● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔدوازدهم، شمارهٔ ۱، ص۳۱-۲۱، ۱۳۸۳

مقالهٔ پژوهشی

شناسایی بیفیدوباکتریوم‌های جدا شده از نمونه‌های مدفوعی در ایران با استفاده از PCR با پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس و آنالیز توالی ژنی 16S rRNA

مرتضی خمیری[۱]، دکتر سید علی مرتضوی[۲]، دکتر حمید بهادر قدوسی[۳]، دکتر علی خامسان[۴]، دکتر درخشان احمد[۵]، و دکتر فخری شهیدی[۳]

خلاصه

در این تحقیق برای اولین بار بیش از ۴۰ ایزوله باکتریایی مربوط به بیفیدوباکتریوم از مدفوع تعدادی از شهروندان ایرانی جدا و خالص‌سازی شد. پس از مطالعه خواص فنوتیپی و شناسایی آنها در سطح گونه، ۱۸ ایزوله از آنها به عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم، ۱۰ ایزوله به عنوان بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و یک ایزوله به عنوان بیفیدوباکتریوم کتنولاتوم شناسایی شدند. اما با استفاده از آزمایشات فنوتیپیک برای بقیه ایزوله‌ها نظر قاطعی جهت قرارگیری در زیر گونه‌ای مشخص ارائه نشد. بنابراین برای تأیید در سطح جنس و نیز برای شناسایی دقیق گونه‌های باکتریایی جدا شده به یکی از دو روش، استفاده از PCR با پرایمرهای اختصاصی Bif۱۶۴f و Bif۶۰۱r یا تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۶SrRNA مورد بررسی و مطالعه قرار گرفتند. به کارگیری PCR علاوه بر تأیید باکتری‌هایی که قبلاً با استفاده از آزمایشات فنوتیپیک تحت جنس بیفیدوباکتریوم شناسایی شده بودند، مشخص نمود که ۸ ایزوله رد شده با آزمایشات فنوتیپیک نیزمتعلق به جنس بیفیدوباکتریوم است.درروش تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن 16S rRNA علی‌رغم قرارگیری ۵ ایزوله درزیر گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم اختلاف قابل توجهی در تخمیر کربوهیدرات‌های آنها با این گونه مشاهده می‌شود که ممکن است در تخمیر ۲ تا ۶ کربوهیدرات با آن اختلاف داشته باشند. علاوه بر این تعدادی از ایزوله‌های تأیید شده به عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم قادر به تخمیر ریبوز نبودند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل، سویه‌های جدیدی از بیفیدوباکتریوم لانگوم در این طرح ارائه شده است.

واژه‌های کلیدی : بیفیدوباکتریوم، سویه‌های ایرانی، 16SrRNA ، PCR ، پرایمرهای Bif۱۶۴f و Bif۶۰۱r ، شناسایی

۱ـ دانشجوی دورهٔ دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد و مربی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، ۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد ۴- عضو هیأت علمی پژوهشی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور، کرج ۵- عضو هیأت علمی انستیتو ملی علمی و تحقیقات (INRS) کانادا در مونترال

دریافت مقاله:۱۳۸۳/۲/۲۸ **دریافت مقاله اصلاح شده :** ۱۳۸۳/۸/۱۳ **پذیرش مقاله:**۱۳۸۳/۹/۱۱

مقدمه

مجاری روده‌ای انسان جایگاه جمعیتی از میکروب‌های فعال و متنوع است که عموماً تحت عنوان میکروفلور روده خوانده می‌شوند. بیفیدوباکتریوم (Bifidobacterium) یکی از مهم‌ترین میکروارگانیسم‌های این مجموعه پیچیده و متنوع است. بیفیدوباکتریوم باکتری گرم مثبت، چند شکلی، شدیداً بی‌هوازی و بدون اسپور است (۹،۱۲،۲۴). حضور این باکتری‌ها در روده اثرات مفیدی را بر سلامتی انسان موجب می‌شوند که از جمله آن می‌توان از اثرات تغذیه‌ای مانند تولید برخی از ویتامین‌های مورد نیاز بدن و افزایش هضم‌پذیری پروتئین‌ها (۹،۱۱)، اثرات دارویی مانند جلوگیری از عفونت روده‌ای، جلوگیری از بروز یا کاهش اسهال (۲،۱۰)، کاهش اختلالات ناشی از رادیوتراپی (۱۱)، درمان احتمالی برخی از ضایعات مغزی ناشی از نارسایی کبد (نوعی هپاتیک Hepatic encephalopathy) (۲۵)، کاهش میزان کلسترول خون (۱۹)، کاهش ترکیبات سرطانی (۲۰) و اثرات ایمونولوژیک با تقویت سیستم ایمنی بدن (۸) و کاهش اثرات عدم تحمل لاکتوز (۷) را نام برد.

تلاش‌های بسیاری برای افزایش سلول‌های بیفیدوباکتریوم در مجاری روده صورت گرفته است. یکی از این روش‌ها مصرف دهانی این باکتری‌ها همراه با غذاهای ویژه‌ای تحت عنوان فرآورده‌های پروبایوتیک است. امروزه فرآورده‌های غذایی پروبایوتیک به خصوص از نوع لبنی آن در دنیا رواج فراوانی دارد. مصرف این فرآورده‌ها یکی از بهترین روش‌های حفظ تعادل فلور میکروبی مفید روده و حفظ سلامتی محسوب می‌شود (۱۱،۲۶).

با توجه به اهمیت این باکتری‌ها تلاش‌های زیادی برای شناسایی ، ردیابی در روده و استفاده از آنها صورت گرفته است. به دلیل این که روش‌های فنوتیپی برای شناسایی باکتری‌ها اغلب وقت‌گیر، بسیار سخت و پر مشقت است (۱۳،۱۶) و نیز نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپیک مانند تخمیر کربوهیدرات‌ها در برخی موارد مبهم می‌باشد و قادر به تفکیک کامل یا دقیق باکتری‌ها در سطح گونه نیست، امروزه برای شناسایی و یا تأیید نژادهای ناشناخته که از منابع طبیعی جدا می‌شوند علاوه بر انجام مطالعات فنوتیپی، بررسی‌های مولکولی و ژنتیکی هم انجام می‌شود. تا کنون محققین روش‌های مولکولی متفاوتی را برای شناسایی باکتری‌ها اتخاذ کرده‌اند از جمله: هیبریدیزاسیون DNA-DNA (۱۴)، هیبریدیزاسیون با شناساگرهای (probes) اختصاصی DNA (۱۳) تعیین نقشه ژنتیکی بر اساس روش انگشت‌نگاری DNA (DNA Finger Printing) (۲۹)، روش (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ARDRA (۲۱)، PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس، گونه یا نژاد (۱۶،۲۸)، تعیین توالی نوکلئوئیدهای ژن ۱۶SrRNA، ۲۳SrRNA و یا فضای بین این دو (۲۷) می‌توان نام برد. نتایج حاصل از دو روش اخیر، استفاده از PCR و نیز تعیین توالی نوکلئوتیدها مانند دیگر روش‌های ژنتیکی کاملاً مطمئن، دقیق، سریع، مقرون به صرفه و قابل اعتماد است. به علاوه در این روش‌ها محدودیت‌های کمتری در اجرا وجود دارد (۱۶).

خلائی که در خصوص انجام پژوهش‌هایی بر روی بیفیدوباکتریوم‌ها در ایران احساس می‌شد موجب شد تا در گام اول با جداسازی و شناسایی این باکتری زمینه برای کارهای بعدی در ایران فراهم گردد. لذا در پژوهش حاضر برای تأیید تعدادی از ایزوله‌های بیفیدوباکتریوم در سطح جنس و شناسایی برخی از آنها در سطح گونه که برای اولین بار از مدفوع تعدادی از شهروندان ایرانی جدا شده بودند (۱)، از دو روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و تعیین توالی نوکلئوئیدهای ژن ۱۶SrRNA استفاده شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی با استفاده از روش‌های فنوتیپی

بیفیدوباکتریوم‌های استفاده شده در این پژوهش قبلاً از مدفوع تعدادی از شهروندان مشهدی جداسازی و خالص‌سازی شده بود (مقاله مربوط به این پژوهش برای چاپ ارائه شده است). به طور خلاصه برای جداسازی از محیط کشت بیرنز (Beerens) به عنوان یک محیط اختصاصی استفاده شد (۴). نمونه‌های مدفوعی پس از رقیق شدن به صورت خطی روی محیط کشت داده شدند. پس از اینکوباسیون در دمای ۳۷°C تحت شرایط بی‌هوازی با استفاده از سیستم جار بی‌هوازی و گاز پک (مرک، آلمان) به مدت ۵ روز، کلنی‌های رشد یافته‌ای که دارای سلول‌هایی با اشکال شاخه‌دار، یا اشکالی مانند Yو V، برخی نیز با سرهای برجسته و گرم مثبت بودند، انتخاب شدند. پس از آن طی ۳- ۲ بار انتقال بر روی محیط TPY Agar (تریپتوکیز، پپتون و عصاره مخمر (مرک، آلمان)) حاوی L-سیستئین- HCl (مرک، آلمان) خالص‌سازی شدند(۲۴). برای شناسایی باکتری‌های خالص شده سه دسته از آزمایشات فنوتیپی مربوط به بیفیدوباکتریوم‌ها به شرح زیر

انجام شد:

الف- آزمایشات سطح جنس: در این مرحله با توجه به کارهای میتسوکا دوازده آزمایش شامل رشد در شرایط هوازی، تولید گاز از گلوکز ، تولید کاتالاز، تولید نیترات، تولید ایندول، تجزیه ژلاتین و تولید اسید از رامنوز، سوربوز، گلیسرول، اریتریتول، آدونیتول و دولسیتول انجام شد (۱۸).

ب- تخمیر کربوهیدرات‌ها : در این مرحله هر یک از ایزوله‌هایی تأیید شده با آزمایشات سطح جنس از نظر توانایی تخمیر ۲۵ ترکیب کربوهیدراتی مانند تعدادی از قندهای ساده، پلی‌ساکاریدها، پلی الکل‌ها و ... آزمایش شد (۲۲،۲۴).

ج- تعیین آنزیم فروکتوز٦- فسفات فسفوکتولاز(F6PPK): مهم‌ترین و قابل اعتمادترین آزمایش فنوتیپی برای شناسایی بیفیدوباکتریوم‌ها بررسی وجود آنزیم فروکتوز ۶- فسفات فسفوکتولاز است. این آزمایش بر اساس روش اسکاردوی انجام شد (۲۴).

استخراج DNA

۱ ml از کشت تازه ۴۸ ساعته در محیط مایع +MRS3 (۲۱) با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ دقیقه سانتریفوژ (اپندروف، آلمان) شد. سلول‌های رسوب داده شده با ۲۰۰ µl تریس ۲۰ mM و pH=۸ شستشو و دوباره سانتریفوژ شدند. پس از شکستن دیواره سلولی با استفاده از آنزیم لایزوزیم و حذف پروتئین به وسیله پروتئیناز K، DNA بر اساس روش فنل، کلروفرم استخراج شد (۳) و در ۵۰µl آب دی‌یونیزه استریل حل شد.

انجام PCR

با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس، Bif۱۶۴f (۱۵،۲۳) و Bif۶۰۱r (۵)، قطعه‌ای از ژن۱۶S، RNA ریبوزومی(rDNA) که شاخص جنس بیفیدوباکتریوم می‌باشد در یک دستگاه PCR (مدل Gene Amp، شرکت Applied Biosystem، آمریکا) تکثیر شد. مخلوط واکنش(Reaction mixture) (۵۰µl) حاوی ۲۵pmol پرایمر اختصاصی Bif۱۶۴f و Bif۶۰۱r، ۰/۲mM از هر یک از دی‌اکسی‌ریبونوکلئوتیدهای تری‌فسفات ۱µl از DNA جدا شده از باکتری‌های مورد آزمایش و ۲/۵U از Taq DNA پلی‌مراز (Amersham-Pharmacia Biotech, Baie d'Urfée-Canada)، $MgCl_2$ با غلظت نهایی ۱/۵ mM، ۵µl از بافر PCR ، با برنامه زیر انجام شد:

۱) دناتوراسیون اولیه در ۹۴°C بمدت ۵ دقیقه طی یک سیکل

۲) ۳۵ سیکل عبارت از: دناتوراسیون در۹۴°Cبه مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن رشته‌ها در ۶۰°C به مدت ۴۵ ثانیه و افزایش طول رشته‌ها در ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه.

۳) افزایش طول نهایی رشته تشکیل شده در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه

۴) خنک کردن تا دمای ۶°C

در PCR علاوه بر DNA استخراج شده از ایزوله‌های باکتریایی مربوط به این پژوهش، از DNA استخراج شده از دو باکتری بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس (ATCC ۱۷۳۰) و لاکتوباسیلوس جانسونی (ATCC۳۳۲) به ترتیب به عنوان کنترل مثبت و کنترل منفی استفاده شد. از لوله‌ای نیز به عنوان نمونه شاهد (Blank) استفاده شد که حاوی همه اجزاء محلول واکنش به جز DNA بود.

برای آنالیز فرآورده تکثیر شده PCR، ۵µl از آن روی ژل آگاروز ۱/۲٪ در بافر TBE ۰/۵٪ (w/v) برده شد. پس از برقراری جریان ۱۰۰V در الکتروفورز به مدت حدود ۱ ساعت،ژل در محلول اتیدیوم برماید (۵µg/ml) رنگ‌آمیزی شد و سپس با استفاده از نورUV مورد مشاهده قرار گرفت. از یک مارکرDNA ۵۰۰bp (آلمان) نیز به عنوان نشانگری برای تخمین وزن مولکولی قطعه DNA حاصل، استفاده شد.

بررسی توالی (Sequence) نوکلئوتیدها در ژن SrRNA ۱٦(rDNA)

ابتدا PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی F۱ وR۲ (جدول ۱) با مخلوط واکنشی مشابه PCR قبلی و با برنامه‌ای تقریباً مشابه انجام شد. در این برنامه پس از دناتوراسیون اولیه، از ۳۵ سیکل تکثیر عبارت از: دناتوراسیون در ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، چسبیدن رشته‌ها در ۵۵°C به مدت ۳۰ ثانیه و افزایش طول رشته‌ها در ۷۲°C به مدت ۴۵ ثانیه استفاده شد (۶).

پس از تکثیر کامل ژن ۱۶S، RNA ریبوزمی توالی نوکلوتیدهای آنها به وسیله شرکت Shildon در کانادا تعیین گردید. پس از بررسی و مقایسه ژن‌های موجود در بانک

جدول ۱ : *مشخصات پرایمرهای استفاده شده در این تحقیق*

مشخصات / کاربرد	اندازه ژن حاصل	محل اثر	طول پرایمر	توالی ژنی پرایمر (5`→3`)	نوع پرایمر
اختصاصی برای شناسایی بیفیدوباکتریوم در سطح جنس	~۵۰۰	۱۸۱–۱۶۴ ۶۰۱–۵۸۱	۱۸ ۲۱	GGGTGGTAATGCCGGATG TAAGCGATGGACTTTCACACC	f۱۶۴Bif r۶۰۱Bif
عمومی برای همه باکتری‌ها	~۱۵۰۰	۲۵–۸ ۱۴۳۱– ۱۴۵۰ ۸۱۶–۷۹۷	۱۸ ۲۰ ۲۰	GACTCGGTCCTAGTTTGA AGGCCCGGGAACGTATTCAC GGACTACCAGGGTATCTAAT	F۱ R۲ R۱

ماخذ: منابع ۴ و ۵

ژنی با آدرس http://www.ncbi.net نوع استرین‌های مورد آزمایش تعیین گردید.

خالص سازی قطعه ژنی حاصل از PCR

برای خالص‌سازی فرآورده حاصل از PCR از پرایمرها و dNTP (داکسی نوکلئوزاید تری فسفات) اضافی از کیت DNeasy Tissue (شرکت Qia gene، انتاریو، کانادا) و روش ارائه شده در کیت استفاده شد.

نتایج

بررسی فنوتیپی بیفیدوباکتریوم‌های جدا شده

پس از جداسازی و خالص‌سازی کلنی‌های مشکوک به بیفیدوباکتریوم بر اساس خصوصیات مورفولوژی، همه باکتری‌هایی که در اولین دسته از آزمایشات بیوشیمیایی (در سطح جنس) مشابه بیفیدوباکتریوم ظاهر شدند (همه آزمایشات سطح جنس منفی بودند) از نظر وجود آنزیم ۶-فسفات-فسفوکتولاز آزمون شدند. پس از تأیید بیفیدوباکتریوم بودن جنس آنها، با استفاده از آزمون تخمیر کربوهیدرات‌ها در سطح گونه شناسایی شدند. بر اساس نتایج حاصل تا این مرحله ۴۰ سویه باکتریایی تحت عنوان جنس بیفیدوباکتریوم‌ها شناسایی شدند که می‌توان عملاً آنها را به دو گروه تقسیم کرد:

الف) گروهی که از نظر آزمون تخمیر مشابه یکی از گونه‌های بیفیدوباکتریوم ظاهر شدند (نتایج نشان داده نشده است). در این گروه تعداد ۲۹ باکتری شناسایی شدند که ۱۸ گونه از آنها به عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم، ۱۰ گونه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و یک گونه بیفیدوباکتریوم کتنولاتوم شناسایی شدند. از بین سویه‌هایی که به عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم شناسایی شدند ۹ سویه تنها در تخمیر قند ریبوز با آن اختلاف دارند.

ب) گروهی که از نظر آزمایشات تخمیری مشابه هیچ یک از بیفیدوباکتریوم‌های شناخته شده نبودند. در این گروه ۵ سویه از باکتری‌ها شناسایی شدند که نتیجه تخمیر آنها در جدول ۲ مشاهده می‌شود.

PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی در سطح جنس

برای تأیید و تکمیل نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی، از PCR و روش‌های شناسایی مولکولی استفاده شد. برای بررسی باکتری‌های گروه اول، که در بخش قبلی به آنها اشاره شد، از PCR و پرایمرهای اختصاصی Bif ۱۶۴f و Bif ۶۰۱r استفاده شد. نتایج حاصل از تکثیر ژن اختصاصی فضای بین دو پرایمر پس از اجرای PCR ، بردن روی ژل آگارز و مشاهده در معرض نور UV در شکل ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در این شکل مشاهده می‌شود همه سویه‌های آزمایش شده دارای باند اختصاصی مشابهی با بیفیدو باکتریوم لانگوم (ATCC ۳۰۸) هستند که به عنوان کنترل مثبت در خطهای شماره ۱۷ شکل ۱a، ۱b و خط شماره ۷ شکل ۱c دیده می‌شوند. همان‌طور که در بالا آمد ۲۹ سویه از باکتری‌های آزمایش شده دارای الگوی تخمیر مشابهی با بیفیدوباکتریوم‌های شناخته شده بودند که ۲۷ سویه از آنها در شکل ۱ مشاهده می‌شود (اطلاعات مربوط به دو سویه در شکل نیامده است).

در این پژوهش علاوه بر تأیید ایزوله‌های باکتریایی که قبلاً با استفاده از آزمایشات سطح جنس بیفیدو باکتریوم بودن آنها محرز شده بود، ۸ ایزوله از سویه‌هایی که تنها در یک یا دو آزمایش از آزمایشات سطح جنس در مراحل اولیه شناسایی به روش فنوتیپی با

بیفیدوبا کتریوم‌ها اختلاف داشتند انتخاب و پس از انجام PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی سطح جنس Bif۱۶۴f و Bif۶۰۱r ، مورد بررسی قرار گرفتند. این بررسی نشان داد که همه این ایزوله‌ها نیز از جنس بیفیدوباکتریوم می‌باشند (شکل ۱a خط‌های ۱۳ تا ۱۵ و شکل ۱ b خط‌های ۱ تا ۵).

جدول ۲ : *نتایج تخمیر قندهای مهم مربوط به بیفیدوباکتریوم‌های جداشده*

قند / کد	زایلوز	ترهالوز	ساکارز	نشاسته	سوربیتول	سالیسین	رافینوز	ریبوز	ملزیتوز	ملیبیوز	مانوز	مانیتول	مالتوز	لاکتوز	گلوکز	گالاکتوز	فروکتوز	اسکولین	سلوبیوز	آرابینوز
F۴۳۱۱				-	+		+	+					+	+	-	+	+	-	-	+
F۱۷۱۲				-	+		+	+					+	+	-	+	+	V	V	+
M۰۸۱۳				W	+		+	-					+	+	-	+	+	+	+	+
F۰۳۱۱				-	+		+	-					+	+	-	+	+	+	+	+
F۰۶۳۱				-	-		+	-					+	+	-	+	+	+	+	+

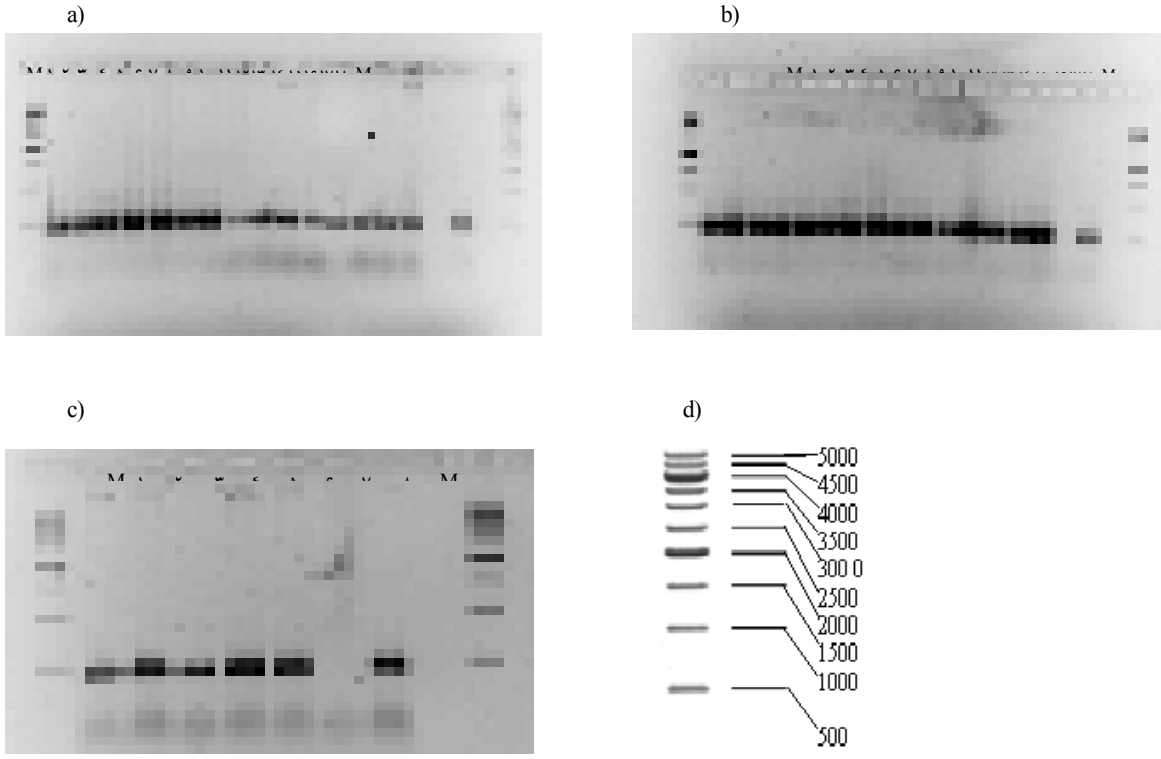
علائم : + = مثبت ؛ – = منفی ؛ V = متفاوت ؛ W = ضعیف. نتایج مربوط به تکرار ۲ بار آزمایش است.

جدول۳ : *درصد همولوژی نوکلئوتیدهای 16S rDNA ایزوله‌های بیفیدوباکتریوم جدا شده در این تحقیق با 16S rDNA دیگر بیفیدوباکتریوم‌های ثبت شده در بانک ژن* *

کد باکتری/باکتری های مورد آزمایش	شماره های قابل دسترسی در بانک ژن	گونه های بیفیدوباکتریوم	درصد همولوژی (مقدار همپوشانی باقی مانده ها)**
M۲۰۱۱ F۱۷۱۲ ،M۰۵۲۱ ،M۰۸۱۳ F۰۶۳۱ ،M۰۳۱۱ F۴۳۱۱ M۱۵۱۳ ،M۱۵۱۲ M۲۵۲۱	AG۱۵۱۳۹۹,۱ AE۰۱۴۷۵۶,۱	B. longum strain KB B.Longum NCC۲۷۰۵	۹۹
M۱۵۱۴	AJ۲۷۰۴۹۲,۱ AE۰۱۴۷۵۶,۱	Butyrate-producing bacterium B.Longum NCC۲۷۰۵	۹۹
M۱۵۱۱	AJ۳۱۱۶۰۵,۱ AY۲۶۷۱۹۰,۱	*B. breve* B. breve strain KBv۶	۸۸
F۰۹۱۴ F۰۹۱۳ ،F۰۵۱۲	U۲۵۹۵۲,۱ U۲۵۹۵۲,۱	B. bifidum KCTC B. bifidum KCTC	۹۹
F۰۳۱۱ ،F۰۳۱۳	AE۰۱۴۷۵۶,۱ AE۰۱۴۷۸۶,۱	B.Longum NCC۲۷۰۵	۹۹
F۰۶۲۱	AF۴۳۲۰۸۲,۱	*B. catenulatum*	۹۹

*به آدرس : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

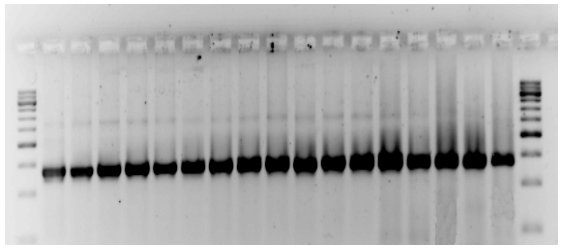
**درصدها بدون در نظر گرفتن اشتباهات دستگاه سیکونسر در کروماتوگرام محاسبه شده است. در اکثر موارد با خارج کردن خطای سیکونسر میزان همولوژی تا ۱۰۰ درصد ارتقا می‌یابد.



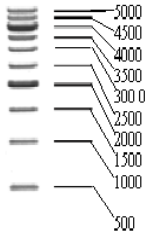
شکل ۱: *فرآورده های حاصل از PCR با استفاده از پرایمر اختصاصی سطح جنس Bif164f و Bif601r : a) خطوط ۱ تا ۱۸: M۱۵۱۱ M۱۵۱۲ M۱۵۱۳ ، F۰۴۱۱ ، F۱۷۱۳ ، F۱۷۱۱ ، M۰۳۱۱ ، F۲۵۱۱ M۰۸۱۲ ، M۰۳۱۱ F۰۹۱۱ ، F۰۶۴۱ F۰۵۱۱ ، F۰۲۱۱ F۰۴۱۱ کنترل منفی لاکتوباسیلوس جنسونی ۳۳۲ ATCC، کنترل مثبت بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس ۱۷۳۰ATCC، شاهد حاوی همه اجزاء مخلوط واکنش در PCR بجز DNA. b) خطوط ۱ تا ۱۸: M۲۶۱۱ F۰۳۱۱ M۰۸۱۱ ، F۰۳۱۲ ، M۰۳۱۲ ، F۰۹۱۲ ، F۱۷۱۳ ، F۱۰۱۱ F۴۳۱۲ ، F۰۴۱۲ ، F۰۶۱۱ M۱۵۱۴ F۴۳۲۱ ، UU11 ، F۰۳۲۱ کنترل منفی لاکتوباسیلوس جنسونی ۳۳۲ ATCC، کنترل مثبت بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس ۱۷۳۰ATCC، شاهد حاوی همه اجزاء مخلوط واکنش در PCR بجز DNA c) خطوط ۱ تا ۸: M۰۵۱۱ F۰۳۱۴ ، F۰۶۳۲ ، F۰۴۱۱ F۱۷۱۴ ، M۱۵۱۵ ، کنترل منفی لاکتوباسیلوس جنسونی ۳۳۲ ATCC، کنترل مثبت بیفیدوباکتریوم آدولسنتیس ۱۷۳۰ATCC، شاهد حاوی همه اجزاء مخلوط واکنش PCR بجز DNA؛ M در دو طرف هر یک از اشکال مارکر ۵۰۰bp d) اندازه باندهای مربوط به نشانگر جهت مقایسه در اشکال ۱a ، ۱b و ۱C*

PCR با استفاده از پرایمرهای عمومی و تعیین توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۶S rRNA

برای تأیید و همچنین تعیین نوع گونه برخی از باکتری‌های جدا شده که الگوی تخمیر کربوهیدرات‌های آنها با هیچ یک از بیفیدوباکتریوم‌هایی که تاکنون شناخته شده است (از گروه دوم) یکسان نبود، توالی نوکلئوتیدهای ژن ۱۶ S rRNA (با پرایمر عمومی F1 یا R1) در آنها بررسی شد. علاوه بر این تعدادی از سویه‌های شناخته شده از گروه اول که با آزمایشات فنوتیپی در سطح گونه شناسایی شده بودند، نیز با این روش بررسی شدند. نتایج حاصل از این بخش از آزمایشات در شکل ۱ و جدول ۳ ملاحظه می‌شود.



a)



b)

شکل ۲: *فرآورده حاصل از PCR با استفاده از پرایمر های عمومی به اندازه تقریبی ۱۵۰۰bp : به ترتیب خط‌های ۱ تا ۱۷ عبارتند از: M۰۵۲۱ ،M۲۰۱۱ M۱۵۱۱ F۴۳۱۱ ،F۱۷۱۲ ،F۰۵۱۲ ، F۰۳۱۱ ، F۰۶۲۱ ،M۰۸۱۳ F۰۶۳۱F۰۳۱۳ F۰۹۱۳ F۰۹۱۴ ،M۲۵۲۱ ، M۱۵۱۴ ،M۱۵۱۲ ، M۱۵۱۳ (M۰۳۱۱ در این شکل ظاهر نشده است) b) اندازه باندهای مربوط به نشانگر جهت مقایسه در اشکال ۲a*

تعداد باکتری‌های بررسی شده با این روش ۱۸ سویه است که پس از تعیین توالی نوکلئوتیدها در این گونه‌ها و مقایسه آنها با داده‌های موجود در بانک ژن به آدرس http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ ، میزان همولوژی (Hemology) آنها با همدیگر بررسی شد. از ۱۸ باکتری بررسی شده ۱۳ عدد به عنوان بیفیدوباکتریوم لانگوم، ۳ عدد به عنوان بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، یک ایزوله بیفیدوباکتریوم کتنولاکتوم و یکی دیگر بیفیدوباکتریوم بروی شناسایی شدند. میزان همولوژی توالی نوکلئوئیدهای ژن ۱۶SrRNA در ۱۳ سویه آزمایش شده در این تحقیق با توالی نوکلئوئیدهای ۱۶SrDNA موجود در داده‌های بانک ژن مربوط به بیفیدوباکتریوم لانگوم ۹۹٪ است. توالی نوکلئوئیدهای سه سویه از باکتری‌های آزمایش شده نیز با توالی نوکلئوئیدهای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به میزان ۹۹٪ همولوژی دارند. در دو مورد دیگر نیز همولوژی بالایی با بیفیدوباکتریوم کتنولاتوم (۹۹٪) و بیفیدوباکتریوم بروی (۸۸٪) مشاهده شد (جدول ۳).

بحث

بررسی نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی و روش‌های ژنتیکی نشان می‌دهد که تنها استفاده از یک روش شناسایی نمی‌تواند موجب شناسایی دقیق ایزوله‌های باکتریایی حاصل از یک منبع طبیعی باشد و معمولاً باید نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی با روش‌های ژنتیکی مقایسه و نتیجه نهایی استنتاج گردد. Langendijk و همکارانش (۱۹۹۵) نیز در یافته‌های خود در این مورد تأکید کرده‌اند (۱۵).

طبق نتایج حاصل از به کارگیری PCR با پرایمرهای اختصاصی، همه باکتری‌هایی که با روش‌های فنوتیپی به عنوان بیفیدوباکتریوم در سطح جنس شناسایی شده بودند با استفاده از این روش هم تأیید شدند. این موضوع نشان می‌دهد که معیارهای آزمون شده در سطح جنس مناسب بوده و می‌توان گفت باکتری‌های شناسایی شده با آزمایشات سطح جنس تحت عنوان بیفیدوباکتریوم قابل قبول و مورد پذیرش است. اما از آنجایی که نتایج حاصل از ۸ ایزوله تأیید نشده با روش‌های فنوتیپی متفاوت از آنچه بود که از اعمال روش‌های ژنتیکی حاصل شد و تکرار آزمون‌های فنوتیپی نشان داد نتایج برخی آزمایشات اولیه به قدر کافی دقیق و صحیح نبوده است، قابل اعتماد بودن بیشتر نتایج حاصل از روش‌های ژنتیکی نسبت به روش‌های کلاسیک ثابت می‌شود. شناسایی باکتری‌ها با استفاده از روش بررسی توالی نوکلئوتیدهای ۱۶SrRNA نیز تفاوت‌هایی در سطح گونه، با نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی را نشان داد. بنابراین بر اساس نتایج حاصل می‌توان با قاطعیت گفت که تنها استفاده از روش‌های کلاسیک برای شناسایی بیفیدوباکتریوم‌ها به خصوص در سطح گونه کافی نبوده و نتایج حاصل از آنها به طور کامل قابل اعتماد نیست. لذا پیشنهاد می‌شود با توجه به پیشرفت روش‌ها و ابزار تحقیق در کشور ما نیز برای شناسایی باکتری‌ها تنها به روش‌های کلاسیک

اکتفا نشود بلکه امکانات بررسی‌های مولکولی و ژنتیکی نیز فراهم گردد.

مقایسه نتایج توالی نوکلئوتیدهای ۱۶SrRNA و نتایج حاصل ازبررسی خواص تخمیری سویه‌های F۱۷۱۲ ، F۴۳۱۱، M۰۳۱۱، F۰۶۳۱، M۰۸۱۳، جالب است. زیرا علی‌رغم قرارگیری این سویه‌ها در زیر گونه بیفیدوباکتریوم لانگوم اختلافات قابل توجهی در تخمیر کربوهیدرات‌های آنها با این گونه مشاهده می‌شود. این سویه‌ها در الگوی تخمیر خود به ترتیب دارای چهار، دو، پنج، سه و شش اختلاف با بیفیدوباکتریوم لانگوم می‌باشند. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان گفت این ایزوله‌ها سویه‌های جدیدی از بیفیدوباکتریوم لانگوم بوده و در حال حاضر تا انجام تحقیقات بیشتر این باکتری‌ها به ترتیب تحت عناوین زیر نام‌گذاری می‌شوند:

Bifidobacterium longum F۱۷۱۲

Bifidobacterium longum F۴۳۱۱

Bifidobacterium longum M۰۳۱۱

Bifidobacterium longum F۰۶۳۱

Bifidobacterium longum M۰۸۱۳

همان‌طور که ذکر شد علاوه بر بررسی توالی نوکلئوتیدهای ۱۶S rRNA سویه‌های گروه دوم، تعدادی از سویه‌های شناخته شده در سطح گونه نیز بررسی شدند. نتایج ضمن تأیید نتایج حاصل از روش‌های فنوتیپی بر این واقعیت صحه می‌گذارند که ما در این تحقیق به سویه‌هایی از بیفیدوباکتریوم لانگوم دست یافته‌ایم که قادر نیستند ریبوز را تخمیر نمایند در حالی که در گزارش‌های اسکاردوی و میتسوکا این گونه ریبوز مثبت گزارش شده است (۱۷،۲۳). سویه‌های تأیید شده ریبوز منفی عبارتند از : M۰۵۲۱ ، M۲۰۱۱ ، M۱۵۱۲ ، M۱۵۱۳ ، M۲۵۲۱ . بنابراین، این سویه‌ها در حال حاضر تا انجام پژوهش‌های بیشتر به ترتیب تحت عناوین زیر نام‌گذاری می‌شوند:

Bifidobacterium longum M۰۵۲۱

Bifidobacterium longum M۲۰۱۱

Bifidobacterium longum M۱۵۱۲

Bifidobacterium longum M۱۵۱۳

Bifidobacterium longum M۲۵۲۱

برخی از سویه‌های ریبوز مثبت تأیید شده با استفاده از پرایمرهای اختصاصی Bif ۱۶۴f و Bif ۶۰۱r و بررسی شده با استفاده از روش تعیین توالی نوکلئوتیدها ی ژن S rRNA ۱۶ در شکل ۱ و ۲ دیده می‌شوند که آنها نیز به همین روش نام‌گذاری می‌گردند:

Bifidobacterium longum M۰۳۱۱

Bifidobacterium longum M۱۵۱۴

با توجه به یافته‌های حاصل از این پژوهش و کارهای مشابه (۱۶،۱۷،۲۳،۲۸) می‌توان نتیجه گرفت که PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی همراه با آزمون‌های فنوتیپی می‌توانند شناساگرهای مهمی برای شناسایی نژادهای بیفیدوباکتریوم در نمونه‌های مدفوع و نیز کنترل کیفی در کشت‌های با نژادهای پروبایوتیک باشند.

بررسی گسترده‌تر بیفیدوباکتریوم در فلور میکروبی روده در کشور، تعیین نقش‌های فیزیولوژیک، مکانیسم‌های اثر و ارتقاء سلامت در بدن با خوراندن پروبایوتیک‌ها به انسان به خصوص با مطالعه روی افرادی که در معرض خطر سرطان روده قرار دارند، انجام مطالعاتی برای به کارگیری بیفیدوباکتریوم‌ها در فرآورده‌های لبنی در ایران، ایجاد تغییرات ژنتیکی در بیفیدوباکتریوم‌ها برای افزایش رشد و ماندگاری در شیر، فراهم آوردن بستری برای کار همه جانبه در خصوص بیفیدوباکتریوم‌ها با تشکیل تیمی قوی از متخصصین بیولوژی، میکروبیولوژی، تغذیه و تکنولوژیست‌ها در بخش صنایع غذایی در کشور از جمله پیشنهاداتی است که برای کارهای آینده ارائه می‌شود.

تقدیر و تشکر

از همکاری‌های جناب آقای مهندس علی‌گل موحد، انستیتوی ملی علوم و تحقیقات کانادا (INRS-Institut,Armand-Frappier,Pointe-Claire, Canada)، آزمایشگاه تشخیص طبی پاسارگاد مشهد، پژوهشکده بوعلی مشهد و سرکار خانم سهیلا مشکوری سپاسگزاری می‌نماید.

Summary

Identification of *Bifidobacterium* Strains Isolated from Fecal Samples of Some Iranian Subjects Using 16SrRNA Gene Sequence Analysis and PCR-based Gene Specific Primers

Khomeiri M., MSc.[1], Mortazavi S.A., PhD[2]., Ghoddusi H.B., PhD[3]., Khamessan A., PhD[4]., Ahmad D., PhD[5]., and Shahidi F., PhD.[3]

1. PhD. Student of Food Science and Technology, 2. Professor, 3. Associate Professor, Food Science and Technology Department, Agriculturl School, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran. 4. Member of Animal Science Research Institute, Karaj, Iran 5. Faculty Member of INRS, Canada

For the first time in Iran 40 strains of Bifidobacterium were isolated from feces of Iranian subjects. By using phenotypic tests, 18 isolates were identified as Bifidobacterium longum, 10 as Bifidobacterium bifidum and one as Bifidobacterium catenolatum. In order to validate these results and also to identify other isolates that had not been identified by phenotypic tests, two methods of PCR with genus-specific primers of Bif164f and Bif601r and 16SrRNA gene sequence analysis were applied. Results of PCR confirmed the obtained phenotypic identifications. Moreover by this method the 8 remaining strains were identified as Bifidobacterium species. Using sequencing 16SrRNA gene, 5 B. longum strains were identified that had different fermentation pattern from B. longum. Some new ribose negative Bifidobacterium longum strains were also identified. The obtained results present new strains of Bifidobacterium longum.

Key Words: *Bifidobacterium, 16S rRNA, PCR, Iranian strains, Bif 164f, Bif 601r, Identification*

Journal of Kerman University of Medical Sciences,2005; 12(1): 21-31

منابع

۱. خمیری، مرتضی؛ قدوسی، حمید؛ مرتضوی، سیدعلی؛ خامسان، علی؛ احمد، درخشان و شهیدی، فخری. جداسازی، شناسایی و بررسی چگونگی توزیع نژادهای بیفیدوباکتریوم در برخی از افراد ایرانی. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان (زیر چاپ).

2. Arunachalam KD. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. *Nutrition Research* 1999; 19(10): 1559-1597.
3. Ausubel F.M, Brent R, Kingston R.E, Moore D.D, Seidman J.G, Smith J.A and Struhl K (eds). Current Protocols in Molecular Biology. Vol 1., John Wiley & Sons, 1998;.
4. Beerens H. An elective and selective isolation medium for Bifidobacterium spp. *Letters in Applied Microbiology* 1990; 11: 155-157.
5. Bernhard AE and Field KG. Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(4): 1587–1594.
6. Briedis DJ, Khamessan A, McLaughlin RW, Vali H, Panaritou M, and Chan EC. Isolation of Campylobacter fetus subsp. fetus from a Patient with Cellulitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40(12): 4792–4796.
7. Fooks LJ, Fuller R and Gibson GR. Prebiotics, probiotics, and human gut microbiology. *Int Dairy Journal* 1999; 9(11): 53-61.
8. *Fukushima Y, Kawata Y, Hara H, Terada A and Mitsuoka T. Effect of a probiotic formula on*

intestinal immunoglobulin A production in healthy children. Int J Food Microbiol *1998; 42(1-2): 39-44.*

9. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66(5): 365-378.
10. *Gibson GR and Wang X. Inhibitory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria*. J Appl Bacteriol *1994; 77(4): 412–420.*
11. Gomes A.M.P and Malcata F.X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology* 1999; 10: 139-157.
12. Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U and Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 85-101.
13. Kaufmann P, Pfefferkorn A, Teuber M and Meile L. Identification and quantification of Bifdobacterium species isolated from food with genus-specific 16S rRNA-targeted probes by colony hybridization and PCR. *Appl. Environ Microbiol* 1997; 63(4): 1268-1273.
14. Klein G, Pack A, Bonaparte C and Reuter G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 1998; 41(2): 103-125.
15. Langendijk PS, Schut F, Jansen GJ, *et al.* Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA targeted probes and its application in fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61(8): 3069-3075.
16. Matsuki T, Watanabe K, Tanaka R and Oyaizu H. Rapid identification of human intestinal bifdobacteria by 16S rRNA-targeted species and group-specific primers. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 167(2): 113-121.
17. Matsuki T,Watanabe K, Fujimoto *J, et al.* Development of 16S rRNA-Gene-targeted Group-Specific Primers for the Detection and Identification of Predominant Bacteria in Human Feces. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68(11): 5445–5451.
18. Mitsuoka T. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 1984; 3(1): 11-28.
19. *Pereira DI and Gibson GR. Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut.* Appl Environ Microbiol *2002; 68(9): 4689-4693.*
20. *Rafter J. Probiotics and colon cancer.* Best Pract Res Clin Gastroenterol *2003; 17(5): 849–859.*
21. *Roy D, Sirois S and Vincent D. Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis.* Curr Microbiol *2001; 42(4): 282-289*
22. Roy D and Ward P. Evaluation of rapid methods for differentiation of Bifidobacterium species. *Journal of Applied Bacteriology* 1990; 69: 739-749.
23. Satokari RM, Vaughan EE, Akkermans AD, Saarela M and deVos WM. Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(2): 504–513.
24. Scardovi V. Genus Bifdobacterium Orla-Jensen, 1924. In: Krieg NR and Holt JG(Eds.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 1, 1984; PP 1418-1434.
25. Solga SF. Probiotics can treat hepatic encephalopathy. *Med Hypotheses* 2003; 61(2): 307–313.

26. Tamime AY, Marshall VM and Robinson RK. Microbiological and technological aspects of milks fermented by bifidobacteria rev. 1995; *J Dairy Res* 1995; 62(1): 151-187.

27. Tilsala-Timisiarvi A and Alatossava T. Development of oligonucleotide primers from the 16S-23S rRNA intergenic sequences for identifying different dairy and probiotic lactic acid bacteria by PCR. *Int J Food Microbiol* 1997; 35(1): 49-56.

28. Venema K and Maathuis AJ. A PCR-based method for identification of bifidobacteria from the human alimentary tract at the species level. *FEMS Microbiol Lett* 2003; 224(1): 143-149.

29. Zavaglia A.G, deUrraza P and DeAntoni G. Characterization of Bifidobacterium Strains Using Box Primers. *Anaerobe* 2000; 6: 169-177.