Original Article

مطالعه ژنوتیپی و فیلوژنتیکی لاکتوباسیل‌های تولید کننده باکتریوسین جداشده از محصولات لبنی محلی و غذای سنتی

فرزانه تفویضی[1*]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[2]، لیلا خجاره[2]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، واحد پرند، تهران، ایران.
۲- دانشگاه آزاد اسلامی، گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۱۰/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۱/۰۳/۱۸

چکیده

زمینه و هدف: باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، کروی یا میله‌ای شکل و کاتالاز منفی هستند که عموماً به عنوان ارگانیسم‌های ایمن در نظر گرفته می‌شوند Generally Recognized As Safe (GRAS). چندین هزار سال است که از این باکتری‌ها جهت تولید غذاهای تخمیر شده استفاده می‌شود چرا که دارای توانایی تولید تغییرات مطلوب در طعم و بافت غذا می‌باشند. مولکول‌های ضد میکروبی متفاوتی از جمله باکتریوسین‌های تولید شده توسط این باکتری‌ها، سبب ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های مسموم‌کننده مواد غذایی می‌شوند که به نوبه خود سبب افزایش ماندگاری و افزایش ایمنی محصولات غذایی می‌گردند. بنا به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در سلامت انسان، شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنتیکی این باکتری‌ها بر اساس توالی‌های 16S rRNA می‌تواند گامی مؤثر در شناسایی ذخیره لاکتوباسیل‌های بومی با خصوصیات عملکردی ویژه و به‌کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی باشد.

مواد و روش‌ها: در بین باکتری‌های جداشده پنج سویه با توانایی تولید باکتریوسین قوی‌تر نسبت به سایر نمونه‌ها جهت توالی‌یابی انتخاب شدند. استخراج DNA بر اساس هضم آنزیمی لیزوزیمی صورت گرفت. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای دجنریت انجام گرفت و محصولات PCR پس از خالص‌سازی، توالی سنجی شدند.

نتایج: ایزوله‌های شناسایی شده تحت عنوان *لاکتوباسیلوس کازئی* و *انتروکوکوس فاسیوم* در GenBank ثبت شدند.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج گروه‌بندی بر اساس مارکر 16S rRNA، نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالای ایزوله‌های بومی ایران و امکان به‌کارگیری در مصارف صنعتی جهت بهبود و افزایش ایمنی غذایی می‌باشد.

کلمات کلیدی: لاکتوباسیل، بررسی فیلوژنتیکی، 16S rRNA، باکتریوسین

مقدمه

واژه پروبیوتیک به معنای «برای زندگی» و برگرفته از زبان یونانی است. پروبیوتیک‌ها ارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که به عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و اثرات سودمندی در بدن به جای می‌گذارند که این امر به واسطه تنظیم و تعادل میکروب‌های ناحیه گوارشی (روده‌ای) صورت می‌گیرد. باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB)، در طبیعت پراکنده بوده و بالطبع در طیف وسیعی از غذاها نیز حضور دارند (۱ و ۲).

جنس‌های متعلق به باکتری‌های اسید لاکتیک شامل: *Lactococcus sp.*، *Lactobucillus sp.*، *Leuconostoc sp*، *Weissela sp*، *Pediococcus sp*، *Streptococcus sp*، *Enteroeoccus sp* می‌باشند. بسیاری از ویژگی‌های ارگانوپتیک غذاهای تخمیر شده مثل گوشت (۳) گیاهان (۴) و محصولات لبنی (۵) ناشی از عملکرد این باکتری‌ها می‌باشد.

استفاده از باکتری‌های اسید لاکتیک و متابولیت‌های آن‌ها در جهت بهبود ایمنی میکروبی و افزایش ماندگاری مواد غذایی، تحت عنوان نگه‌دارنده‌های زیستی معرفی می‌شوند (۶).

LAB معمولاً به عنوان ارگانیزم‌های "Food Grade" در نظر گرفته می‌شوند که با دارا بودن ویژگی‌های اختصاصی به عنوان کشت‌های محافظ کارایی دارند. بعضی از LAB دارای عملکردهای ضد میکروبی هستند که ناشی از فعالیت پپتیدهای کوچک و مقاوم به حرارت به نام باکتریوسین می‌باشد (۴ و ۷).

باکتریسیون‌ها، پپتیدها و یا پروتئین‌های مترشحه خارج سلولی با فعالیت باکتری‌کشی (Bactricidal) و یا Bacteriostatic (متوقف کننده رشد باکتری) می‌باشند. اگرچه ممکن است بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی قادر به تولید باکتریوسین باشند ولی در سال‌های اخیر

* **نویسنده مسئول: فرزانه تفویضی**، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران.
تلفن: ۰۲۱-۲۲۳۵۲۲۵۳ **Email: tafvizi@piau.ac.ir**

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

توجه ویژه بر روی شناسایی باکتری‌های اسید لاکتیک و باکتریوسیون‌های حاصله در صنایع غذایی در جهت بهره‌گیری از آن‌ها به عنوان نگه دارنده‌های مواد غذایی معطوف شده است.

باکتریوسین‌ها، از نظر تجزیه شدن در سیستم گوارشی با آنتی‌بیوتیک‌های درمانی، متفاوت می‌باشند. به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌های مسموم کننده غذایی، سوش‌های مولد باکتریوسین یا بخشی از باکتریوسین‌های خالص شده را می‌توان به غذاها اضافه کرد (۸).

اگر چه تأثیرات مفید باکتریسیون‌ها در غذاها، تحت تأثیر فاکتورهای متعدد قرار گرفته و کاهش می‌یابد (۳ و ۸)، حداقل غلظت مهاری (MIC) در بین باکتریوسین‌ها و سوش‌های حساس بسیار متفاوت و وابسته به سوش می‌باشد. از این رو جداسازی و شناسایی سوش‌های تولیدکننده باکتریسیون در جهت افزایش ایمنی صنایع غذایی امری مهم و ضروری تلقی می‌شود. در سال‌های اخیر، استفاده از توالی‌های rRNA جهت شناسایی و آنالیز فیلوژنتیکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است.

بررسی فیلوژنتیکی نشان داده است که باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) متعلق به باکتری‌های گرم مثبت با میزان G+C پایینی هستند. جنس‌های *لاکتوباسیلوس‌ها*، *لکونوستوک* و *پدیوکوکوس* به طور سنتی بر اساس خصوصیات فیزیولوژیکی و مورفولوژیکی قابل تمیز از یکدیگرند، اما از نظر فیزیوژنتیکی به صورت intermixed می‌باشند. شناسایی فنوتیپیکی مرسوم LAB، بسیار خسته کننده و وقت‌گیر است و همیشه قابل اعتماد نیست. علاوه بر این گونه‌های خاصی وجود دارند که قابل شناسایی بر اساس صفات فنوتیپیکی نیستند. پاسخ‌های فنوتیپیکی می‌تواند تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گیرد. جهت طراحی روش‌های شناسایی پایدارتر و قابل اعتمادتر، بایستی تست‌های ژنتیکی به کار رود. یک روش، به‌کارگیری نشانگرهای اسید نوکلئیک است (۹).

با پیشرفت روش‌های مولکولی، در طبقه‌بندی باکتری‌ها نیز تغییرات چشم‌گیری رخ داده است. انگیزه اصلی در ایجاد این تغییرات ناشی از ماهیت و ویژگی‌های rRNA به عنوان یک کرنومتر مولکولی است (۱۰). قسمت‌هایی از مولکول 16S rRNA در بین گونه‌های باکتریایی حفاظت شده است و می‌تواند جهت مقایسه و تطبیق ایزوله‌های مختلف به کار رود. تطبیق نواحی حفاظت شده، امکان مقایسه مابقی نواحی (v1 تا v9) را که در بین بسیاری از گونه‌ها متفاوت می‌باشد، فراهم می‌آورد (۱۳-۱۱) از نقطه نظر عملی به‌کارگیری نشانگرهای الیگونوکلئوتیدی ویژه توالی‌های ژن 16S rRNA (rDNA)، یکی از بهترین گزینه‌ها جهت شناسایی باکتری‌ها بر اساس خصوصیات فیلوژنتیکی است و به عنوان یک روش قابل اطمینان جهت شناسایی در بسیاری از گونه‌های باکتریایی توسط تکنیک‌هایی مبتنی بر روش PCR و یا نشانگرهای ویژه نوکلئوتیدی می‌تواند به کار گرفته شود (۱۴ و ۱۵).

بنا به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در سلامت انسان، شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها می‌تواند گامی مؤثر در معرفی لاکتوباسیل‌های بومی با خصوصیات عملکردی ویژه و به‌کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی و تولید محصولات فرا ویژه باشد.

در این تحقیق، شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های تولیدکننده باکتریوسین از غذای محلی ترخینه و محصولات لبنی سنتی صورت گرفته است و اولین گزارش، مبنی بر شناسایی مولکولی لاکتوباسیل‌های تولید کننده باکتریوسین از ترخینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها، محیط کشت و شرایط کشت: باکتری‌های C6I4، T3، T14، T16 و Y2B4 تولیدکننده باکتریوسین قوی‌تر نسبت به سایر نمونه‌های جداشده از منابع مختلف (ترخینه، ماست و پنیر)، پس از بررسی تست‌های بیوشیمیایی جهت تأیید و غربال نمودن لاکتوباسیل‌ها و تأیید ظرفیت پروبیوتیکی (۱۶)، جهت شناسایی توسط روش مولکولی در این تحقیق انتخاب شدند. باکتری‌های جدا شده، بر روی محیط کشت انتخابی MRS (Man ROGOSA and SHARP) کشت شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن گرم‌خانه گذاری شدند (۱۷).

استخراج DNA: استخراج DNA از ایزوله‌های مذکور با استفاده از هضم آنزیمی لیزوزیم و با اندکی تغییرات در روش Araújo مورد استفاده قرار گرفت (۱۸) از کشت ۲۴ ساعته جهت استخراج DNA استفاده شد. 2ml از محیط کشت ۲۴ ساعته باکتری‌ها به میکروتیوپ‌های ۲ میلی‌لیتری انتقال یافتند و در 3000rpm به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مایع رویی دور ریخته شد و رسوب‌ها ۳ بار با بافر (Tris Hcl 100Mm، NaCl 150mM، EDTA 100mM) TEN و هر بار در 3000rpm به مدت ۵ دقیقه شستشو داده شدند. به رسوب‌های حاصل، بافری متشکل از ۲۰۰ میکرولیتر بافر TEN و 4 mg/ml لیزوزیم اضافه شد و به دنبال آن انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول ۸/۵ درصد سدیم دو دسیل سولفات اضافه گردید و سپس انکوباسیون به مدت ۳۰ دقیقه در بن‌ماری ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. ۱۵۰ میکرولیتر استات پتاسیم ۵ مولار با 5.2pH روی یخ به نمونه‌ها اضافه شد، نمونه‌ها ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. سپس سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در 3000rpm انجام شد. مایع رویی جدا شد و برای خالص‌سازی DNA از پروتئین‌ها از مخلوط فنل: کلروفرم: ایزوآمیل الکل با نسبت ۲۴:۲۵:۱ استفاده شد. در مرحله رسوب‌دهی DNA ایزوپروپانول سرد مورد استفاده قرار گرفت، در مرحله آخر برای شستشو، اتانول به کار برده شد. رسوب‌های DNA در دمای آزمایشگاه خشک شدند. رسوب‌های حاصله در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل شدند. جهت بررسی کیفیت DNA از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد استفاده شد.

تکثیر ناحیه 16S rRNA و توالی‌یابی: جهت تکثیر ناحیه 16S rDNA از پرایمرهای دجنریت 616V, 630R تهیه شده از شرکت تکاپو زیست که توالی آن‌ها در ذیل قید شده است، استفاده شد (۱۷).

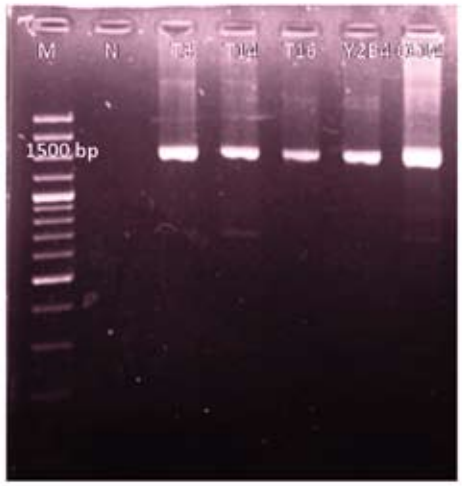
616V, 5-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3;

630R, , 5-CAKAAAGGAGGTGATCC-3.

واکنش PCR متشکل از ۱ میکرولیتر DNA الگو، ۲/۵ میکرولیتر از Buffer PCR 1x که شامل (10mM Tris Hcl PH8.8, 250 mM kcl)، 200µM dNTP و 0.4µM آغازگرهای رفت و برگشت و ۱ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase، حجم کلی واکنش ۲۵ میکرولیتر در نظر گرفته شد. تکثیر DNA در دستگاه Palmcycler Gp-001 (Corbet,Australia) انجام شد. دناتوره شدن DNA الگو در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل به شرح زیر انجام شد: دناتوره شدن در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، اتصال پرایمر در ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و گسترش

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

پرایمر در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دناتوره شدن نهایی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و انکوباسیون نهایی به مدت ۴ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکارسازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با استفاده از بافر TBE 0.5 x (0.5 mM EDTA, pH 8.0, 44.5 mM Tris/Borate) استفاده شد. ژل با رنگ Rima Sight DNA Stain رنگ‌آمیزی شد و شناسایی محصول PCR با نور uv، مورد بررسی قرار گرفت. از مارکر 100bp (Gene Ruler,fermentas) به عنوان مارکر مولکولی استفاده شد (شکل ۱). پس از خالص‌سازی محصول PCR (تقریباً 1500 bp)، توالی‌یابی هر دو رشته توسط پرایمرهای 616V و 630R به کار رفته در واکنش PCR، به روش تمام اتوماتیک فلورسانس و توسط شرکت



شکل ۱: نمایش محصول PCR (قطعه 1500 bp) حاصل از تکثیر ژن rRNA 16S ایزوله‌های جدا شده از ترخینه (T3,T14,T16)، ماست (Y2B4) و پنیر (C614) به همراه مارکر مولکولی (M) و کنترل منفی (N) بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد

Bioneer کره جنوبی انجام گردید.

بررسی فیلوژنی: نتیجه خوانش توالی‌های حاصل از دو زنجیره، جهت شناسایی Chimeric Artifact، توسط نرم‌افزار Vector NTI 11 مورد بررسی قرار گرفت و در نهایت، توالی کامل ناحیه ژنی 16S rDNA برای هر ایزوله حاصل شد. برای شناسایی توالی‌های 16S rDNA ایزوله‌های مورد مطالعه، از برنامه Blastn در پایگاه NCBI BLAST Search tool به آدرس http:/www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST استفاده شد. هم‌ردیفی یا تطبیق تمامی توالی‌های 16S rDNA توسط Clustal W، انجام شد. درخت فیلوژنی با استفاده از روش UPGMA و عدد bootstrap محاسبه شده با Replication 1000، توسط نرم‌افزار MEGA4 رسم شد (۱۹) *Bacillus Cereues* (JQ247722.1, JQ178332.1) به عنوان outgroup استفاده شدند.

توالی‌های باکتری‌های رفرانس به کار رفته در بررسی فیلوژنی: توالی ژن‌های 16S rRNA باکتری‌های رفرانس به‌کار رفته در بررسی‌های فیلوژنی پس از جستجو در Blastn بر مبنای حداکثر هم‌ردیفی با توالی‌های مورد مطالعه (۹۹%-۹۷%) در تحقیق حاضر انتخاب شده و در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱: باکتری‌های مرجع مورد استفاده جهت هم‌ردیفی ایزوله‌ها و میزان بررسی تشابه ایزوله‌های جدا شده با باکتری‌های موجود در پایگاه اطلاعاتی Blastn

Strains	Identification based on sequence analysis		
	Identification	Accession Number	% Similarity
T14	*L. paracasei* subsp. paracasei ATCC 25302	ACGY01000162.1	98%
	L. paracasei subsp. paracasei 8700:2	ABQV01000067.1	98%
	L. casei str. Zhang chromosome	NC_014334.1	98%
	L. casei BL23 chromosome,	NC_010999.1	98%
	L.casei ATCC 334	NC_008526.1	98%
T16	*L. paracasei* subsp. paracasei 8700:2	ABQV01000067.1	99%
	L. casei str. Zhang chromosome	NC_014334.1	99%
	L. casei BL23 chromosome,	NC_010999.1	99%
	L.casei ATCC 334	NC_008526.1	99%
	L. paracasei subsp. paracasei ATCC 25302	ACGY01000162.1	99%
T3	*L. paracasei* subsp. paracasei 8700:2	ABQV01000067.1	99%
	L. casei str. Zhang chromosome	NC_014334.1	99%
	L. casei BL23 chromosome,	NC_010999.1	99%
	L.casei ATCC 334	NC_008526.1	99%
	L. paracasei subsp. paracasei ATCC 25302	ACGY01000162.1	99%
Y2B4	*L. paracasei* subsp. paracasei 8700:2	ABQV01000067.1	99%
	L. casei str. Zhang chromosome	NC_014334.1	99%
	L. casei BL23 chromosome,	NC_010999.1	99%
	L.casei ATCC 334	NC_008526.1	99%
	L. paracasei subsp. paracasei ATCC 25302	ACGY01000162.1	99%
C614	*Enterococcus faecium* D344SRF	ACZZ01000141.1	97%
	Enterococcus faecium E1636	ABRY01000137.1	97%
	Enterococcus faecium E980	ABQA01000099.1	97%
	Enterococcus faecium PC4.1	ADMM01000009.1	97%

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

نتایج

از بین بیست ایزوله جدا شده، سه باکتری T14، T3 و T16 جدا شده از ترخینه و دو باکتری Y2B4 و C6I4 جدا شده از ماست و پنیر با پتانسیل پروبیوتیکی و با قابلیت تولید باکتریوسین قوی‌تر نسبت به بقیه نمونه‌ها که توسط تاج آبادی و همکاران مورد ارزیابی قرارگرفته بودند (۱۶)، جهت شناسایی مولکولی و بررسی فیلوژنتیکی با روش توالی‌یابی در این مطالعه انتخاب شدند. بر طبق آنالیزهای فیلوژنی پیشنهاد می‌شود که باکتری‌هایی با ۹۷%< تشابه در توالی ژن 16S rRNA متعلق به همان گونه می‌باشند (۲۰). پس از انجام توالی‌یابی، مقایسه هم‌ردیفی در پایگاه NCBI Blastn انجام شد و ۹۹ درصد تشابه با *باسیلوس کازئی*، برای ایزوله‌های Y2B4، T16، T3، ۹۸ درصد تشابه با *باسیلوس کازئی* برای ایزوله T14 و ۹۷ درصد تشابه با *انتروکوکوس فاسیوم* برای ایزوله C6I4 حاصل شد که نتایج آن به طور خلاصه در جدول ۱ نمایش داده شده است (برای مثال برای هر ایزوله چهار باکتری با درصد تشابه بالا در نظر گرفته شده است). بنابراین با میزان تشابه به دست آمده حاصل از Blastn، ایزوله‌های مورد مطالعه متعلق به گروه *لاکتوباسیل کازئی* و *انتروکوکوس فاسیوم* بودند. بررسی‌های فیلوژنی و میزان تشابه حاصل شده، حاکی از شناسایی چهار سوش جدید *باسیلوس کازئی* در منبع ترخینه و ماست و یک سوش جدید و بومی از *انتروکوک فاسیوم* از منبع پنیر می‌باشد. توالی سوش‌های مذکور با شماره دستیابی‌های

Lactobacillus casei strain T16 (JQ771073) ،*Lactobacillus casei* strain T14 (JQ771072)

Lactobacillus casei strain Y2B4 (JQ412735) ،*Lactobacillus casei* strain T3 (JQ771071)

و*Enterococcus faecium* strain C6I4 (JQ771070)

در پایگاه اطلاعاتی GenBank ثبت شدند.

شکل ۲ نشان‌دهنده ارتباط فیلوژنی ایزوله‌های مذکور و باکتری‌های مرجع موجود در GenBank می‌باشد. در درخت فیلوژنی حاصله، چهار کلاد اصلی به چشم می‌خورد. در اولین کلاد اصلی، چهار ایزوله مورد مطالعه قرار گرفتند به‌طوری‌که ایزوله T16 با ۹۳ درصد bootstrap با *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در یک گروه قرار گرفتند و به ترتیب ایزوله‌های دیگر نیز با bootstrap بالا نسبت به یکدیگر و *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (ACGY01000162.1) قرارگرفته و همگی با هم یک کلاد را تشکیل دادند. ایزوله C6I4 نیز با ۱۰۰ درصد bootstrap با *انتروکوکوس فاسیوم* (ABRY01000137.1) در یک کلاد گروه‌بندی شدند. بقیه ایزوله‌های مرجع مورد استفاده، یک کلاد جداگانه تشکیل دادند.

بحث

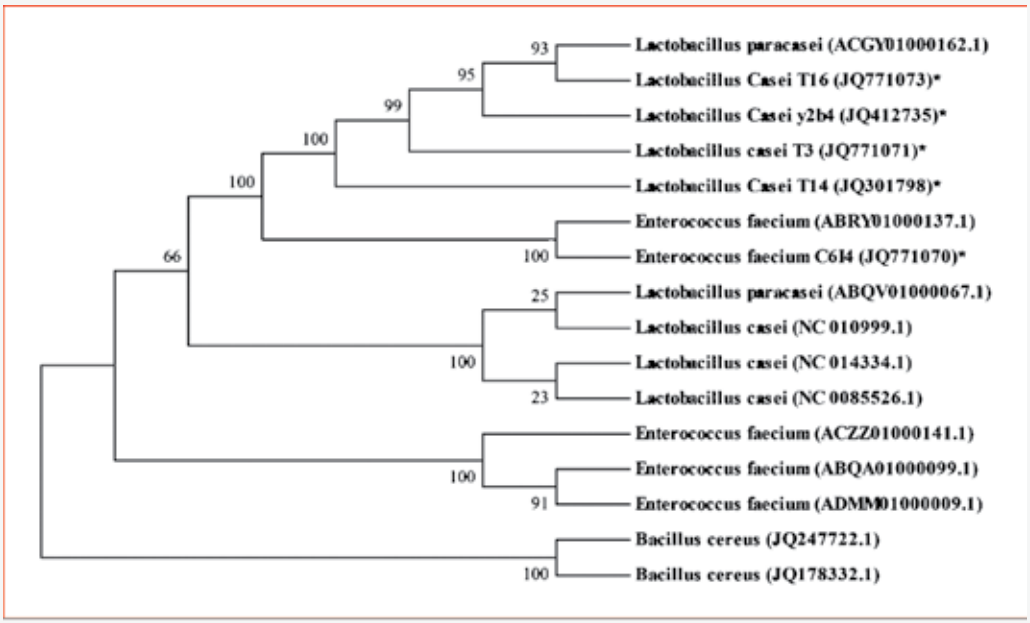
به طور سنتی، گونه‌های *لاکتوباسیل*‌ها و *بیفیدوباکتریوم*‌ها بر اساس مورفولوژی سلول، آنالیز محصولات تخمیری و فعالیت آنزیم‌های مرتبط با آن‌ها و توانایی مصرف سوبستراهای کربوهیدراتی مختلف شناسایی می‌شوند. به طور کلی نقایصی در روش‌های فنوتیپی به چشم می‌خورد که می‌توان به عدم تکرارپذیری توسط شرایط وابسته به کشت در آزمایشگاه‌های مختلف و تنوع سوش‌ها (که در بر گیرنده سوش‌های شناسایی شده است) اشاره کرد (۲۱).

اسیدهـای نوکلئیک در زیست شناسی سلولی، جهان شمول (universal) است و توالی بازی‌های نوکلئوتیدی این مولکول تحت تأثیر شرایط محیط کشت قرار نمی‌گیرند. آنالیز توالی اسیدهای نوکلئیک، پایه و اساسی را برای روش‌های شناسایی فراهم می‌آورد که از یک آزمایشگاه به آزمایشگاه دیگر تکرارپذیرند.

اطلاعات ژنوتیپی (منظور توالی ژنوم) از دو نظر نسبت به اطلاعات فنوتیپی ارجحیت دارد:

سهولت بیشتر، قابل اعتماد بودن بیشتر و تفسیر نتایج دقیق‌تر.

ذاتاً حاوی اطلاعات مفیدتر و جامع‌تری نسبت به اطلاعات



شکل ۲: درخت فیلوژنی، نشان دهنده ارتباط بین توالی‌های 16S rRNA ایزوله‌های مورد مطالعه (مشخص شده با ستاره) و توالی‌های مرجع در GenBank می‌باشد. اعداد واقع در گره کلادها، نمایانگر ارزش bootstrsp (٪) می‌باشند. از باکتری *BacillusCereus* (*JQ247722.1, JQ178332.1*) به عنوان Outgroup استفاده شد.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

فنوتیپکی است.

از سال ۱۹۶۵، کم‌کم روش‌های نوین مولکولی وارد عرصه میکروبیولوژی گردید و روش‌های نوین مولکولی توسط عده‌ای از محققین به عنوان یک روش مفید در طبقه بندی باکتری‌ها در نظر گرفته شد.

مشخص نمودن صفات ویژگی‌های ژنتیکی، بازهای DNA، مطالعات هیبریداسیون اسید نوکلئیک، آنالیز دیواره سلولی و توالی‌یابی پروتئین (البته به میزان کم) کم‌کم جهت گروه‌بندی فیلوژنتیکی معتبر باکتری‌ها به کار گرفته شدند. این روش‌های مولکولی اولیه، به اندازه کافی جهت آشکارسازی تاکسون‌های باکتری‌ها عالی نبودند و در هیچ موردی نتیجه مشترک و یکسانی مشاهده نشد. مولکولی که توالی آن در گذر زمان به طور تصادفی دچار تغییر می‌شود به عنوان کرنومتر مولکولی در نظر گرفته می‌شود. میزان تغییر توالی که انباشته می‌شود برابر است با حاصل‌ضرب نرخ (تا آنجایی که موتاسیون‌ها ثابت می‌شوند) در زمان (در بازه زمانی که تغییرات اتفاق افتاده‌اند). بیولوژیست نمی‌تواند این تغییر را اندازه‌گیری کند بلکه می‌تواند تفاوت بین توالی‌ها را شناسایی کند. تمام توالی‌ها، ارزش یکسانی در تعیین ارتباط فیلوژنی ندارند. یک کرنومتر مفید بایستی دارای ویژگی‌های زیر باشد: رفتار شبه ساعتی داشته باشد (تغییرات در توالی آن بایستی تا حد امکان به صورت تصادفی رخ دهد) و دارای سایز مناسب باشد (مولکول‌هایی که به اندازه کافی بزرگ باشند میزان کافی از اطلاعات را فراهم می‌کنند). چرا rRNAها مناسب هستند؟ rRNA، به عنوان مفیدترین و کاربردی‌ترین کرنومتر مولکولی شناخته شده‌اند. به این علت که درجه بالایی از ثبات عملکردی داشته در تمام ارگانیزم‌ها وجود دارند و موقعیت‌های متفاوت و مختلف در توالی‌شان به میزان‌های متفاوتی تغییر می‌کند و شرایطی را فراهم می‌کند که بیشترین ارتباط فیلوژنتیکی (بیشترین فواصل ژنتیکی) قابل اندازه‌گیری باشد. از طرفی سایز بزرگی دارند و دارای نواحی یا دومین‌های فراوانی هستند. در حدود ۵۰ ساقه مارپیچی در ساختار دوم 16S rRNA وجود دارد. شاید مهم‌ترین دلیل استفاده از rRNA به عنوان کرنومتر این است که مستقیماً می‌توانند توالی‌یابی شوند (۲۲).

در بسیاری از مطالعات از روش توالی‌یابی جهت شناسایی سوش‌های *لاکتوباسیل*‌های پروبیوتیک و تنوع میکروبی موجود در محصولات لبنی و غذایی استفاده شده است. چرا که نسبت به روش‌های رایج بیوشیمیایی که وقت‌گیر و در بسیاری از موارد ابهام‌آمیز می‌باشند روش قابل اعتمادی بوده و قادر به شناسایی سوش‌های نزدیک به هم می‌باشد. Kullen و همکاران در سال ۲۰۰۰ (۲۳) از روش توالی‌سنجی ناحیه ۵۰۰ جفت بازی ژن 16S rRNA (خصوصاً ناحیه متغیر V1و V2) برای شناسایی سوش‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده کردند. این روش به طور موفقیت‌آمیزی قادر به شناسایی طیف وسیعی از سوش‌ها بود. روش توالی‌سنجی ناحیه V3 ژن 16S rRNA برای تعیین دقیق تنوع *لاکتوباسیل*‌ها در کفیر توسط Wang به کار گرفته شد (۲۴). Sisto نیز از همین روش برای شناسایی اختصاصی سوش‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* استفاده کرد (۲۵).

Nithya و همکاران در سال ۱۳۹۰ باکتری *L. Fermentum* را با توان بالای تولید باکتریوسین در آب پنیر به کمک روش توالی‌سنجی شناسایی کردند (۲).

Rajaram و همکاران نیز در سال ۱۳۸۹ نشان دادند که باکتری *L. lactis* جداسازی شده از محیط آبی دارای فعالیت ضد میکروبی قوی علیه باکتری‌های فاسد کننده غذایی است و قابلیت استفاده به عنوان نگه‌دارنده طبیعی دارد (۲۶).

Patil و همکاران در ۱۳۸۹، باکتری‌هایی از جنس *لاکتوباسیلوس*، *پدیوکوکوس* با قدرت باکتری‌کشی از خیار بر اساس مارکر 16S rRNA جداسازی کردند (۲۷).

این تحقیق نیز بیانگر توان قدرتمند مارکر 16S rRNA در شناسایی سوش‌های مختلف *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌باشد. نکته قابل توجه دیگر قرارگیری و گروه‌بندی ایزوله‌های جدا شده محلی در یک کلاد می‌باشد که این امر می‌تواند ناشی از وقوع موتاسیون‌ها و فشار ناشی از انتخاب طبیعی اعمال شده بر جمعیت میکروبی بومی ایران بوده که سبب دوری ایزوله‌های مورد مطالعه از باکتری‌های مرجع موجود در GenBank شده است که خود نشان‌دهنده وجود تنوع ژنتیکی بالا در ذخایر باکتریایی بومی ایران می‌باشد.

نتیجه‌گیری

تا به حال گزارشی مبنی بر شناسایی تنوع میکروبی موجود در ترخینه صورت نگرفته است. نتایج حاصل از تحقیق حاضر، بیانگر وجود سوش‌های متنوعی از *لاکتوباسیلوس کازئی* با خاصیت پروبیوتیکی و توانایی تولید باکتریوسین قوی در غذای سنتی منطقه غرب کشور می‌باشد که از قدیم، در فصل زمستان به طور سنتی جهت درمان سرماخوردگی مورد استفاده قرار گرفته که ظرفیت پروبیوتیکی بالای این منبع غذایی را به اثبات می‌رساند. با توجه به افزایش روزافزون مصرف غذاهای آماده و فست فود و از طرفی عدم تمایل به استفاده از غذاهای محلی خصوصاً در نسل جوان، ضرورت شناسایی و جداسازی باکتری‌های پروبیوتیک از چنین منابع غنی و حفظ آن‌ها مشخص می‌شود و می‌تواند در جهت بهبود و افزایش کیفیت محصولات غذایی و زمان ماندگاری (به عنوان نگه‌دارنده‌های طبیعی) در مصارف صنعتی کاربردی شده و در دسترس عموم مردم جامعه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی واحد پرند به جهت تأمین منابع مالی این تحقیق قدردانی می‌گردد.

References

1. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic acid bacteria: Microbiology and functional aspects. 2nd ed. Marcel Dekker Inc. New York: USA; 1998.P.1–72.
2. Nithya k, Duraisamy S, Balakrishnan S, Narayanapillai U, Ramasamy G. Characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria and its application as a food preservative. Afr J Microbiol Res. 2012;6(6):1138-1146.
3. Fontana C, Sandro Cocconcelli P, Vignolo G. Monitoring the

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Int JFood Microbiol. 2005;103:131–142.
4. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: Evolution, ecology and application. Annu Rev Microbiol. 2002;56:117–137.
5. Marilley L, Casey MG. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. Int J Food Microbiol. 2004;90:139–159.
6. De Martinis ECP, Publio MRP, Santarosa PR, Freitas FZ. Antilisterial activity of Lactic acid bacteria isolated from vacuum- packaged Brazilian meat and meat products. Braz J Microbiol. 2001;32:32–37.
7. Sablon E, Contreras B, Vandamme E. Antimicrobial peptides of Lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2000;68:21–60.
8. Muriana PM. Bacteriocin for control Listeria sp. in food. J Food prot. 1996;56:54–63.
9. Schleifer KH, Ehrmann M, Beimfohr C, Brockmann E, Ludwig W, Amann R. Application of molecular methods for the Classification and identification of Lactic Acid Bacteria. Int Dairy Journal. 1995;5:1081-1094.
10. Wang RF, Cao WW, Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. Appl Environ Microbiol. 1996;62:1242-1247.
11. Collins MD, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow JAE, Martinez-Murcia A, Phillips et al. Phylogenetic analysis of the genus Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol Lett. 1991;77:5-12.
12. Stackebrandt E, Rainey FA. Partial and complete 16S rDNA sequences, their use in generation of 16S rDNA phylogenetic trees and their implications in molecular ecological studies. Molecular microbial ecology manual. 1995; P: 1-17.
13. Vandamme P, Pot B, Gillis V, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microb Rev. 1996;60:407-438.
14. Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A . Purification and Characterization of a Bacteriocin Produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Ad vance Journal of Food Science and Technology. 2010;2(2):138-144.
15. Welling G, Elfferich WP, Raangs GC, Wildeboer-Veloo ACM, Jansen GJ, Degener JE. 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes for monitoring of intestinal tract bacteria. Scand J Gastroenterol. 1997;222:17-19.
16. Tajabadi Ebrahimi M, Bahrami H, Ziary Z. Tarkhineh source of probiotic lactic acid bacteria. The Quarterly Journal of Biological Sciences. 2011;4(12):1-9.
17. Ehrmann MA, Muller MRA, Vogel RF. Molecular analysis of sourdough reveals Lactobacillus mindensis sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2003;53:7–13.
18. Araújo WL, Angellis DA, Azevedo JL. Direct RAPD evaluation of bacteria without conventional DNA extraction. Braz Arch Biol Tech. 2004;47:375-380.
19. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol. 2007;24:1596–1599.
20. Schloss PD, Handelsman J. Introducing DOTUR, a computer program fordefining operational taxonomic units and estimating species richness. Appl Environ Microbiol. 2005;71:1501–1506.
21. Tannock GW. Identification of lactobacilli and bifidobacreria. Current Issue Molec Boil. 1999;1(1):53-64.
22. Woese CR. Bacterial evolution. Microbial Rev. 1987;51:221-271.
23. Kullen MJ, Sanozky-Dawes RB, Crowell DC, Klaenhammer TR. Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex. J Appl Microbiol. 2000;89:511-516.
24. Wang YY, Li HR, Jia SF, Wu ZJ, Guo BH. Analysis of bacterial diversity of kefir grains by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing. Wei Sheng Wu Xue Bao. 2006;46(2):310-313.
25. Sisto A, De Bellis P, Visconti A, Morelli L, Lavermicocca P. Development of a PCR assay for the strain-specific identification of probiotic strain Lactobacillus paracasei IMPC2.1. Int J Food Microbiol. 2009;136(1):59-65.
26. Rajaram G, Manivasagan P, Thilagavathi B, Saravanakumar A. Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactobacillus lactis isolated from marine environment. Advance Journal of Food Science and Technology. 2010;2(2):138-144.
27. Patil MM, Pal A, Annand T, Ramana KV. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from crud and cucumber. Indian J Biotechnol. 2010;9:166-172.

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]
[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]

Original Article

Genotypic and Phylogenic Analysis of Lactobacilli Producing Bacteriocin Isolated from Traditional Dairy Products and Food

Tafvizi F[1*], Tajabadi Ebrahimi M[2], Khojare L[2]

1- Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & objective: Lactic acid bacteria (LAB) are a group of Gram-positive, non-spore forming, cocci or rod shaped, catalase negative organisms, considered as Generally Recognized as Safe (GRAS) organisms. These bacteria are used for thousands of years for production of fermented foods because of their ability to produce desirable changes in food taste, flavor and texture. Different antimicrobial molecules such as bacteriocins produced by these bacteria that can inhibit food pathogens, so enhancing the shelf life and improving the safety of food products. Because of important role of LAB to improving the human health, molecular identification and phylogenic analysis of these bacteria based on 16S rRNA sequencing play a critical role in the investigation of local sources of LAB in Iran for the use in food industrial purposes.

Materials & Methods: Among the isolated bacteria 5 strains which had the higher capability of producing bacteriocin were selected. Total genomic DNA was extracted by lysosyme extraction protocol. PCR-mediated amplification was carried out by degenerate primers. Sequencing was performed after purification of PCR product.

Results: Isolates were deposited as novel strains of *Lactobacillus casei* and *Entrococcus facium* in GenBank.

Conclusion: Because of high potential of local probiotic bacteria in Iran, these strains may be useful and could be used in the food industry.

Keywords: *Lactobacillus*, Phylogenic analysis, 16S rRNA, Bacteriocin

*** Corresponding author: Tafvizi Farzaneh,** Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
Tel: +98 21 22352253
Email: tafvizi@piau.ac.ir

[Downloaded from jabs.fums.ac.ir on 2026-05-14]

[DOR: 20.1001.1.22285105.2012.2.2.8.4]