیگر بدطعمی ها،بوی تخمیری، تغییر رنگ و تغییرات بافتی در محصولات لبنی شوند [٦٤]. مخمرها عموما در محصولات لبنی در غیاب لاکتوز فساد ایجاد نمی کنند [٦٥]. با این وجود در صورت آلودگی محصولات لبنی تخمیری به مخمرهای فسادزا، این ریزسازواره ها می توانند علاوه بر ایجاد فسادهای محتمل ذکر شده در بالا با تولید انواع ویتامین ها و اسیدهای آمینه و مصرف اسیدلاکتیک موجود با افزایش pH محصول زمینه را برای رشد باکتری های فسادزای موجود حساس به pH را فراهم کنند [٦٤]. فلیت (۱۹۹۲)، همچنین، به پتانسیل مخمرها در ایجاد ناراحتی های گوارشی، انواع آلرژی و سایر ناراحتی ها در انسان اشاره می کند که مخمرها را خطری بالقوه برای سلامتی انسان ها می سازند [٦٤].

به طور کلی با استناد به دلایل زیر می توان گفت مخمرها پس اعمال فرایند حرارتی وارد نمونه های مورد مطالعه از دوغ صنعتی ایران شده اند. (i) مخمرهای موجود در شیرخام دمای پاستوریزاسیون را نمی توانند تحمل کنند [٦٦]، (ii) رشد مخمرها به واسطه غلظت بالای استارترهای لاکتیکی و دمای تخمیر حدود ٤٥-٤٠ درجه سلسیوس ماست محدود می شود [٦٤]. راه های احتمالی ورود و آلودگی مجدد محصول نهایی می تواند مخمر موجود در بیوفیلم تشکیل شده بر روی تجهیزات فرآوری نظیر ظروف اختلاط، ماشین آلات پرکن و لوله های انتقال باشد که به خوبی تمیز و ضدعفونی نشده اند [٦٧]. از دیگر راه های محتمل ورود همچنین می توان به محیط کارخانه (دیوارها و هوا) [٦٨] و مواد بسته بندی [٦٤] اشاره داشت. همانطور که در جدول ۸ مشاهده می شود، بالاترین تعداد ریزسازواره غیرلاکتیکی به ترتیب به نمونه های

۲ و ۵ تعلق داشت. بگونه ای که در نمونه ۲ یک باسیلوس گرم مثبت اسپوردار، یک استوباکتر و ۲ مخمر شناسایی شد و در نمونه ۵ یک باسیلوس گرم مثبت اسپوردار و ۲ مخمر حضور داشت. در میان نمونه های دوغ جمع آوری شده در تحقیق حاضر بیشترین تعداد ریزسازواره های آلوده کننده جداسازی شده به ترتیب به نمونه های ۲ (٤ جداسازی شده) و ۵ (۳ جداسازی شده) تعلق داشت (جدول ۸). همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود، در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری میان pH نمونه ها وجود داشت که می تواند دلیل احتمالی برای مشاهده بالا بودن تعداد جداسازی شده های آلوده کننده در نمونه های ۲ و ۵ باشد (جدول ۸). از آنجایی که این نمونه ها بالاترین مقدار pH را درمیان سایر نمونه ها داشتند (نمونه ۲: ٤/۰٤ و نمونه ۵: ۳/۸۲٦ pH)، می توان pH نمونه های دوغ را عاملی محدودکننده در رشد جداسازی شده های آلوده کننده دانست.

جدول ۸ تعداد و نوع ریزسازواره جداسازی شده از هر نمونه

نمونه	لاکتوباسیلوس	سایر ریزسازواره ها		
		باسیلوس	استوباکتر	مخمر
۱	۲	۱	–	۱
۲	۱	۱	۱	۲
۳	۲	–	۱	–
٤	۳	۲	۲	–
۵	۲	۱	–	۲
٦	۲	–	–	–
۷	۲	–	–	–
۸	۲	–	–	۱
۹	۳	۱	–	–
۱۰	۲	–	–	–
۱۱	۲	–	–	–
۱۲	۲	۱	–	–
۱۳	۲	–	–	–
۱٤	۲	۱	–	۱
۱۵	۲	–	–	۲
۱٦	۱	–	–	۱
۱۷	۳	–	–	۱

٤- نتیجه گیری

در مطالعه حاضر با هدف شناسایی ریزسازواره های موجود در نمونه های دوغ صنعتی ایران از روش های بیوشیمیایی و ملکولی استفاده شد. همانطور که آزمون های بیوشیمیایی و روش PCR و توالی خوانی ژن 16S rRNA نشان دادند ریزسازواره های آلوده کننده در نمونه های دوغ ایران عبارت بودند از: *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *ل. پاراکازئی*، *ل. گالیناروم* و *ل. برویس*، باسیلوس لیچینه فرمیس، ب. سوبتیلیس و ب. *آنتراسیس*، *استوباکتر تروپیکالیس*، ا. ایندونزینسیس، *پیشیا فرمنتنس*، *کریپتوکوکوس مگنوس* و *ساکارومایسس یونیسپوروس*. ریزسازواره های حاضر طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲٤۵۳ مجاز به حضور در دوغ صنعتی ایران نیستند و اگرچه ریزسازواره های شناسایی شده در این مطالعه بطور کلی در محصولات شیر تخمیری فساد ایجاد نمی کنند، ولی با توجه به پتانسیل باسیلوس های اسپوردار گرم مثبت شناسایی شده در ایجاد انواع عوارض (نظیر ناراحتی های تنفسی و روده ای) و مسمومیت غذایی (بواسطه تولید توکسین های مقاوم به حرارت) و توانایی بالقوه انواع مخمر در ایجاد فساد بواسطه مقاومت در برابر غلظت بالای نمک، فعالیت آبی، pH و دمای نگهداری پایین حضور این ریزسازواره ها بایستی در دوغ صنعتی ایران محدود شود. درنتیجه با توجه به امکان رشد این ریزسازواره ها در دوغ صنعتی ایران و راه های ورود آن ها به محصول دوغ، برای کنترل حضور آن ها در دوغ صنعتی ایران بایستی عمل تولید مناسب (Good Manufacturing Practice (GMP))، عمل بهداشت مناسب (Good Hygiene Practice (GMP)) و تعیین نقاط کنترل بحرانی (Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP)) در کارخانجات و خط تولید دوغ اجرا و رعایت شوند. همچنین اعمال فرایند حرارتی مناسب و کافی، نگهداری محصول نهایی در دماهای یخچالی (۱±٤ درجه سیلسیوس) و دور از نور مستقیم آفتاب طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۲٤۵۳ ضروری است.

۵- تقدیر و سپاسگزاری

باتشکر از انستیتوتحقیقات تغذیه ای و صنایع غذایی کشور برای تامین هزینه های تحقیقاتی مطالعه حاضر.

٦- منابع

[1] Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standard programme, proposed draft codex regional standard for doogh. Beirut, Lebanon, 21-25 January. 2013.

[2] Codex Alimentarius Commission. Joint FAO/WHO food standard programme, project document for a regional standard for Doogh. Tunisia, 24-28 January; 2011.

[3] Baleirascouto, M. M., Hartog, B. J., Huisin't Veld, J. H. J., Hofstra, H., and Van der Vossen, J. M. B. M. (1996). Identification of spoilage yeasts in a food-production chain by microsatellite polymerase chain reaction fingerprinting. Food Microbiology, 13: 59-67.

[4] Caggia, C., Restuccia, C., Pulvirenti, A., and Giudici, P. (2001). Identification of Pichia anomala isolated from yoghurt by RFLP of the ITS region. International Journal of Food Microbiology, 71-73.

[5] Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C., and Comi, G. (2002). An application of PCReDGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. International Dairy Journal, 12: 407-411.

[6] Lieckfeldt, E., Wieland, M., and Börner, T. (1993). Rapid identification and differentiation of yeasts by DNA fingerprinting. Journal of Basic Microbiology, 33: 413-426.

[7] López, V., Querol, A., Ramón, D., and Fernández-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. International Journal of Food Microbiology, 68: 75-81.

[8] Manavathu, E. K., Vakulenko, S. B., Obedeanu, N., and Lerner, S. A. (1996). Isolation and characterization of a species-specific DNA probe for the detection of Candida krusei. Current Microbiology, 33: 147-151

[9] Farrelly, V., Rainey, F. A., and Stackebrandt, E. (1995). Effect of genome size and gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. Applied Environmental Microbiology, 61: 2798-2801.

[10] Suzuki, M. T., and Giovannoni, S. J. (1996). Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rDNA by PCR. Applied Environmental Microbiology, 62: 625-630.

[11] Ness, F., Lavallée, F., Dubourdieu, D., Aigle, M., and Dulau, L. (1993). Identification of yeasts strains using the polymerase chain reaction. Journal of the Science of Food and Agriculture, 62:89-94.

[12] Zhou, J. Z., Dong, M. S., and Jiang, H. (2006). Screen of dominating microbial species isolated from Tibetan Kefir using an integrated approach of PCR-DGGE and culture-dependent methods. Scientia Agricultura Sinica, 8: 8-16.

[13] El-Baradei, G., Delacroix-Buchet, A., and Ogier, J. (2008). Bacterial biodiversity of traditional Zabady fermented milk. International Journal of Food Microbiology, 121(3):295-301.

[14] Uchida, K., Akashi, K., Motoshima, H., Urashima, T., Arai, I., and Saito, T. (2009). Microbiota analysis of Caspian Sea yogurt, a ropy fermented milk circulated in Japan. Animal Science Journal, 80(2):187-92.

[15] Banykó, J., and Vyletělová, M. (2009). Determining the source of Bacillus cereus and Bacillus licheniformis isolated from raw milk ,pasteurized milk and yoghurt. Letters in Applied Microbiology, 48(3):318-23.

[16] Hosseini, H., Hippe, B., Denner, E., Kollegger, E., and Haslberger, A. (2012). Isolation, identification and monitoring of contaminant bacteria in Iranian Kefir type drink by 16S rDNA sequencing. Food Control, 25(2):784-8.

[17] Bergey, D. H. (2001). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Firmicutes: Springer; 55-67 p.

[18] Wang, J., Chen, X., Liu, W., Yang, M., and Zhang, H. (2008). Identification of Lactobacillus from koumiss by conventional and molecular methods. European Food Research and Technology, 227(5):1555-61.

[19] Chen, X., Du, X., Wang, W., Zhang, J., Sun, Z., and Liu, W. (2010). Isolation and identification of cultivable lactic acid bacteria in traditional fermented milk of Tibet in China. International Journal of Dairy Technology, 63(3):437-44.

[20] Morin, R. D., Bainbridge, M., Fejes, A., Hirst, M., Krzywinski, M., and Pugh, T. J.

(2008). Profiling the HeLa S3 transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. Biotechniques, 45(1):81-8.

[21] Kim, O. S., Cho, Y. J., Lee, K., Yoon, S. H., Kim, M., and Na, H. (2012). Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 62(3):716-21.

[22] Labuschagne, M., and Albertyn, J. (2007). Cloning of an epoxide hydrolaseencoding gene from Rhodotorula mucilaginosa and functional expression in Yarrowia lipolytica. Yeast, 24:69-78.

[23] Fell, J. W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., and Statzell-Tallman, A. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 50(3):1351-71.

[24] Chory, J., and Pollard, J. (1999). Resolution and recovery of small DNA fragments. Current Protocols in Molecular Biology, 2:1-7.

[25] Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C., and Andersen, B. (2010). Food and indoor fungi: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre Utrecht; 21-28 p.

[26] Chanchaichaovivat, A., Ruenwongsa, P., and Panijpan, B. (2007). Screening and identification of yeast strains from fruits and vegetables: Potential for biological control of postharvest chilli anthracnose (Colletotrichum capsici). Biological Control, 42(3):326-35.

[27] Todar, K. (2008). Science Magazine. http://textbookofbacteriologynet/lacticshtml, 304:1421-6.

[28] Ogier, J. C., So,n O., Gruss, A., Tailliez, P., and Delacroix-Buchet, A. (2002). Identification of the bacterial microflora in dairy products by temporal temperature gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology, 68(8):3691-701.

[29] García-Cayuela, T., Tabasco, R., Peláez, C., and Requena, T. (2009). Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. International Dairy Journal, 19(6):405-9.

[30] Caridi, A. (2003). Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology, 56(2):105-10.

[31] Chou, Y. E., Edwards, C., Luedecke, L., Bates, M., and Clark, S. (2003). Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in Cheddar cheese. Journal of Dairy Science, 86(8):2516-24.

[32] Moreira, S. R., Schwan, R. F., Carvalho, E. P., and Wheals, A. E. (2001). Isolation and identification of yeasts and filamentous fungi from yoghurts in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 32(2):117-22.

[33] Dat, N. M., Hamanaka, D., Tanaka, F., and Uchino, T. (2012). Control of milk pH reduces biofilm formation of Bacillus licheniformis and Lactobacillus paracasei on stainless steel. Food Control, 23(1):215-20.

[34] Mathara, J. M., Schillinger, U., Kutima, P. M., Mbugua, S. K., and Holzapfel, W. H. (2004). Isolation, identification and characterisation of the dominant microorganisms of kule naoto: the Maasai traditional fermented milk in Kenya. International Journal of Food Microbiology, 94(3):269-78.

[35] Isono, Y., Shingu, I., and Shimizu, S. (1994). Identification and characteristics of lactic acid bacteria isolated from Masai fermented milk in Northern Tanzania. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(4):660-4.

[36] MacFaddin, J. F. (1976). Biochemical tests for identification of medical bacteria: Williams & Wilkins Baltimore; 27-36 p.

[37] Heyndrickx, M. (2011). The Importance of Endospore-Forming Bacteria Originating from Soil for Contamination of Industrial Food Processing. Applied and Environmental Soil Science, 11:31-39.

[38] Phillips, J., and Griffiths, M. (1986). Factors contributing to the seasonal variation of Bacillus spp. in pasteurized dairy

products. Journal of Applied Microbiology, 61(4):275-85.

[39] Vyletělová, M., Švec, P., Páčová, Z., Sedláček, I., and Roubal, P. (2002). Occurence of Bacillus cereus and Bacillus licheniformis strains in the course of UHT milk production. Czech Journal of Animal Science, 47(5):200-5.

[40] Shah, S. H. (2009). Fate and detection of Bacillus anthracis spores in pasteurized milk, juice and eggs. http://udiniproquestcom/view/fate-and-detection-of-bacillus-pqid:1974181881/. 12:68-76.

[41] Rueckert, A., Ronimus, R. S., and Morgan, H. W. (2005). Development of a rapid detection and enumeration method for thermophilic bacilli in milk powders. Journal of Microbiological Methods, 60(2):155-67.

[42] De Jonghe, V., Coorevits, A., De Block, J., Van Coillie, E., Grijspeerdt, K., and Herman, L. (2010). Toxinogenic and spoilage potential of aerobic spore-formers isolated from raw milk. International Journal of Food Microbiology, 136(3):318-25.

[43] Salkinoja-Salonen, M., Vuorio, R., Andersson, M., Kämpfer, P., Andersson, M., and Honkanen-Buzalski, T. (1999). Toxigenic strains of Bacillus licheniformis related to food poisoning. Applied and Environmental Microbiology, 65(10):4637-45.

[44] Tatzel, R., Ludwig, W., Schleifer, K. H., and Wallnöfer, P. R. (1994). Identification of Bacillus strains isolated from milk and cream with classical and nucleic acid hybridization methods. Journal of Dairy Research, 61(4):529-35.

[45] Burgess, S. A., Lindsay, D., and Flint, S. H. (2010). Thermophilic bacilli and their importance in dairy processing. International Journal of Food Microbiology, 144(2):215-25.

[46] Kalogridou-Vassiliadou, D. (1992). Biochemical Activities of Bacillus Species Isolated from Flat Sour Evaporated Milk. Journal of Dairy Science, 75(10):2681-6.

[47] Van Heddeghem, A., and Vlaemynck, G. (1992). Sources of contamination of milk with Bacillus cereus on the farm and in the factory. Bulletin International Dairy Federation, 19–24.

[48] Sutherland, A., and Murdoch, R. (1994). Seasonal occurrence of psychrotrophic Bacillus species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic Bacillus sp. International Journal of Food Microbiology, 21(4):279-92.

[49] Drysdale, G., and Fleet, G. (1989). The growth and survival of acetic acid bacteria in wines at different concentrations of oxygen. American Journal of Enology and Viticulture, 40(2):99-105.

[50] Bartowsky, E. J., and Henschke, P. A. (2008). Acetic acid bacteria spoilage of bottled red wine-a review. International Journal of Food Microbiology, 125(1):60-70.

[51] Magalhães, K. T., Pereira, G. V. M., Campos, C. R., Dragone, G., and Schwan, R. F. (2011). Brazilian kefir: structure, microbial communities and chemical composition. Brazilian Journal of Microbiology, 42(2):693-702.

[52] Yang, X. J., Fan, M. T., Shi, J. L., and Dang, B. (2007). Isolation and identification of preponderant flora in tibetan fermented linggu milk. China Brewing, 6:10-6.

[53] Ishida, T., Yokota, A., Umezawa, Y., Toda, T., and Yamada, K. (2005). Identification and characterization of lactococcal and Acetobacter strains isolated from traditional Caucasusian fermented milk. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 51(3):187-93.

[54] Sulieman, A., Dirar, H., and Hyndriykx, M. (2004). Isolation and characterization of microorganisms associated with the Sudanese fermented sour milk (Robe). Gezira Journal of Agricultural Science, 13:2-8.

[55] Ongol, M. P., and Asano, K. (2009). Main microorganisms involved in the fermentation of Ugandan ghee. International Journal of Food Microbiology, 133(3):286-91.

[56] Chen, L., Ma, Y., Maubois, J., Chen, L., Liu, Q., and Guo, J. (2010). Identifcation of yeasts from raw milk and selection for some specific antioxidant properties. International Journal of Dairy Technology, 63(1):47-54.

[57] Álvarez-Martín, P., Flórez, A. B., López-Díaz, T. M., and Mayo, B. (2007).

Phenotypic and molecular identification of yeast species associated with Spanish blue-veined Cabrales cheese. International Dairy Journal, 17(8):961-7.

[58] Callon, C., Delbès, C., Duthoit, F., and Montel, M. C. (2006). Application of SSCP–PCR fingerprinting to profile the yeast community in raw milk Salers cheeses. Systematic and Applied Microbiology, 29(2):172-80.

[59] Callon, C., Duthoit, F., Delbès, C., Ferrand, M., Le Frileux, Y., and De Crémoux, R. (2007). Stability of microbial communities in goat milk during a lactation year: molecular approaches. Systematic and Applied Microbiology, 30(7):547-60.

[60] Latorre-García, L., del Castillo-Agudo, L., and Polaina, J. (2007). Taxonomical classification of yeasts isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 23(6):785-91.

[61] Wang, S. Y., Chen, H. C., Liu, J. R., Lin, Y. C., and Chen, M. J. (2008). Identification of yeasts and evaluation of their distribution in Taiwanese Kefir and Viili starters. Journal of Dairy Science, 91(10):3798-805.

[62] Mu, Z., Yang, X., and Yuan, H. (2012). Detection and identification of wild yeast in Koumiss. Food Microbiology, 31(2):301-8.

[63] Jakobsen, M., and Narvhus, J. (1996). Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. International Dairy Journal, 6(8):755-68.

[64] Fleet, G. H. (1990). Food spoilage yeasts. In: Spencer, J.F.T., Spencer, D.M. (Eds.), Yeast Technology. Springer, Berlin, 124-166 p.

[65] Davis, J. G., and Wilbey, R. A. (1990). Microbiology of cream and dairy desserts. In R. K .Robinson (Ed.), Dairy microbiology (pp. 41-108). London and New Jersey: Applied Science Publishers.

[66] Jodral, M., Liñan, E., Acosta, I., Gallego, C., Rojas, F., and Bentabol, A. (1993). Mycoflora and toxigenic Aspergillus flavus in Spanish milks. International Journal of Food Microbiology, 18(2):171-4.

[67] Davis, J. G. (1975). The microbiology of yogurt. In Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food ed. Carr, J.G., Cutting, C.V. & Whiting, G.C. pp. 245-266. London : Academic Press.

[68] Chapman, H. R., and Sharpe, M. E. (1990). Microbiology of cheese. In R. K. Robinson (Ed.), Dairy Microbiology (pp. 203-290). London and New Jersey: Applied Science Publishers.

Identification of microorganisms in industrial Iranian Doogh

Bagheripoor Fallah, N. [1], Mortazavian Farsani, S. A. M. [1*], Hosseini, H. [1], Shahraz, F. [1], Bahadori Monfared, A.[2]

1. Department of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences
2. Department of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences

(Received: 92/7/9 Accepted: 93/12/09)

Doogh is a traditional Iranian fermented milk drink, which is produced by lactic fermentation of pasteurized milk. In order to isolate and identify the microorganisms present in Iran industrial Doogh samples, polymerase chain reaction (PCR) was applied. Doogh samples were 17 name brands. After conducting the preliminary identification by microscopic observations and biochemical tests, in order to verify the obtained results the samples were pure-cultured which was followed by PCR and sequencing. According to the results obtained through sequencing of 16S rRNA, the identified bacteria belonged to lactic acid bacteria (*Lactobacillus brevis*, *L. fermentum*, *L. paracasei* and *L. gallinarum*); gram-posetive spore-forming bacteria (*Bacillus licheniformis*, *B. anthracis* and *B. subtilis*) and acetic acid bacteria (*Acetobacter tropicalis* and *A. indonesiensis*). Moreover, based on the results obtained by sequencing of D1/D2 26S rDNA the identified yeasts were including *Pichia fermentans*, *Saccaromyces unisporous* and *Cryptococcus magnus*. The obtaining of present study illustrated that in addition to identified non-starter lactic acid bacteria, other types of bacteria and yeasts were found in Iran industrial Doogh samples.

Keywords: Iran industrial Doogh, PCR, Non-starter lactic acid bacteria, Bacillus and Acetobacter bacteria, Yeasts

* Corresponding Author E-Mail Address: mortazvn@sbmu.ac.ir