

شناسایی مولکولی باکتری‌های با پتانسیل پروبیوتیکی جداسازی شده از محصولات

لبنی سنتی آذربایجان بر اساس ژن 16S rDNA

محمدامین حجازی*، پریا مختاری زنوزی، محمود خسروشاهلی، ابوالفضل برزگری، حاجیه لطفی،
صولت اسلامی و سیامک علیزاده**

* نگارنده مسئول، نشانی: تبریز، بلوار ۲۹ بهمن، پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، تلفن: ۰۴۱۱۳۳۲۲۶۲۵، پیام نگار: aminhejazi@abrii.ac.ir
** به ترتیب استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور؛ دانشجوی گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ استاد گروه بیوتکنولوژی و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات؛ و کارشناسان پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور، تبریز
تاریخ دریافت: ۹۰/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۶

چکیده

هدف از این تحقیق شناسایی دقیق ۲۲ ایزوله لاکتوباسیلوس جدا شده از محصولات لبنی سنتی منطقه آذربایجان است. بدین منظور، ژن 16S rRNA با جفت آغازگرهای عمومی طی واکنش زنجیره پلی‌مرز (PCR) تکثیر شد. قطعه‌ای به طول ۱۵۰۰ جفت باز مشابه با اندازه مورد انتظار تکثیر شد. استفاده از ۵ آنزیم برشی *MspI*, *TaqI*, *BsuRI*, *Bsp143I* و *HindIII* و مقایسه الگوی برشی حاصل از نرم‌افزار GeneDoc، تنوع گونه‌ای در بین باکتری‌ها را نشان داد. بر اساس الگوهای برشی، ایزوله‌ها به گونه‌های لاکتوباسیلوس *برویس*، لاکتوباسیلوس *پلاتناروم*، لاکتوباسیلوس *کازئی*، لاکتوباسیلوس *آزیلیس*، لاکتوباسیلوس *دلبروکی* و لاکتوباسیلوس *ساک* شباهت نشان دادند. از بین ایزوله‌ها، ۸ ایزوله جهت همسانه‌سازی انتخاب و برای توالی‌یابی ارسال شد. در مجموع، ۵ ایزوله به عنوان *پلاتناروم*، ۲ ایزوله به عنوان *برویس* و یک ایزوله به عنوان *Lactobacillus sp* شناخته شدند.

واژه‌های کلیدی

باکتری‌های پروبیوتیک، لاکتوباسیلوس، 16s rRNA

مقدمه

آنتی‌بیوتیک‌ها، کاهش تحمل‌ناپذیری در برابر لاکتوز، درمان اسهال روتارو ویروسی، درمان حساسیت (آلرژی)، پیشگیری از سرطان، درمان زخم معده و درمان التهاب روده (Goktepe et al., 2006).

اولین قدم در معرفی سویه‌های پروبیوتیک، جداسازی و انتخاب سویه‌های مناسب از جمعیت میکروبی متنوع است که با جستجو در مجموعه بانک‌های سلولی، محصولات لبنی سنتی، یا انسان و حیوانات سالم انجام می‌گیرد. جداسازی سویه‌ها با کشت آن‌ها در

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که با قرار گرفتن در محیط روده می‌توانند تعادل میکروبی را در جهت افزایش سودمندی آن‌ها اصلاح کنند و با فعالیت خود مانع از فعالیت میکروارگانیسم‌های غیرمفید و بیماری‌زا شوند (Klaenhammer, 2000). از تاثیرات مفید مصرف پروبیوتیک‌ها می‌توان به این موارد اشاره کرد: بالا بردن توان سیستم ایمنی افراد مسن، پیشگیری از عفونت‌های زمستانی، پیشگیری از اسهال ناشی از مصرف

مشتمل شده است. همچنین طبق تعریف دیگری این روش به عنوان اجرای روش RFLP بر اساس ژنهای ریوزومی معرفی شده است (Jansson, et al., 2009). تحقیقات متعددی در زمینه شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها با تکنیک ARDRA اجرا شده است. گیرافا و همکاران (Giraffa, et al., 1998) برای شناسایی زیرگونه‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی^۳ از تکثیر و آنالیز برش آنزیمی ژن 16s rRNA و ARDRA استفاده کردند. این محققان با این روش توانستند با سرعت و دقت بالایی سویه‌های جداسازی شده از محصولات لبنی را شناسایی کنند. به این ترتیب که الگوی بانندی ایجاد شده با آنزیم‌های برشی علاوه بر نشان دادن اختلاف سه زیرگونه دلبروکی، لاکتیس و بولگاریکوس، توانست اختلافات لاکتوباسیلوس هلوتیکوس^۴ و لاکتوباسیلوس دلبروکی را نیز نشان دهد (Giraffa et al., 1996). دلفدریکو و همکاران (Delfederico, et al., 2005) در آرژانتین از نوشیدنی کفیر ۱۷ لاکتوباسیلوس را جداسازی کردند. در این تحقیق روش ARDRA با به کارگیری آنزیم‌های برشی *Hindf I*, *Dde I* و *HaeIII* برای بررسی تنوع ژن 16s rRNA اجرا شد. آنالیزها نشان داد که لاکتوباسیلوس‌های ناجور تخمیر جداسازی شده، الگوهای برشی مشابهی با لاکتوباسیلوس کفیر زیرگونه JCM و زیرگونه ATCC داشتند (Delfederico et al., 2005). همچنین زونگ و همکاران (Zhong et al., 1998) با استفاده از دو آنزیم برشی *BclII* و *DraI* موفق به جداسازی ۶۴ سویه لاکتوباسیلوس شدند. این روش تشخیص بین سویه‌های اسیدوفیلوس را امکان‌پذیر ساخت.

محصولات لبنی سنتی ایران نیز منبع مهمی برای جداسازی و شناسایی باکتری‌های لاکتوباسیلوس محسوب می‌شوند. ابراهیمی و همکاران (Ebrahimi et al., 2011) از محصولات لبنی مانند ماست و پنیر موفق به جداسازی و

شرایط آزمایشگاهی آغاز و پس از آن بهترین سویه‌های پروبیوتیکی با روش‌های ساده درون شیشه‌ای با ایجاد شرایطی همانند شرایط دستگاه گوارشی و اپی‌تلیوم روده‌ای شناسایی می‌شود. محصولات لبنی سنتی یکی از منابع اصلی پروبیوتیک‌ها شناخته شده‌اند که در بین باکتری‌های اسید لاکتیک موجود در محصولات لبنی جنس لاکتوباسیلوس بیشتر مورد توجه است (Fooks et al., 1999).

اساس بیشتر روش‌های شناسایی بیوشیمیایی باکتری‌های اسید لاکتیک شامل: تشخیص مورفولوژی سلولی، تجزیه تولیدات تخمیری، فعالیت آنزیمی مجتمع، توانایی استفاده از سوبستراهای مختلف کربوهیدرات است. اما به کارگیری این روش‌ها در طبقه‌بندی و شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک، با توجه به تکرارپذیر نبودن شرایط کشت مرتبط با آزمایشگاه‌های مختلف و تنوع رگه و بیوتیپ‌های مقایسه شده با گونه‌های مشخص، روشی کامل و جامع نیست (Tannock, 1999). از این رو شناسایی دقیق‌تر سویه‌های باکتری با روش‌های مولکولی اهمیت فراوان دارد، زیرا این روش‌ها بر مبنای آنالیز اسیدهای نوکلئیک اجرا می‌شوند که قابل تکرار در آزمایشگاه‌های دیگر نیز هستند. همچنین با پیشرفت‌های مولکولی، ایجاد تغییرات اساسی در طبقه‌بندی باکتری‌ها نیز امکان‌پذیر شده است. اساس این تغییرات با بررسی یک توالی خاص از ژنوم موجودات با عنوان بارکدینگ DNA قابل توجه است. در بیشتر تحقیقات مولکولی روی پروکاریوت‌ها، از توالی ژن 16s rRNA^۱ استفاده شده است زیرا این ژن به عنوان یک زمان‌سنج دقیق علمی در طول تکامل مورد استفاده محققان بوده است. یکی از روش‌هایی که می‌تواند تنوع موجود در ژن 16s rRNA را تشخیص دهد و با آنزیم‌های برشی انجام می‌شود، روش PCR-ARDRA^۲ نامیده می‌شود که از ریوتایپینگ

1- 16s ribosomal RNA

3- *Lactobacillus delbrueckii*5- *L. casei*

2- Amplified ribosomal DNA and restriction analysis

4- *L. helveticus*

کشور اجرا شده بود. پتانسیل پروبیوتیکی جدایه‌ها نیز توسط تست‌های مقاومت به اسید و نمک‌های صفراوی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته بود (Alizadeh, 2008; Eslami, 2007).

کشت باکتری‌ها جهت استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های لاکتوباسیلوس موجود در بانک میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور ابتدا در محیط کشت MRS مایع به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند تا رسوب لازم برای استخراج DNA آماده شود. DNA ژنومی باکتری‌ها، طبق روش پیشنهادی کاردینال و همکاران (Cardinal et al., 1997) استخراج شد؛ با این تغییر که برای شکستن دیواره سلولی باکتری از انجماد و ذوب مکرر استفاده گردید. ترکیبات لیز بافر شامل تریس ۱ مولار با pH برابر با ۷/۵، کلرید سدیم ۵ مولار، EDTA ۰/۵ مولار، SDS ۲ درصد و آب مقطر بود. برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد برای الکتروفورز استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی ژن 16S rRNA

ژن 16S rRNA، با استفاده از دو پرایمر HalR (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') و HalF (3'TACCTTGTTAGGACTTCACC 5') تکثیر شد (Drake et al., 1996). شرایط اعمال شده در این واکنش مشتمل بود بر: چرخه‌های واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، چرخه با مرحله واسرشته‌سازی در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۷ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، بسط در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و سرانجام یک چرخه بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز

شناسایی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی^۱ و لاکتوباسیلوس برویس^۲ شدند که کاندیداهای خوبی برای پروبیوتیک بودن هستند. لطفی و همکاران (Lotfi et al., 2010) به بررسی ۱۶ جدایه لاکتوباسیلوس از محصولات لبنی سنتی مناطق هریس و سراب پرداختند. تنوع موجود در بین لاکتوباسیلوس‌های ایزوله شده بر اساس توالی‌یابی ژن 16S rRNA و مارکر RAPD بررسی شد که تعلق سویه‌های لاکتوباسیلوس را به گونه‌های پلانتاروم، دلبروکی، کازئی، سالیواریوس^۳ و برویس نشان داد. قطبی و همکاران (Ghotbi et al., 2010) بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی موفق به شناسایی لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس پاراکازئی، لاکتوباسیلوس پنتوسوس^۴ از پنیر لیقوان شدند. با توجه به مطالب ذکر شده، می‌توان به این نتیجه رسید که محصولات لبنی سنتی مناطق مختلف ایران به خصوص آذربایجان منبع مهمی برای باکتری‌های لاکتوباسیلوس به عنوان باکتری‌های پروبیوتیک هستند. هدف از این تحقیق، شناسایی دقیق لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از محصولات لبنی سنتی بر اساس روش‌های مولکولی (روش ARDRA و توالی‌یابی ژن 16S rRNA) است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق روی نمونه‌های ماست، پنیر، کشک سنتی جمع‌آوری شده از نقاط مختلف شهرستان‌های کلپیر، ماکو و اهر اجرا شد. شناسایی اولیه جدایه‌ها در سطح جنس بر اساس ویژگی‌های مورفولوژی سلولی و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی مانند تست کاتالاز، رنگ‌آمیزی گرم، الگوی تخمیر قندی، رشد در دما و pH‌های متفاوت در پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب

1- *L. casei*
3- *L. salivarius*

2- *L. brevis*
4- *L. pentosus*

کلونینگ ژن 16S rRNA و توالی‌یابی آن

جهت توالی‌یابی دقیق و بررسی نوکلئوتیدهای جهش یافته، ژن موردنظر برای توالی‌یابی ارسال گردید. بدین‌منظور محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی با روش T/A کلونینگ به وکتور pGEM-T (شرکت پرومگا) الحاق شد. سپس وکتور نوترکیب به درون باکتری *Escherichia coli* DH5 α جهت تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب انتقال یافت. بر اساس روش غربالگری آبی/ سفید، باکتری‌های دریافت‌کننده وکتور نوترکیب از طریق کشت سطحی روی محیط LB Agar محتوی آمپی‌سیلین و آغشته به X-Gal و IPTG، غربال شدند (Malik et al., 2003). پس از استخراج پلاسمید نوترکیب و تایید ورود قطعه موردنظر به درون آن، پلاسمید نوترکیب به شرکت MWG آلمان جهت توالی‌یابی ارسال و پس از آن توالی موردنظر با استفاده از نرم‌افزار Chromas و BLAST آنالیز شد.

نتایج و بحث

این تحقیق روی ۲۲ ایزوله موجود در کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور اجرا شد. این ایزوله‌ها قبلاً با روش‌های بیوشیمیایی شناسایی شده بودند. اسامی ایزوله‌های مورد بررسی در جدول ۱ آورده شده است.

با ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس ساخت شرکت سیناژن، ده میکرولیتر آب دیونیزه، ۰/۴ میکرومولار از پرایمرهای مستقیم و معکوس، ۵۰ نانوگرم DNA انجام شد.

برش آنزیمی DNA ریبوزومی تکثیر شده با PCR (ARDRA)

پس از تکثیر قطعه ژن 16S rRNA با پرایمرهای عمومی، الگوهای برشی حاصل از آنزیم‌های برشی گونه‌های شناسایی شده در تست‌های بیوشیمیایی با گونه‌های موجود در سایت بانک ژنی (NCBI) مقایسه شدند. در این تحقیق از پنج آنزیم برشی *Bsp143I*، *HindIII*، *TaqI*، *BsuRI* و *MspI* استفاده شد.

برای هر محصول PCR، واکنش‌های هضم به‌طور جداگانه با آنزیم‌های مذکور انجام گردید. واکنش‌های هضم آنزیمی به مدت ۱۲ ساعت طبق دمای فعالیت آنزیم در بن‌ماری انجام شد. در پایان، محصولات هضم آنزیمی با استفاده از ژل آگارز ۲/۵ درصد الکتروفورز و نوارهای حاصل از برش در زیر نور UV مشاهده و از آن‌ها و عکس‌برداری شد. بعد از عکس‌برداری، الگوی نواری به‌دست آمده با الگوی نواری تهیه شده با نرم‌افزار Genedoc (version 2.7.0.0) از توالی‌های 16S rRNA گونه‌های لاکتوباسیلوس ثبت شده در NCBI، مقایسه شدند (Arenas et al., 2009).

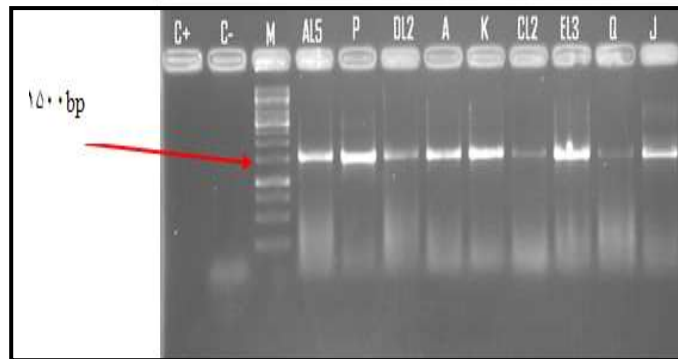
جدول ۱- اسامی ایزوله‌های مورد بررسی

ایزوله	منطقه جداسازی شده	شناسایی بیوشیمیایی در حد گونه
AL1	ماکو	کازئی - پلانتاروم
BL3	اهر	پلانتاروم - آژیلیس
BL4	اهر	پلانتاروم - آژیلیس
DL3	اهر	پلانتاروم
I	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
BL8	اهر	آژیلیس - پلانتاروم - فرمنتوم
EL3	اهر	ساک
C	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
AL5	ماکو	پلانتاروم-دلبروکی
DL2	اهر	پلانتاروم
DL4	اهر	پلانتاروم
P	کلیبر	دلبروکی
EL2	اهر	ساک
A	کلیبر	دلبروکی - برویس
AL4	ماکو	آژیلیس - پلانتاروم
AL7	ماکو	فرمنتوم - آژیلیس - پلانتاروم
K	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
CL2	اهر	آژیلیس - پلانتاروم
J	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
H	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
O	کلیبر	روتتری - برویس - فرمنتوم
AL2	ماکو	پلانتاروم - آژیلیس - دلبروکی

استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرازی

نتایج الکتروفورز DNA استخراج شده از لاکتوباسیلوس‌ها روی ژل ۱ درصد آگارز، وجود کیفیت خوب DNAها را جهت استفاده در واکنش زنجیره‌ای

پلی‌مرازی (PCR) تایید کرد. پس از PCR جهت تکثیر ژن 16S rRNA، محصولات PCR روی ژل الکتروفورز آشکارسازی شد. نتایج حاصل از PCR در شکل ۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱- نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) مربوط به تکثیر قطعه ۱۵۰۰ جفت نوکلئوتید ژن 16S rRNA با آغازگر Hal 6R و 6F. C+: کنترل مثبت (واکنش بدون پرایمر)، C-: کنترل منفی (واکنش بدون DNA) سایز مارکر: 1Kb DNA Ladder. (M).

و AL2 مشابه گونه پلانتاروم، ایزوله AL1 مشابه الگوی برشی کازئی و پلانتاروم، ایزوله EL2 و EL3 مشابه الگوی برشی ساکی و ایزوله P مشابه الگوی برشی دلبروکی بودند که این مقایسه شباهت تست‌های بیوشیمیایی اجرا شده را با برش‌های حاصل نشان می‌دهد. بر اساس تست‌های بیوشیمیایی ایزوله‌های AL4, CL2, BL3, BL8 و BL4 به گونه‌های آژیلیس و پلانتاروم شباهت بیشتری نشان می‌دهد (Alizadeh, 2008; Eslami, 2007).

با توجه به این که آنزیم *BsuRI* قادر به تفکیک این دو گونه نبود، برای تشخیص آن‌ها از دو آنزیم دیگر *Bsp143I* و *MspI* استفاده شد. در برش‌های حاصل از این دو آنزیم، سویه‌های AL4, CL2, BL3, BL8 و BL4 مشابه الگوی برشی پلانتاروم بودند. همچنین در مورد ایزوله‌هایی که با تست‌های بیوشیمیایی به عنوان گونه‌های رئوتری، برویس و فرمنتوم شناخته شده بودند، دو آنزیم *MspI* و *Bsp143I* قادر به تفکیک این سه گونه از هم بود به طوری که ایزوله‌های H, Q, C, J, I و K مشابه الگوی برشی برویس بودند. اما با استفاده از آنزیم *BsuRI*، الگوی برشی رئوتری و برویس مشابه هم بودند.

بر اساس تست‌های بیوشیمیایی، دو ایزوله AL7 و BL8 مشابه سه گونه پلانتاروم، آژیلیس و فرمنتوم

به طوری که در شکل ۱ مشهود است، در مقایسه با اندازه قطعات مختلف لدر یک کیلوبازی، اندازه قطعه تکثیر شده در حدود ۱۵۰۰ جفت باز است. بررسی ساختار ژن 16S rRNA نشان می‌دهد که این ژن حاوی ۱۵۰۰ نوکلئوتید است و در چند نسخه در ژنوم کل باکتری وجود دارد. این ژن به عنوان یک نشانگر عمومی دارای توالی حفاظت شده و از نظر عملکرد پایداری بالایی دارد (Durm et al., 2001).

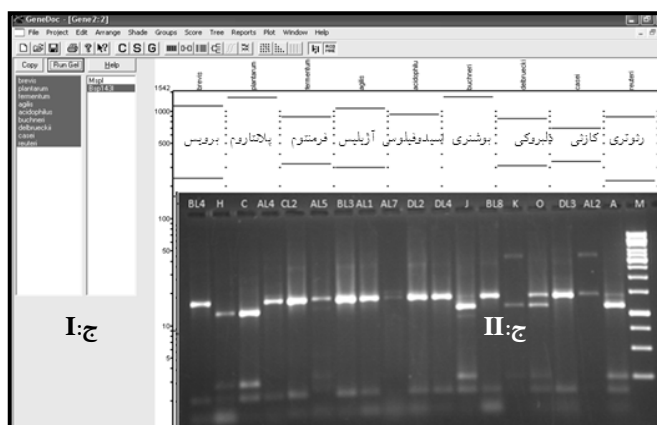
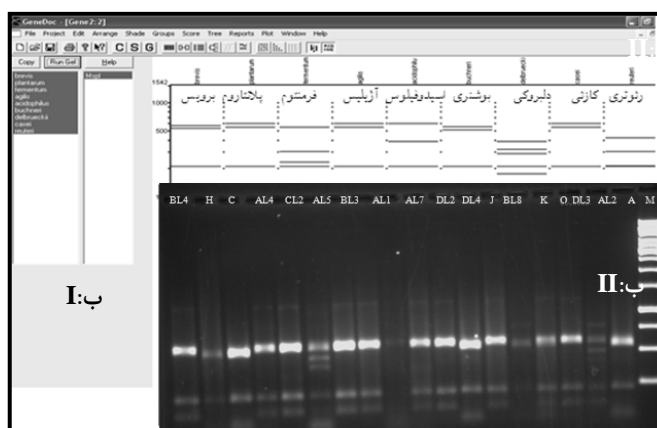
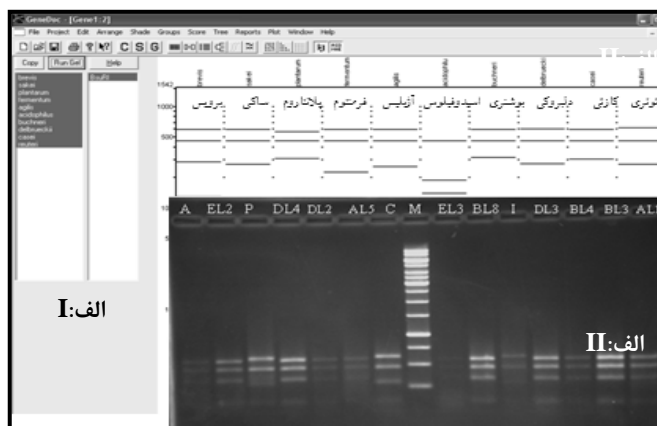
برش آنزیمی ژن 16S rRNA تکثیر شده با PCR (ARDRA)

جهت بررسی بیشتر و دقیق‌تر تنوع ژن 16S rRNA موجود در بین ایزوله‌های مختلف لاکتوباسیلوس، از روش برش آنزیمی بر مبنای ژن 16S rRNA استفاده شد. مقایسه بیوانفورماتیکی برش‌های حاصل با الگوهای برشی توالی‌های 16S rRNA گونه‌های لاکتوباسیل ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) با استفاده از برنامه Gene Doc از نظر بیوانفورماتیک مقایسه شدند؛ الگوی برشی حاصل با آنزیم‌های برشی مختلف در شکل ۲ به طور جداگانه آورده شده است.

با توجه به الگوی برشی حاصل از تمام آنزیم‌های مورد استفاده، الگوی برشی ایزوله‌های DL3, AL5, DL2, DL4

شناسایی مولکولی باکتری‌های با پتانسیل...

تشخیص داده شدند که جهت بررسی تفاوت این پلانتاروم دارند. یادآوری می‌شود که دو آنزیم سه گونه از آنزیم‌های برشی *MspI* و *Bsp143I* استفاده شد. اما نتایج نشان داد که این دو ایزوله الگویی مشابه با *HindIII* و *TaqI* قادر به تفکیک و ایجاد تنوع در ژن 16S rRNA نشدند.



شکل ۲- برش محصولات PCR الف: با آنزیم *BsuRI* ب: با آنزیم *MspI* و ج: با آنزیم *Bsp143I* و مقایسه بیوانفورماتیکی با الگوهای برشی توالی‌های 16S rRNA گونه‌های لاکتوباسیلوس ثبت شده در بانک ژنی
I: الگوی برشی حاصل از ایزوله‌ها روی ژل آگارز II: الگوی برشی حاصل با برنامه GeneDoc.

همسانه‌سازی ژن 16S rRNA و توالی‌یابی آن

قطعه تکثیر یافته هشت ایزوله در مرحله PCR (۱۵۰۰ جفت باز) درون ناقل pGEM با روش T/A Cloning همسانه شدند. همسانه‌های سفید با روش غربالگری آبی- سفید انتخاب و بعد از استخراج این قطعات از پلاسمید برای توالی‌یابی ارسال شدند. در جدول ۲ نتایج نمونه‌های توالی‌یابی شده با نتایج بیوشیمیایی و نتایج شناسایی بر اساس الگوی برش آنزیمی مقایسه شدند.

بررسی نهایی نشان می‌دهد که ایزوله‌هایی که برای توالی‌یابی ارسال شده بودند، یا شباهت به نتایج تست‌های بیوشیمیایی داشتند یا با آن‌ها متفاوت بودند. تفاوت بین نتایج شناسایی بیوشیمیایی و مولکولی، دو دلیل دارد: اول وجود جهش در توالی، که حتی به اندازه یک نوکلئوتید الگوی برشی متفاوتی را ایجاد خواهد کرد و این مورد در ایزوله J تایید شد. دوم ضعف تست‌های بیوشیمیایی در شناسایی دقیق و مورد اطمینان که این دلیل نیز در مورد ایزوله‌های A و AL1 صادق بود.

جدول ۲- بررسی نهایی ایزوله‌ها و مقایسه نتایج روش‌های شناسایی بیوشیمیایی و برش آنزیمی و شناسایی مولکولی

نمونه	شناسایی بیوشیمیایی	شناسایی بر اساس ARDRA	شناسایی بر اساس توالی‌یابی (Accession number)	درصد شباهت با ایزوله-های ثبت شده در NCBA
H	برویس- روتری- فرمنتوم	برویس	برویس HM8547	۹۹ درصد
o	برویس- روتری- فرمنتوم	برویس	برویس JN368472	۹۹ درصد
DL3	پلانتاروم	پلانتاروم	پلانتاروم HQ406829	۹۹ درصد
CL2	پلانتاروم- آژیلیس	پلانتاروم	پلانتاروم HQ610929.1	۹۹ درصد
J	برویس- روتری- فرمنتوم	متفاوت از بقیه سوبه‌ها	HQ406830 L. sp	۹۷ درصد
A	دلبروکی- برویس	پلانتاروم- متفاوت از دلبروکی	پلانتاروم JN368470	۹۹ درصد
AL1	کازئی- دلبروکی	کازئی- پلانتاروم	پلانتاروم	۱۰۰ درصد
BL3	پلانتاروم- آژیلیس	پلانتاروم- آژیلیس	پلانتاروم JN368469	۹۹ درصد

وجود این‌که الگوی تخمیر قندی یکسانی داشتند (Johansson et al., 1995). ونتورا و همکاران (Ventura et al., 2000) این روش را بعد از تکثیر ژن 16S rRNA با سه آنزیم برشی گونه‌های پاراکازئی، سالیاریوس، روتری، فرمنتوم استفاده کردند. آنزیم *HinfI* تمایز بین گونه‌های

ARDRA روشی سریع و ساده جهت بررسی تنوع بین گونه‌های لاکتوباسیلوس است. در تحقیقات جوهانسون، از آنزیم‌های برشی *EcoRI* و *HindIII* برای شناسایی اکثر سوبه‌های لاکتوباسیلوس پلانتاروم استفاده شده است که وجود لاکتوباسیلوس دلبروکی از پنیر کومت با استفاده از روش PCR-ARDRA تایید شد. برای شش سوبه از هلمونتیکوس هیچ برشی با *EcoRI* دیده نشد با

که آنزیم‌های *HindIII* و *TaqI* قادر به ایجاد تفکیک نشدند. از مزیت‌های روش ARDRA می‌توان به سرعت بالا، قابلیت تکرارپذیری، گروه‌بندی و تشخیص گونه‌های میکروبی از هر جمعیت اشاره کرد. بعد از تفکیک ایزوله‌ها با روش ARDRA، بر اساس نتایج حاصله هشت ایزوله از ۲۲ ایزوله توالی‌یابی شدند. در نهایت پنج گونه *Lactobacillus* پلانتاروم و دو گونه *Lactobacillus* برویس و یک گونه *Lactobacillus* sp از محصولات لبنی به طور دقیق با دو روش ARDRA و توالی‌یابی شناسایی شدند.

قدردانی

از پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی شمال غرب و غرب کشور به دلیل حمایت‌های مالی و علمی این پروژه سپاسگزاری می‌شود.

اسیدوفیلوس و گالیناروم و *DraI* تمایز بین گونه‌های کریسپاتوس و آمیلووروس را امکان پذیر ساخت.

نتیجه‌گیری

تشخیص گونه‌های میکروبی با روش‌های فنوتیپی پیچیده و زمان‌بر است. با پیشرفت روش‌های مولکولی، گونه‌های میکروبی با سرعت و دقت بالایی تشخیص داده می‌شوند. در این تحقیق به منظور شناسایی ایزوله‌های *Lactobacillus* و بررسی تنوع در ژن 16S rRNA، دو روش ARDRA و توالی‌یابی به کار گرفته شد. در روش ARDRA از آنزیم‌های *Bsp143I*، *TaqI*، *MspI*، *HindIII*، *BsuRI* استفاده شد. با الگوی به دست آمده از این آنزیم‌ها، تفکیک گونه‌های *Lactobacillus* پلانتاروم، برویس، دلبروکی، کازئی، روتری، فرمنتوم و ساکی تفکیک شدند. یادآوری می‌شود

مراجع

- Alizadeh, S. 2008. Isolation and biochemical identification of potentially probiotic bacteria from traditional dairy product of Maku and Ahar. M.Sc. Thesis. Azad University. Zanjan. Iran (in Farsi).
- Andrighetto, C., De Dea, P., Lombardi, A., Neviani, E., Rossetti, L. and Giraffa, G. 1998. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. Res. Microbiol. 149(9): 631-643.
- Arenas, N. E., Polanco, J. C., Coronado, S. M., Durango, C. J. and Góme, A. 2009. Design of a molecular method for subspecies specific identification of *Klebsiella pneumoniae* by using the 16S ribosomal subunit gene. Colombia Médica. 40(3): 307-315.
- Cardinal, M. J., Meghrou, J., Lacroix, C. and Simard, R. E. 1997. Isolation of lactococcus lactis strain producing inhibitory activity against listeria. Food Biotech. 11(2): 129-146.
- Delfederico, L., Hollmann, A., Martí nez1, M., Iglesias, N. G., De Antoni, G. and Semorile, L. 2005. Molecular identification and typing of lactobacilli isolated from kefir grains. J. Dairy Res. 73(1): 20-27.

- Drake, M., Small, C. L., Spence, K. D. and Swanson, B. G. 1996. Rapid detection and identification of *Lactobacillus* spp. in dairy products by using the polymerase chain reaction. *J. Food Protec.* 59(10): 1031-1036.
- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Holloran, S., Feeny, M., Flynn, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. and Collins, J. K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Clinical Nutri.* 73(2): 386-392.
- Ebrahimi, T. M., Ouwehand, A. C., Hejazi, M. A. and Jafari, P. 2011. Traditional Iranian dairy products: A source of potential probiotic lactobacilli. *African. J. Microbiol. Res.* 5(1): 20-27.
- Eslami, S. 2007. Investigation of potentially probiotic bacteria from traditional dairy product of Kaleybar. M. Sc. Thesis. Shahid Beheshti University. Tehran. Iran. (in Farsi)
- Fooks, L. J., Fuller, R. Gibson, G. R. 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int. Dairy. J.* 9(1): 53-61.
- Ghotbi, M., Soleymaniyan Zad, S. and Sheikh Zeinoddin, M. 2010. Identification of facultative Hetrofermentive in Lighvan cheese. *Iranian Food Sci. Tachnol.* 6(2): 145-148. (in Farsi)
- Giraffa, G., De Vecchi, P. and Rossetti, L. 1998. Note: Identification of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* and subspecies *lactis* dairy isolates by amplified rDNA restriction analysis. *J. Appl. Microbiol.* 85(5): 918-92.
- Goktepe, I. Vijay, K. J. and Ahmedna, M. 2006. *Probiotics in Food Safety and Human Health.* Taylor & Francis Group. LLC.
- Jansson, J., Willing, B., Lucio, M., Fekete, A., Dicksved, J., Halfvarson, J., Tysk, C. and Schmitt-Kopplin, P. 2009. Metabolomics reveals metabolic biomarkers of Crohn's disease. *J. Pone. PLoS One* 4(7), e6386. Doi: 10.1371.
- Klaenhammer T. R. 2000. Probiotic bacteria: Today and Tomorrow. *J. Nutr.* 130(2): 415-416.
- Lotfi, H., Hejazi, M. A., Maleki Zanjani, B. and Barzgari, A. 2010. Isolation and Molecular Identification of Potentially Probiotic Bactreia from Traditional Dairy Product of Heris and Sarab. *J. Food Sci. Tech. Res.* 20(1): 1-17. (in Farsi)
- Malik, A. Wenuganen, S. Suwanto, A. and Tjahjono, B. 2003. Cloning, DNA sequence, and expression of *Aeromonas caviae* WS7b Chitinase Gene. *J. Mol. Biotechnol.* 23(1): 1-10.
- Tannock, G. W. 1999. Identification of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* . *Current Issue Molec.* 1(1): 53-64.

- Ventura, M. Casas, I. A. Morelli, L. and Callegari, M. L. 2000. Rapid amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) identification of *Lactobacillus* spp. isolated from fecal and vaginal samples. Syst. Appl. Microbiol. 23(4): 504–509.
- Zhong, W., Millsap, K., Bialkowska-Hobrzanska, H. and Reid, G. 1998. Differentiation of *Lactobacillus* species by molecular typing. Appl. Environ. Microbiol. 64(7): 2418–2423.



Molecular Identification of Probiotic Bacteria in Traditional Dairy Products of Azerbaijan using 16S rDNA

M. A. Hejazi*, P. Mokhtari Zunuzi, M. Khosroshahli, A. Barzegari, H. Lotfi, S. Eslami and S. Alizadeh

* Corresponding Author: Assistant professor of Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), North-West and West region, Tabriz, Iran. E-Mail: aminhejazi@abri.ac.ir

Received: 26 July 2011, Accepted: 25 February 2012

This study utilized molecular methods to identify 22 isolates from traditional dairy products of Azerbaijan. PCR was carried out using the universal primers of 16S rDNA and a fragment of ~1500bp was amplified. Amplified ribosomal DNA restriction analysis was performed using *Bsu*RI, *Msp*I, *Hind*III, *Taq*I and *Bsp*143I. ARDRA results were compared to the restriction profile in enzymatic restriction and bioinformatics analyses (GeneDoc). The isolates were identified as *Lactobacillus brevis*, *plantarum*, *casei*, *agilis* and *saki*. To better characterize the isolates, fragments of eight isolates were amplified, cloned and sequenced. The results identified five isolates as *L. plantarum*, two isolates as *L. brevis* and one isolate as *Lactobacillus* sp.

Keywords: ARDRA, Probiotic bacteria, 16S rRNA