جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

۳ و ۴ اسفند ماه ۱۳۹۰
پژوهشکده کاربرد پرتوها (یزد)
پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای
پژوهشکده کاربرد پرتوها
هجدهمین کنفرانس هسته‌ای ایران
Nuclear Society of Iran
18th Iranian's Nuclear Conference
22-23 February , 2012
Nuclear Science and Technology Research Institute
Radiation Applications Research School
18th Iranian's Nuclear Conference

اثر پرتوتابی الکترون بر اتصال باکتری‌های تجزیه کننده الیاف باگاس نیشکر

شورنگ، پروین* (۱) – حلاجیان، محمدطاهر(۱)– معتمدی سده، فرحناز(۱) – گلی ولوکلایی ، داود(۲)

[۱] سازمان انرژی اتمی، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی پزشکی و صنعتی

[۲] دانشگاه پیام نور تهران، دانشکده علوم پایه و کشاورزی، گروه کشاورزی

چکیده:

به‌منظور مطالعه اثر پرتوتابی الکترون بر اتصال باکتری‌های تجزیه کننده الیاف، نمونه‌های باگاس نیشکر با دزهای صفر (شاهد)، ۲۵۰و ۵۰۰ کیلوگری پرتو الکترون پرتوتابی شدند. نمونه‌های باگاس نیشکر قبل و بعد از پرتوتابی به‌مدت ۳و ۶ ساعت در شکمبهٔ چهار رأس گوسفند نر بالغ دارای فیستولا انکوباسیون شد. نمونه‌های انکوباسیون شده جهت استخراج DNA آماده سازی و بررسی نتایج پس از بارگذاری محصول PCR بر روی ژل آگارز انجام شد. نتایج نشان داد که دز ۵۰۰ کیلوگری پرتو الکترون سبب افزایش اتصال میکروبی در زمان انکوباسیون ۳ ساعت شد.

کلمات کلیدی: *پرتو الکترون، اتصال میکروبی، باکتری تجزیه‌کننده الیاف، باگاس نیشکر*

مقدمه :

باگاس نیشکر یکی از پسماندهای استخراج قند نیشکر است که به‌عنوان ماده خشبی در تغذیه دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به تولید انبوه باگاس به‌عنوان فرآورده‌های فرعی کارخانه قند و شکر و تقاضا جهت استفاده از آن در تغذیه دام به‌عنوان یک خوراک ارزان توجه به روش‌های مختلف عمل‌آوری به‌منظور بهبود ارزش غذایی آن جلب شده است. پرتوتابی الکترون یکی از روش‌های عمل‌آوری فیزیکی غیرحرارتی برای افزایش تجزیه‌پذیری دیواره سلولی مواد خشبی است [۱]. شورنگ و همکاران [۱] گزارش کردند که پرتوتابی الکترون سبب افزایش بخش کندتجزیه دیواره سلولی باگاس نیشکر شد و با افزایش دز پرتوتابی افزایش خطی در تجزیه‌پذیری مؤثر دیواره سلولی مشاهده شد. افزایش تجزیه‌پذیری دیواره سلولی می‌تواند مربوط به افزایش تجمع باکتری‌های تجزیه کننده الیاف بر روی ذرات الیافی باگاس نیشکر باشد. این فراسنجه با استفاده از واکنش زنجیره پلیمراز و الکتروفورز افقی قابل بررسی است [۲]. هدف اصلی این پژوهش مطالعه اثر پرتو الکترون بر زمان اتصال باکتری‌های تجزیه‌کننده الیاف باگاس نیشکر در شکمبه با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمراز بود.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

روش کار :

نحوه پرتوتابی– نمونه‌های باگاس نیشکر در مرکز پرتو فرآیند یزد وابسته به سازمان انرژی اتمی ایران انجام شد. شتاب دهنده الکترونی که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، رودوترون مدل TT 220 بود. نمونه های باگاس نیشکر با پرتو الکترونی ۱۰ مگا الکترون ولت و جریان باریکه الکترونی ۶ میلی آمپر با دزهای ۲۵۰ و ۵۰۰ کیلوگری پرتوتابی شدند. روش پرتوتابی به‌صورت یک طرفه بود و برای تأمین دزهای مورد نیاز برای هر دز، نمونه ها چند بار در معرض پرتوهای الکترون قرار گرفتند. به منظور دقت در دز داده شده به نمونه ها، اندازه گیری دز با استفاده از کالری‌متر پلی‌استایرن که یک دزیمتر مرجع می‌باشد، صورت گرفت.

انکوباسیون نمونه در شکمبه– نمونه‌های باگاس نیشکر قبل و بعد از پرتوتابی به‌مدت ۳ و ۶ ساعت در داخل کیسه‌های نایلونی[1] در شکمبه ۴ رأس گوسفند نر بالغ انکوباسیون شد. پس از طی زمان انکوباسیون، نمونه‌ها را از شکمبه خارج نموده و درون فالکون ۵۰ ریخته و ۹ سی سی محلول بافر فسفات استریل با pH=۷/۴ روی آن ریخته و جهت آماده سازی برای استخراج DNA به آزمایشگاه مولکولی منتقل شد.

آماده‌سازی و استخراج DNA – ابتدا با استفاده از پمپ خلاء و کاغذ صافی واتمن شماره ۱، محتویات داخل فالکون را روی کاغذ صافی قرار داده و با محلول بافر فسفات استریل شستشو داده شد. نمونه صاف شده داخل ارلن (حاوی باکتری) در یک فالکون ۱۵ ریخته شد و به‌همراه ۴ عدد مهره شیشه‌ای به‌مدت ۳ دقیقه ورتکس و هموژنیزه شد. محتویات داخل فالکون، برای جدا کردن ذرات جامد، به‌مدت ۱ دقیقه با شدت ۷۰۰×g سانتریفیوژ شد. بخش رویی هر نمونه جمع آوری و در داخل ۵ میکروتیوپ ۱/۵ سی سی به مدت ۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن بخش رویی، به منظور شستشو با بافر، به هر میکروتیوپ ۶۸۰ میکرولیتر بافر فسفات افزوده و پس از پیپتینگ و کمی ورتکس کردن، به مدت ۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن بخش رویی به هر میکروتیوپ مجدداً ۲۸۰ میکرولیتر بافر فسفات افزوده و پس از پیپتینگ و کمی ورتکس کردن، محتویات پنج میکروتیوپ مربوط به هر نمونه درون یک میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری با هم مخلوط و به مدت ۵ دقیقه با شدت ۱۲۰۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از دور ریختن مایع رویی، پلت باقی مانده تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه نگهداری شد.

محصول مرحله آماده سازی نمونه ها که در میکروتیوپ ۱/۵ میلی لیتری قرار دارد با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات استریل به مدت ۱۰ دقیقه با شدت ۴۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. به پلت باقیمانده ۱۰۰ میکرولیتر محلول G+ Prelysis buffer و ۲۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم برای تخریب دیواره سلولی و متلاشی کردن

[1] Nylon bag

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

سلول باکتریایی اضافه شد. این مخلوط ورتکس شد و به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس ۱۰µl آنزیم Ributinase به میکروتیوب اضافه شد و بعد از ورتکس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد انکوباسیون شد. برای افزایش کیفیت کار هر ۵ دقیقه نمونه ها از بن ماری خارج و ۵ ثانیه ورتکس می شد. استخراج DNA با استفاده از کیت تجاری Gram Positive bacterial culture طبق دستورالعمل انجام شد. برای اطمینان از اینکه استخراج DNA به خوبی انجام شده است، DNA استخراج شده نمونه ها بر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید بارگذاری شد و با مشاهده نتایج از کیفیت بالای استخراج و خالص سازی اطمینان حاصل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز- برای شناسایی ۳ نوع باکتری تجزیه‌کننده الیاف شامل *فیبروباکتر سوکسینوژنز*، *رومینوکوکوس فلاوسنس* و *رومینوکوکوس آلبوس* از پرایمرهایی با توالی های گزارش شده در منابع مختلف (جدول ۱) استفاده شد.

جدول ۱: مشخصات پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه

پرایمر	باکتری هدف	جهت	توالی (5`→3`)
Ra-f	*رومینوکوکوس آلبوس*	رفت	CCCTAAAAGCAGTCTTAGTTCG(22)
Ra-r		برگشت	CCTCCTTGCGGTTAGAACA(19)
Fs-f	*فیبروباکتر سوکسینوژنز*	رفت	GGTATGGGATGAGCTTGC(18)
Fs-r		برگشت	GCCTGCCCCTGAACTATC(18)
Rf-f	*رومینوکوکوس فلاوسنس*	رفت	GGACGATAATGACGGTACTT(20)
Rf-r		برگشت	GCAATCYGAACTGGGACAAT(20)

واکنش ها در حجم ۲۵ میکرولیتر انجام شدند. پرایمر پس از رقیق سازی با آب مقطر طبق جدول مشخصات آن استفاده شد. اجزای تشکیل دهنده واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده در این مطالعه به شرح جدول ۲ بود. به منظور جلوگیری از اتلاف وقت و خطای برداشت مقادیر بسیار کم اجزاء، یک پیش مخلوط[1] تهیه و استفاده می شد. در این مطالعه از دستگاه PCR مدل Bio-Rad's MJ Mini استفاده شد. جزئیات چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمراز در جدول ۳ گزارش شده است.

بارگذاری محصول PCR بر روی ژل آگارز و مشاهده نتایج- برای تهیه ژل ابتدا محلول 5X TAE در لیتر حاوی ۲۴/۲ گرم تریس باز، ۵/۷۱ میلی لیتر اسید استیک گلاسیال و ۱۰ میلی لیتر EDTA (۰/۵ M) تهیه و

[1] Master Mix

برای هر بار بارگذاری نمونه محلول 1X TAE تهیه شد. مقدار ۷۰ سی سی از محلول رقیق شده را درون ارلن ریخته و ۱/۰۵ گرم آگارز و ۵ میکرولیتر اتیدیوم بروماید اضافه و روی هیتر تا مرحله جوش حرارت داده و پس از خنک شدن در کاست ریخته و شانه گذاری شد. پس از بستن ژل شانه را خارج نموده و ژل را در تانک قرار داده، نمونه همراه Loading dye به آرامی در چاهک قرار داده شد. در یک چاهک هم مارکر وزن مولکولی SM0333 Fermentas (10000 – 100 bp) DNA Ladder قرار گرفت. تانک به دستگاه Power supply با قدرت ۱۰۰ ولت بمدت ۹۰ دقیقه متصل بود. پس از اتمام الکتروفورز، ژل از دستگاه خارج شد. برای رنگ آمیزی ژل ابتدا استوک اتیدیوم بروماید ۱۰ mg/ml تهیه شد. ۵ µl از استوک فوق را در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل کرده و در یک ظرف پلاستیکی در دار قرار داده شد، ژل به مدت ۱۰ دقیقه در محلول رنگ آمیزی شیک شد، سپس به یک ظرف دیگر حاوی آب مقطر برای شستشو انتقال داده شد. ژل رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید زیر نور ماورای بنفش دستگاه Gel Doc عکسبرداری شد.

جدول ۲: اجزای تشکیل دهنده واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده در این مطالعه

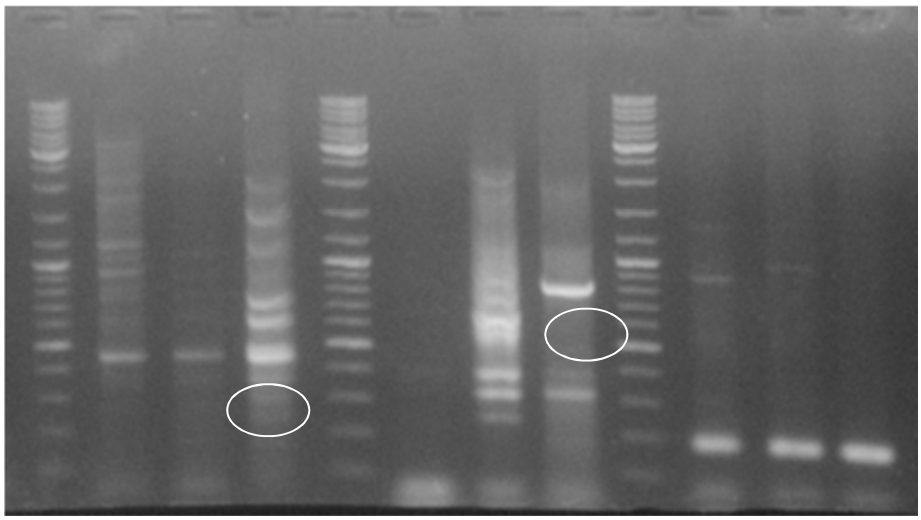
اجزای واکنش	مقدار (میکرولیتر)
dNTPs	۰/۵
$MgCl_2$	۱
پرایمر رفت	۱
پرایمر برگشت	۱
PCR Buffer	۲/۵
آنزیم Taq DNA Polymerase	۰/۵
آب دوبار تقطیر	۱۶/۵
نمونه DNA	۲
جمع	۲۵

جدول۳ : جزئیات چرخه های واکنش زنجیره ای پلیمراز مورد استفاده در این مطالعه

مرحله چرخه PCR	دما (درجه سانتیگراد)	زمان (ثانیه)	تعداد چرخه
Hot Start	۹۴	۱۲۰	
Denaturing	۹۴	۶۰	۳۰
Annealing	۵۵/۳ – ۵۹/۴	۶۰	
Extension	۷۲	۱۲۰	
Final Extension	۷۲	۳۰۰	

نتایج :

نتایج مشاهدات تفاوتی بین زمان انکوباسیون ۳ و ۶ ساعت از نظر اتصال باکتری‌های تجزیه‌کننده الیاف به ذرات باگاس قبل و بعد از پرتوتابی نشان نداد. استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی تأثیر پرتوتابی بر اتصال باکتری‌های *فیبروباکتر سوکسینوژنز* (باند اختصاصی ۴۵۰bp) و *رومینوکوکوس فلاوسنس* (باند اختصاصی ۸۰۰bp) در زمان انکوباسیون ۳ ساعت را نشان داد (شکل۱). اتصال باکتری *رومینوکوکوس فلاوسنس* به ذرات باگاس پرتوتابی نشده مشاهده نشد ولی با افزایش دز پرتوتابی از ۲۵۰ به ۵۰۰ کیلوگری اتصال باکتری افزایش یافته است. پرتوتابی بر اتصال باکتری *رومینوکوکوس آلبوس* (باند اختصاصی ۲۰۰bp) بی‌تأثیر بود.



کیلوگری ۰ ۲۵۰ ۵۰۰ ۰ ۲۵۰ ۵۰۰ ۰ ۲۵۰ ۵۰۰

فیبروباکتر سوکسینوژنز *رومینوکوکوس فلاوسنس* *رومینوکوکوس آلبوس*

شکل۱ : نتایج الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز با استفاده از پرایمر اختصاصی باکتری‌های تجزیه‌کننده الیاف در زمان انکوباسیون ۳ ساعت

بحث ونتیجه‌گیری :

باکتری‌های *فیبروباکتر سوکسینوژنز*، *رومینوکوکوس فلاوسنس* و *رومینوکوکوس آلبوس* از جمله باکتری‌های غالب تجزیه‌کننده الیاف در شکمبه نشخوارکنندگان است که جمعیت و فعالیت آنها در بسیاری مطالعات با استفاده از روش‌های میکروبی و مولکولی بررسی شده است[۳]. در این مطالعه نیز استفاده از واکنش زنجیره-ای پلیمراز با استفاده از پرایمر اختصاصی برای شناسایی باکتری‌های تجزیه‌کننده الیاف در شکمبه گوسفند موفقیت آمیز بود.

اتصال میکروبی اولین مرحله در تجزیه دیواره سلولی مواد خشبی است. *فیبروباکتر سوکسینوژن* یکی از باکتری های تجزیه کننده دیواره سلولی بوده که فعالیت آن بستگی به اتصال سلولاز خارج سلولی متصل به سلول باکتری دارد. رومینوکوکوس ها نیز مانند *فیبروباکترسوکسینوژن* به الیاف سلولز می چسبند و کلنی تشکیل می‌دهد. افزایش اتصال میکروبی در زمان کوتاه انکوباسیون سبب کاهش فاز تأخیر تجزیه سلولز و افزایش تجزیه‌پذیری دیواره سلولی در شکمبه می‌شود[۴]. طبق نتایج به دست آمده، افزایش تجزیه‌پذیری دیواره سلولی باگاس می‌تواند به‌وسیله افزایش تجمع باکتری‌های تجزیه کننده الیاف بر روی ذرات باگاس نیشکر توضیح داده شود.

مراجع :

۱) شورنگ، پ.، ع. مجدآبادی، ع. ا. صادقی و ح. زرگران اصفهانی. " اثرات پرتو الکترون بر ترکیبات شیمیایی و روند تجزیه‌پذیری ماده خشک و دیواره سلولی باگاس نیشکر". همایش ملی پسماندهای کشاورزی و منابع طبیعی: چالش‌ها و راهکارها. پارک علم و فناوری گیلان. صفحه ۶۸ (۱۳۹۰).

2) S. Koike, and Y. Kobayashi. “Development and use of PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*”. FEMS Microbiol. Lett. 204:361–366 (2001).

3) C.W. Forsberg, K.J. Cheng, B.A. White. “Polysaccaride degradationin the rumen and large intestine”. In: Gastrointestinal Microbiology, R.I. Mackie and B.A. White (Eds.), Chapman and Hall, New York, pp. 319-379 (1997).

4) P. H. Nielsen, P. L. Bjerg, P. Nielsen,P. Smith, and T. H. Christensen. “In Situ and Laboratory Determined First-Order Degradation Rate Constants of Specific Organic Compounds in an Aerobic Aquifer”. Environmental Science & Technology 30 (1), 31-37 (1996).