**مجله ایمنی زیستی**

**دوره ۱۶، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲**

**ISSN 2716-9804 الکترونیکی، ISSN 2717-0632 چاپی**

# بررسی تنوع اهداف فاژی و پلاسمیدی سیستم CRISPR/Cas در جنس *لوکونوستوک* با استفاده از رویکرد *In-silico*

نوع مقاله: پژوهشی

**سارا غفاریان[1*]، بهمن پناهی[2]**

۱-استادیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه ژنومیکس، پژوهشکده بیوتکنولوژی شمال غرب و غرب کشور(AREEO)، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRII)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تبریز، ایران

s.ghaffarian@azaruniv.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۲۴، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۶/۱۲

صفحه ۳۶-۱۵

## چکیده

باکتری‌های جنس *Leuconostoc* جزئی از میکروفلور طبیعی اغلب مزارع کشاورزی و محصولات تخمیری هستند. آلودگی توسط انواع دی.ان.ای مهاجم خارجی منجر به شکست فرآیند تخمیر می‌شود. سیستم CRISPR/Cas از اجزای اصلی سیستم ایمنی باکتری‌ها است. در این مطالعه مسیر تکاملی سویه‌های مختلف جنس *لوکونوستوک* بر مبنای وقایع ترکیب، حذف و اضافه‌شدگی توالی‌های فاصله‌انداز تحت شرایط فشار انتخابی ارزیابی و تنوع فاژها و پلاسمیدهای مهاجم هدف قرار داده شده توسط سیستم CRISPR/Cas سویه‌های جنس *Leuconostoc* مطالعه شد. بیشترین تشابه از نظر ترکیب توالی تشکیل‌دهنده فاصله‌اندازها و وقایع اضافه‌شدگی و حذف در فاصله‌اندازها در دو گونه *Leuconostoc pseudomesenteroides* و *Leuconostoc gelidum* مشاهده شد. تعداد ۴۵ فاصله‌انداز از سویه AMKR21 گونه *L. gelidum* فاژ *Alteromonas* phage JH01 را هدف قرار دادند که بیشترین میزان تطابق با فاژها بود. همچنین بیشترین تعداد انواع فاژ دارای تطابق، مربوط به فاژهای *Escherchia* phage بود. در مورد هدف‌گیری پلاسمیدهای مهاجم، ۱۷۷ مورد هدف‌گیری پلاسمیدهایی از *Leuconostoc citreum* توسط سویه NBRC113246 گونه *L. gelidum* شناسایی شد که بیشترین میزان مطابقت در بین سویه‌های مختلف بود. نتایج این مطالعه اهمیت سیستم‌های ایمنی تطبیقی باکتریایی در پایداری در محیط‌های حاوی باکتریوفاژ و نیز بهره‌برداری از این اطلاعات در تعریف فرمولاسیون‌های کاربردی را آشکار کرد.

**واژه‌های کلیدی**: جنس *Leuconostoc*، سیستم ایمنی تطبیقی، تنوع ژنتیکی، تکامل.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

## مقدمه

باکتری‌های جنس *لوکونوستوک* (*Leuconostoc*) برای اولین بار توسط Cienkowski (۱۸۷۸) جداسازی شدند (Hucker et al., 1930). این باکتری‌ها به‌طور سنتی در ارتباط با مواد گیاهی، سبزیجات و نوشیدنی‌های تخمیری، شیر، محصولات روزانه و گوشت یافت می‌شود و جزئی از فلور میکروسکوپی طبیعی اغلب مزارع کشاورزی هستند (Jeon et al. 2017; Chen et al. 2020). اعضای *Leuconostoc* spp. به دلیل قابلیت تولید لاکتیک اسید و دی‌استیل اغلب در تولید غذاهای تخمیری کاربرد دارند. *لوکونوستوک*‌ها یک کوکوس غیرپروتئولیتیک، گرم مثبت، کاتالاز منفی، فاقد سیتوکروم و متحمل به اسید، و غیربیماریزا با دمای بهینه‌ی رشد ۱۸ تا ۲۵ درجه سلسیوس هستند (lonvaud-funnel et al. 1999). این باکتری‌ها از طریق تخمیر کربوهیدارت‌ها، لاکتیک اسید تولید می‌کنند (Thunell. 1995).

ژنوم *لوکونوستوک* به طول ۲۰۳۸۳۹۶ جفت باز دارای آرایش دایره‌ای است. محتوای GC آن بین ۳۷ تا ۴۰ درصد گزارش شده است. گونه‌هایی از *لوکونوستوک* شناسایی شده‌اند که دارای پلاسمیدهایی با طول ۸۰ تا ۱/۳ مگاباز هستند و ژن‌های رمزکننده باکتریوسین (bacteriocin) و متابولیسم سیترات را رمز می‌کنند. *Leuconostoc carnosum* باکتریوسین تولید می‌کند و به همین دلیل قادر به مهار رشد سایر باکتری‌ها (حتی انواع نزدیک) است و بنابراین قابلیت استفاده به‌عنوان نگهدارنده‌ی زیستی در محصولات لبنی و گوشتی را دارد (Lonvaud-Funel. 1999).

فاژها به باکتری‌ها حمله می‌کنند و در چرخه لیتیک سرعت ماشین سلولی میزبان را به‌منظور تکثیر خود بالا می‌برند که در نهایت منجر به مرگ میزبان و کاهش تعداد باکتری‌های زنده می‌شوند. در نهایت این امر منجر به شکست فرآیند تخمیر می‌شود (Nami et al. 2021; Sadeghi et al. 2022). از سایر مضرات لیز باکتری‌ها توسط فاژ می‌توان به می توان به کاهش اسیدی شدن و کاهش توسعه بافت و طعم محصول اشاره کرد (Atamer et al. 2011; Nami et al. 2020).

سیستم کریسپر با مکانیسم تداخل و با استفاده از پروتئین‌های اختصاصی و mRNA در مقابل فاژها و پلاسمیدها مقاومت ایجاد کرده، و منجر به سازگاری بالای باکتری برای مقابله با محیط‌های پیچیده می‌شوند (Rostampour et al. 2022). مطالعات نشان داده‌اند ۴۰ درصد باکتری‌ها دارای سیستم CRISPR/Cas هستند، به‌طور عمده این سیستم‌ها روی کروموزوم‌ها و نه پلاسمیدها جای دارند زیرا سیستم ایمنی باکتری در صورت حذف پلاسمید آسیب خواهد دید. سیستم CRISPR/Cas یک دفاع تطبیقی در مقابل دی.ان.ای مهاجم خارجی ایجاد می‌کند. فرآیند تطبیقی سیستم



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

CRISPR در سه مرحله شامل سازگاری، بیان و تداخل انجام می‌شود (Lillestol. 2006). زمانیکه باکتری توسط فاژ آلوده شود، در مرحله سازگاری قطعاتی از فاژ یا دیگر دی.ان.ای‌های مهاجم خارجی کپی شده و در آرایه‌های CRISPR ژنوم باکتریایی درج می‌شوند. سپس، آرایه CRISPR رونویسی و در توالی‌های تکراری پردازش می‌شود، تا crRNA (CRISPR RNA) بالغ را که با tracer RNA دوبلکس تشکیل می‌دهد، ایجاد کند (Makarova et al. 2011). در طول مرحله نهایی یعنی تداخل، دوبلکس تشکیل شده در مرحله قبل با Cas9 تعامل کرده، دی.ان.اِ حاضر را برای یک توالی PAM بررسی می‌کند، به پروتواسپیسر (protospacer) متصل می‌شود و آن را برش می‌دهد (Riesenberg et al. 2022). پروتئین‌های همراه Cas ذکرشده یک واحد مداخله‌گر یا تاثیرگذار تشکیل می‌دهند که در شناسایی هدف و برش اسیدهای نوکلئوئیک در سیستم CRISPR درگیر است (Panahi et al. 2022).

مسیر تکاملی سویه‌های مختلف باکتریایی تحت فشار تکاملی وارده از دی.ان.ای مهاجم خارجی نظیر پلاسمیدها و فاژها، با آنالیز وقایع درج و حذف شدگی توالی‌های فاصله‌انداز (Spacer) می‌تواند مورد مطالعه قرار گیرد. همچنین بررسی شباهت بین فاصله‌اندازهای سیستم CRISPR با عناصر دی.ان.ای خارجی شامل توالی‌های فاژی و پلاسمیدی در دسترس، می‌توانند در آشکار شدن اطلاعات سیستم‌های ایمنی سویه‌ها، دستیابی به سوابق تهدیدات و چالش‌های مواجه شده و همچنین شکست دی.ان.ای خارجی سودمند باشند.

مطالعات بسیاری به بررسی تنوع سیستم‌های CRISPR/Cas، ویژگی‌های آنها و نیز اهداف بالقوه فاژی و پلاسمیدی این سیستم‌ها پرداخته‌اند. به‌طور مثال این سیستم‌ها در *Lactobacillus brevis* (Panahi et al. 2022)، *Clostridium perfringens* (Long et al. 2019)، *Lactobacillus casei* (Yang et al., 2020)، *Bifidobacterium pseudocatenulatum* (Wang et al. 2020) و *Bifidobacterium* (Briner et al. 2015) مورد مطالعه قرار گرفته است.

نقش و اهمیت سیستم CRISPR/Cas در بسیاری از میکروارگانیسم‌ها بخوبی شناخته و تشریح شده است، اما جای یک تجزیه همه جانبه بر روی نقش این سیستم‌ها در پاسخ باکتری‌های *لوکونوستوک* به دی.ان.ای‌های خارجی مهاجم و نیز الگو و تنوع فاژی و پلاسمیدی هدف قرار داده شده توسط سیستم‌های CRISPR/Cas سویه‌های این جنس خالی است. همچنین بر اساس بررسی منابع انجام شده، مطالعه‌ای در زمینه‌ی مسیر تکاملی سویه‌های مختلف باکتریایی جنس



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

*لوکونوستوک* انجام نشده است. فاصله‌اندازها برای شناسایی همولوژی توالی‌های دی.ان.ای خارجی حاضر در داده‌های ژنومی و متاژنومی جهت تعیین نقش عملکردی پتانسیلی که ممکن است این سیستم‌های ایمنی ایفا کنند مورد آنالیز قرار می‌گیرند. بررسی فاصله‌اندازهای سیستم‌های CRISPR/Cas باکتری‌های این جنس می‌تواند دیدگاهی به تاریخچه فیلوژنتیکی (phylogenetic) و اهمیت زیستی این سیستم‌ها ایجاد کند. تجزیه بیوانفورماتیکی سیستم‌های CRISPR/Cas برای دستیابی به پتانسیل تکامل در پیش‌بینی ایمنی ضروری است. همچنین دارای اهمیت بسیاری در صنایع مختلف مرتبط با باکتری‌ها است. بنابراین، این مطالعه با هدف بررسی مسیر تکاملی سویه‌های مختلف باکتریایی از جنس *لوکونوستوک* و همچنین شباهت بین فاصله‌اندازهای سیستم CRISPR/cas سویه‌های این جنس با عناصر دی.ان.ای خارجی شامل توالی‌های فاژی و پلاسمیدی در دسترس به‌منظور درک مکانیسم‌های دفاعی تطبیقی در مقابل عوامل مهاجم با استفاده از رویکرد مبتنی‌بر ژنومیکس انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه اطلاعات مفیدی در مورد مکانیسم مولکولی گونه‌های مختلف *استوباکتر* (*Acetobacter*) در مقابل آلودگی های فاژی و پلاسمیدی ارائه می‌کند. این اطلاعات ممکن است بستری برای غربال بعدی و توسعه *استوباکتر*های تجاری مقاوم به آلودگی فاژی فراهم کند. همچنین نتایج این مطالعه تکامل همزمان میزبان و فاژهای آن را آشکار می‌کند که می‌تواند دیدی تازه نسبت به طبقه‌بندی این گونه‌ها فراهم کند.

## مواد و روش‌ها

### استخراج توالی و شناسایی سیستم‌های CRISPR/Cas

توالی ژنوم سویه‌های ۱۸ گونه شناسایی شده‌ی جنس *لوکونوستوک* به‌صورت جداگانه و با فرمت FASTA از سایت National Center for Biotechnology (NCBI) به آدرس https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ دانلود شد. فایل دانلود شده را از حالت فشرده خارج کرده و با بارگذاری فایل حاصل در منوی Prediction از سایت CRISPRone به آدرس https://omics.informatics.indiana.edu/CRISPRone/denovo.php، اطلاعات مربوط به تمامی سویه‌ها از جمله نوع سیستم CRISPR، انواع پروتئین‌های Cas هر سیستم، و تعداد و توالی تکرارها و فاصله‌اندازها به دست آمد.

### شناسایی اهداف فاژی و پلاسمیدی

به‌منظور شناسایی اهداف فاژی و پلاسمیدی سیستم‌های CRISPR/Cas شناسایی شده در سویه‌ها و گونه‌های مورد مطالعه، از رویکرد همولوژی ژنی و با استفاده از نرم‌افزار BLAST



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

استفاده شد. برای این منظور، ابتدا فایل فشرده توالی ژنومی هر سویه مستخرج از سایت NCBI به‌طور فشرده در نرم‌افزار آنلاین CRISPRCasFinder به آدرس https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/Crispr CasFinder/Index بارگذاری شد. خروجی نرم افزار را به فرمت فشرده دانلود، و از بین فایل‌های موجود در این فایل فشرده فایل Result را باز کرده، کل محتوای آن را کپی، در نرم‌افزار آنلاین CRISPRTarget به آدرس http://crispr.otago.ac.nz/CRISPRTarget/crisp r_analysis.html بارگذاری و به‌این ترتیب توالی ژنوم آپلود شده برای مطابقت با توالی‌های فاژی و ژنومی موجود در پایگاه‌های داده مورد جستجو قرار داده شد. در این مرحله توالی مرجع انواع فاژها و پلاسمیدهای شناسایی شده در پایگاه‌های داده به‌عنوان توالی هدف استفاده می‌شود. با مشخص شدن فاژها و پلاسمیدهای دارای مطابقت با ژنوم مورد مطالعه، در مرحله بعد ارزیابی، تصویرسازی و دسته‌بندی نتایج به‌دست آمده با استفاده از منوی Heat map نرم‌افزار TBtools (Chen et al., 2020) انجام شد. برای این منظور، پس از تفکیک گروه‌های مختلف فاژها و پلاسمیدهای شناسایی شده در فایل اکسل، در نرم‌افزار TBtools و از منوی Graphics، گزینه‌ی HeatMap را انتخاب کرده و محتوای فایل اکسل تهیه شده در آن وارد می‌شود. با انتخاب مقیاس لگاریتمی و الگوریتم UPGMA ، ترسیم HeatMap برای هر گروه از داده‌ها انجام شد.

**ارزیابی تکامل سیستم‌های CRISPR/Cas**

به‌منظور بررسی سیر تکاملی سیستم‌های CRISPR/Cas در جنس *لوکونوستوک*، توالی‌های فاصله‌انداز این سیستم‌ها که از خروجی نرم‌افزار آنلاین CRISPRone استخراج شده بود، در یک فایل متنی با فرمت لازم برای نرم‌افزار CRISPRVIZ تنظیم شده و بر اساس ترکیب بازی و حذف و اضافه‌شدگی در شرایط فشار انتخابی مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. به‌منظور نمایش نتایج بدست آمده، از نرم‌افزار CRISPRVIZ (Nethery and Barrangou, 2019) استفاده شد.

## نتایج و بحث

در این مطالعه مسیر تکاملی سویه‌های مختلف باکتریایی جنس *لوکونوستوک* و همچنین تکامل سیستم CRISPR این جنس در جهت ایجاد ایمنی در برابر فاژها و پلاسمیدها مورد مطالعه قرار گرفت. سویه‌های مورد مطالعه شامل ۱۲۵ سویه از گونه *L. mesenteroides*، ۴۰ سویه از گونه *L. lactis*، ۳۹ سویه از گونه *L. pseudomesenteroides*، ۳۱ سویه از گونه *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum، ۲۰ سویه



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

از گونه *L. gelidum*، ۱۹ سویه از گونه *L. carnosum*، ۷ سویه از گونه *L. suionicum*، ۵ سویه از گونه *L. inhae*، ۴ سویه از گونه *L. falkenberg*، ۴ سویه از گونه *L. fallax*، ۳ سویه از گونه *L. citreum*، ۲ سویه از گونه *L. kimchii*، ۲ سویه از گونه *L. rapi*، ۲ سویه از گونه *L. holzapfelii*، یک سویه از گونه *L. litichii*، یک سویه از گونه *L. miyukkimchii*، یک سویه از گونه *L. garlicum* و یک سویه از گونه *L. palmae* بودند.

نام و برخی مشخصات سویه‌های دارای سیستم CRISPR/Cas کامل مورد استفاده در جدول شماره ۱ ذکر شده است. سیستم CRISPR/Cas تمامی سویه‌های مورد مطالعه غیر از LMGH83 از *L. pseudomesenteroides* از نوع II-A بود. تعداد توالی‌های فاصله‌انداز در جدول ذکر شده است. تمامی سویه‌های گونه‌های *L. citreum*، *L. fallax*، L. kimchi، *L. miyukkimchii*، *L. litichii*، *L. suionicum*، *L. holzapfelii*، *L. palmae*، *L. citreum* و *L. garlicum* دارای CRISPRهایی ناقص بودند. سویه‌های ناقص وارد مطالعه نشدند و اسامی آنها در جدول ذکر نشده است.

**تعیین ژنوتیپ بر مبنای توالی فاصله‌انداز CRISPR**

مسیرهای تکاملی سویه‌های *لوکونوستوک* تحت فشار گزینشی دی.ان.ای‌های مهاجم خارجی نظیر فاژها و پلاسمیدهای مطالعه شده با استفاده از آنالیز وقایع حذف و اکتساب فاصله‌اندازها مورد مطالعه قرار گرفت. در این تجزیه فاصله‌اندازها از انواع اجدادی (راست) به فاصله‌اندازهای به‌تازگی کسب شده (چپ) مرتب شدند و هر ترکیب رنگ و شکل نشان‌دهنده‌ی یک توالی فاصله‌انداز منحصر به فرد بر مبنای توالی نوکلئوتیدی است (Yang et al. 2020). تجزیه‌ی ترکیب و وقایع حذف و اکتساب فاصله‌اندازها در شکل ۱ نشان داده شده است. فاصله‌اندازهای اجدادی در سمت راست تصویر قرار دارند.

بر مبنای داده‌های شکل ۱ مشاهده می‌شود که سویه‌های NBRC113246 و KCTC352 از گونه‌ی *L. gelidum* الگوی کاملا مشابهی از نظر ترکیب، وقایع اضافه‌شدگی و حذف از فاصله‌اندازهای دوره‌های تکاملی داشتند. همچنین سویه‌های AMKR21 و kg1-2 از این گونه شباهت بسیار بالایی داشتند. اما علاوه‌بر یک فاصله‌انداز اضافی سویه AMKR21 در مراحل ابتدایی تکامل سویه‌ها، ۳ ترکیب از حدود ۴۸ ترکیب آنها در انتهای مسیر تکاملی این دو متفاوت بود. در گونه‌ی *L. pseudomesenteroides* سویه‌های LMGTW3، LN02 و LMGTW6 الگوی کاملا مشابه داشته و سویه‌های LN12 و LMG10779 نیز با داشتن یک فاصله‌انداز اضافی در ابتدای تکامل تشابه بالایی با آنها داشتند. از این گونه سویه‌های LMGCF08، LMGCF06، LMGCF15



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

و HPK01 نیز الگوی کاملا مشابهی از نظر تمامی فاکتورهای رنگ و شکل داشتند.

سویه‌هایی با الگوی مشابه فاصله‌اندازها ممکن است در ابتدا در معرض محیط مشابه قرار گرفته و از اجداد مشترک سرچشمه گرفته باشند (Long. 2019)، بنابراین می‌توان نتیجه گرفت سویه‌های اشاره شده با الگوی مشابه دودمان مشترک داشته‌اند. به خوبی معلوم شده است که فاصله‌اندازهای اجدادی مشابه ممکن است اثبات‌کننده‌ی یک منشا مشترک باشند. بنابراین کسب فاصله‌اندازهای بعدی می‌تواند نشان‌دهنده‌ی مسیر متفاوت ادامه تکامل باشد. در نتیجه باکتری‌ها می‌توانند بر اساس فاصله‌اندازها گروه‌بندی شوند. پناهی و همکاران منبع جداسازی سویه‌ها را در ارتباط با هر زیرگروه CRISPR مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصل از این تجزیه ارتباط معنی‌داری بین سیستم‌های کریسپر و محیطی که سویه از آن جداسازی شده است وجود نداشت (Panahi et al. 2022).

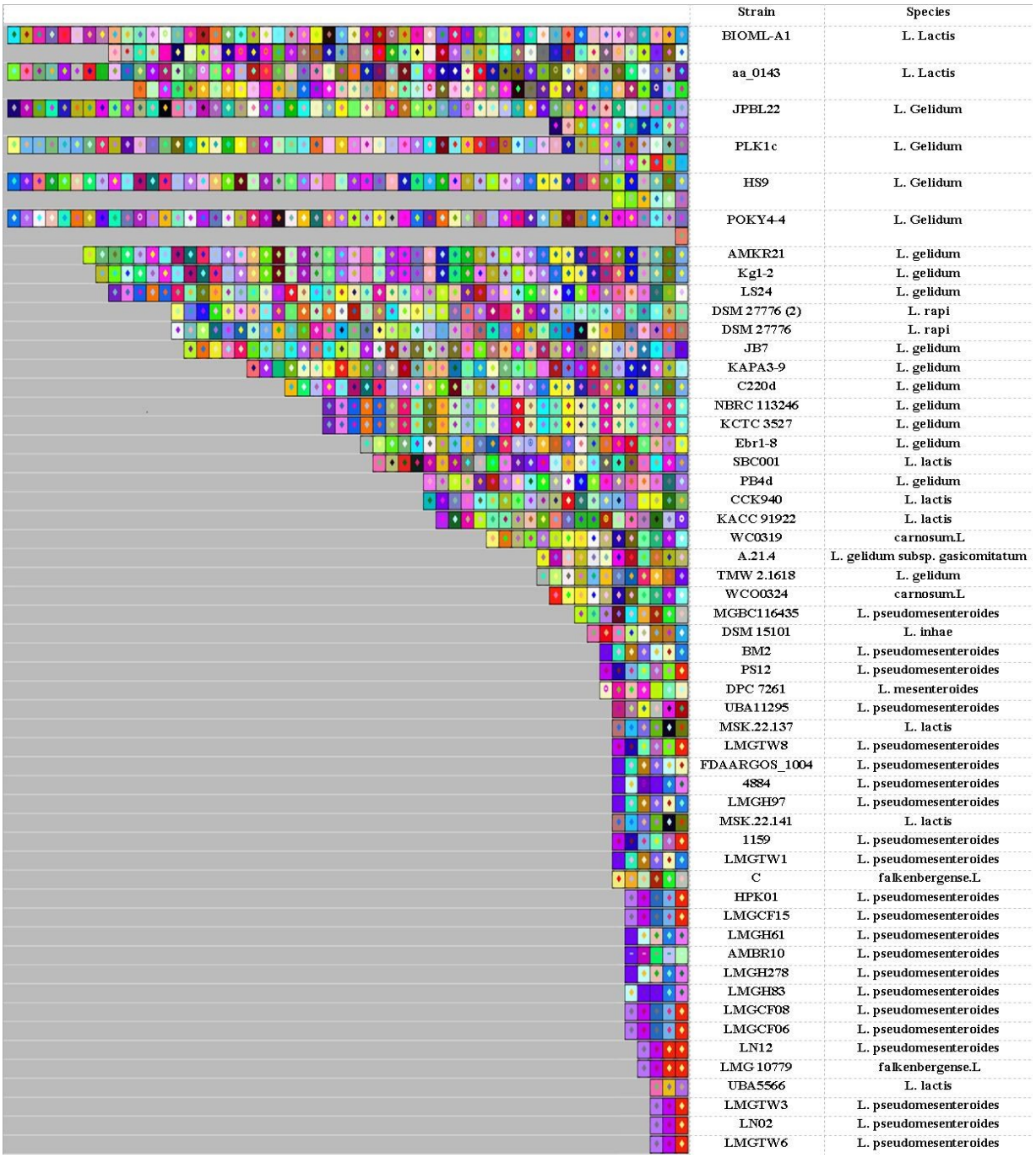
**جدول ۱**- سیستم‌های CRISPR/Cas کامل در گونه‌ها و سویه‌های جنس *لوکونوستوک*.

| Species | strains | Type | Cas Gene Number | Repeat Number | Spacer |
|---|---|---|---|---|---|
| *L. inhae* | DSM 15101 | II-A | 4 | 9 | S1-S8 |
| *L. gelidum subsp. Gasicomitatum* | A.21.4 | II-A | 4 | 13 | S1-S12 |
| *L. mesenteroides* | DPC 7261 | II-A | 5 | 8 | S1-S7 |
| *L. mesenteroides* | DPC 7261 (1) | II-A | 4 | 8 | S1-S7 |
| *L. rapi* | DSM 27776 | II-A | 6 | 42 | S1-S41 |
| | DSM 27776 contig4(2) | II-A | 5 | 42 | S1-S41 |
| *L. falkenberg* | C | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | LMG 10779 | II-A | 5 | 5 | S1-S4 |
| *L. carnosum* | WC0324 | II-A | 5 | 12 | S1-S11 |
| | WC0319 | II-A | 5 | 17 | S1-S16 |
| *L. lactis* | BIOML-A1 | II-A | 4 | 101 | s1-s100 |
| | aa_0143 | II-A | 4 | 99 | s1-s98 |
| | CCK940 | II-A | 4 | 22 | s1-s21 |
| | KACC 91922 | II-A | 5 | 20 | s1-s19 |
| | MSK.22.137 | II-A | 4 | 7 | s1-s6 |
| | MSK.22.141 | II-A | 4 | 7 | s1-s6 |
| | UBA5566 | II-A | 6 | 4 | S1-S4 |
| | SBC001 | II-A | 4 | 26 | s1-s25 |
| *L. gelidum* | C220d | II-A | 4 | 33 | S1-S23 |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | AMKR21 | II-A | 5 | 49 | S1-S48 |
| | DSM 19375 contig1 | II-A | 4 | 21 | S3-S22 |
| | Ebr1-8 | II-A | 4 | 27 | S1-S26 |
| | HS9 | II-A | 5 | 61 | s1-s60 |
| | JB7 | II-A | 5 | 41 | S1-S40 |
| | JPBL22 | II-A | 5 | 66 | S1-S65 |
| | KAPA3-9 | II-A | 5 | 36 | S1-S35 |
| | KCTC 3527 | II-A | 4 | 30 | S1-S29 |
| | kg1-2 | II-A | 5 | 48 | S1-S47 |
| | LS4 | II-A | 5 | 48 | S1-S47 |
| | NBRC 113246 | II-A | 4 | 30 | S1-S29 |
| | PB4d | II-A | 4 | 22 | s1-s21 |
| | PLK1c | II-A | 5 | 62 | s1-s61 |
| | POKY4-4 | II-A | 5 | 56 | S1-S55 |
| | TMW 2.1618 | II-A | 5 | 13 | S1-S13 |
| *L.pseudomesenteroides* | 1159 | II-A | 7 | 7 | S1-S6 |
| | 4882 | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | LMGH278 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | AMBR10 | II-A | 4 | 6 | S1-S5 |
| | BM2 | II-A | 5 | 8 | S1-S7 |
| | FDAARGOS_1004 | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | HPK01 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGCF06 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGCF08 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGCF15 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGH61 | II-A | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGH83 | II-C | 5 | 6 | S1-S5 |
| | LMGH97 | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | LMGTW1 | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | LMGTW3 | II-A | 5 | 4 | S1-S3 |
| | LMGTW6 | II-A | 5 | 4 | S1-S3 |
| | LMGTW8 | II-A | 5 | 7 | S1-S6 |
| | LN02 | II-A | 5 | 4 | S1-S3 |
| | LN12 | II-A | 5 | 5 | S1-S4 |
| | MGBC116435 | II-A | 4 | 10 | S1-S9 |
| | PS12 | II-A | 5 | 8 | S1-S7 |
| | UBA11295 | II-A | 7 | 7 | S1-S6 |

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]




**شکل ۱**- نمایش گرافیکی الگوی فاصله‌اندازها در سویه‌های مورد مطالعه

حفاظت شدگی توالی‌های فاصله‌انداز کریسپر، ما را قادر به تجزیه تکاملی با قابلیت ردیابی پروبیوتیک‌ها ساخته است (Barrangou and Dudley, 2016). یکی از این موارد در ژنوتایپینگ (Genotyping) سویه‌های *Lactobacillus buchneri* مورد استفاده قرار گرفته (Briner and Barrangou, 2014) و به شناسایی طبقه جدید در سطح گونه منجر شد (Zhou et al. 2020).



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

**ارزیابی تنوع اهداف فاژی و پلاسمیدی سیستم‌های شناسایی شده**

ارزیابی تنوع اهداف فاژی و پلاسمیدی می‌تواند برای رمزگشایی اطلاعات ایمنی سویه‌ها، استخراج چالش‌های تهدید ثبت شده و همچنین شکست دی.ان.ای خارجی مفید باشند. دستیابی به شباهت بین فاصله‌اندازها و عناصر دی.ان.ای خارجی می‌تواند به رمزگشایی نحوه مواجهه با دی.ان.ای مهاجم خارجی کمک کند. وقایع مواجهه، تهدیدها و چالش‌هایی که باکتری در طی حمله دی.ان.ای خارجی متحمل می‌شود را نشان می‌دهد، که به درک تعامل بین باکتری و دی.ان.ای مهاجم خارجی منجر می‌شود. همچنین فاصله‌اندازها در جایگاه‌های CRISPR/Cas سابقه ایمنی در برابر قطعات ژنومی مهاجم را حفظ می‌کنند.

**تنوع اهداف فاژی**

مطابقت توالی فاصله‌انداز سویه‌های *لوکونوستوک* با توالی‌های فاژی در شکل ۲ نشان داده شده است. سویه‌ی TMW21195 از *L.pseudomesenteroides* فاصله‌اندازهایی داشت که با سویه‌های مختلف فاژ *Mycobacterium* مطابقت نشان داد و سایر سویه‌ها با این فاژها مطابقت نداشتند. همچنین فاصله‌اندازهای سویه‌های HS9، JPBL22، Kg1-2، AMKR21 و C220d از گونه‌ی *L. gelidum* با فاژ vB از *klebsiella* تطابق نشان دادند. سایر سویه‌ها با این فاژ تطابقی نشان ندادند. یک فاصله‌انداز از سویه‌های متعلق به چهار گونه مختلف با فاژهای *Bacillus* مطابقت نشان دادند (شکل ۴، ب). همچنین یک فاصله‌انداز سویه JPBL22 از گونه *L. gelidum* و سویه LMGH284 از گونه *L. pseudomesenteroides* با فاژهای *Enterobacteria* مطابقت نشان دادند (شکل ۴، الف).

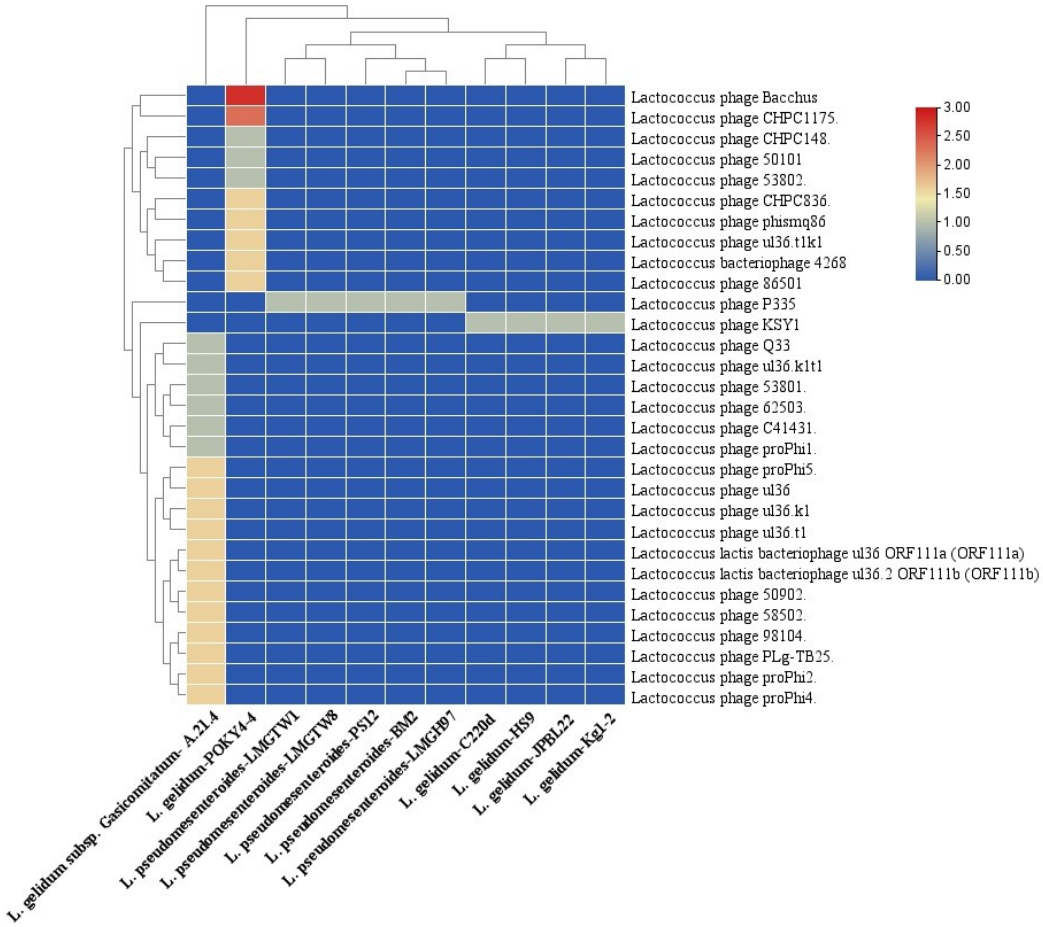
بر اساس نتایج بدست آمده تنوع فاژهای شناسایی شده توسط LMGH284 از *L. pseudomesenteroides* بیشتر بود. فاصله‌اندازهای سویه‌های متنوعی از گونه‌های مختلف شامل *L. pseudomesenteroides*، *L. lactis*، *L. gelidum*، *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum و *L. falkenbergense* با فاژهای Leucnostoc مطابقت نشان دادند (شکل ۳). بیشترین مطابقت مربوط به سویه A.21.4 از *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum بود. به‌طوریکه انواع متنوع‌تری از فاژها با این گونه مطابقت داشتند و نیز تعداد بیشتری از فاصله‌اندازهای این سویه از ۶-۴ فاصله‌انداز با



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

برخی فاژهای *لوکونوستوک* شامل A4-۱، CHA، CHB، Ln-7، Ln-8، Ln-9، phiLN25، phiLN34، phiLNTR2، و phiLNTR3 مطابقت نشان دادند. سویه SBC001 از *L. lactis* و سویه C از *L. falkenbergense* در رتبه بعدی مطابقت با فاژهای *لوکونوستوک* قرار داشتند و فاژهایی کاملا متفاوت با فاژهای شناسایی شده توسط دو سویه LS4 و PB4d از *L. gelidum* را شناسایی کردند. فاژ *لوکونوستوک* phiMH1 با فاصله‌انداز سویه‌های مختلف *L. pseudomesenteroides* مطابقت داشت.

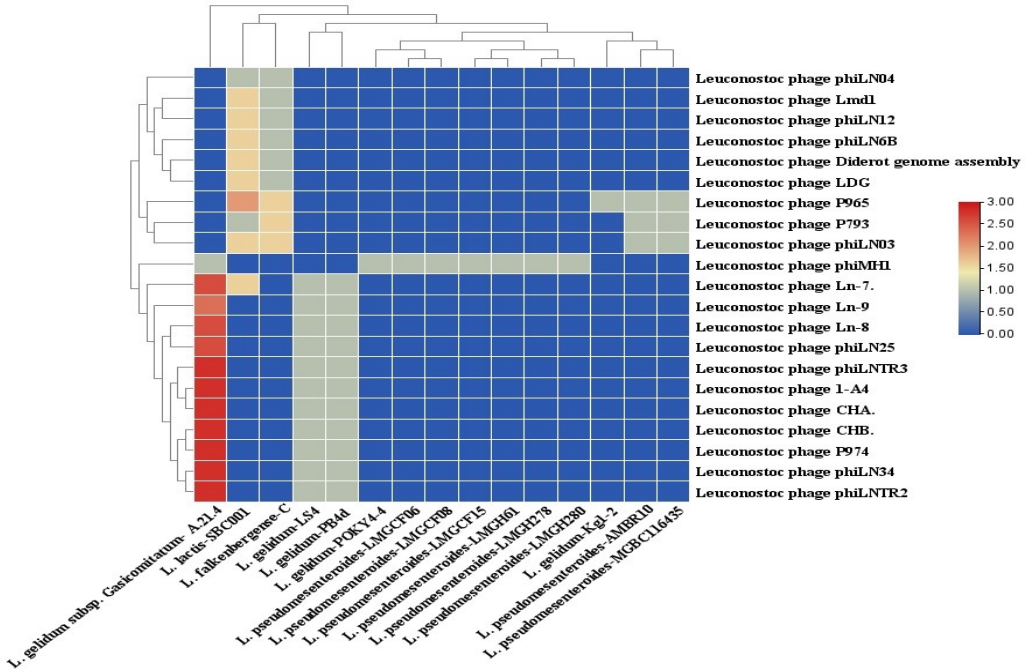
فاصله‌اندازهای سویه A.21.4 از *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum همچنین بیشترین تطابق را با فاژهای *Lactococcus* نشان دادند (شکل ۲). سویه POKY4-4 از *L. gelidum* در رتبه بعدی مطابقت با این فاژها قرار داشت. به‌طوریکه ۶ فاصله‌انداز از این سویه با فاژ *Lactococcus* phage Bacchus مطابقت نشان داد.



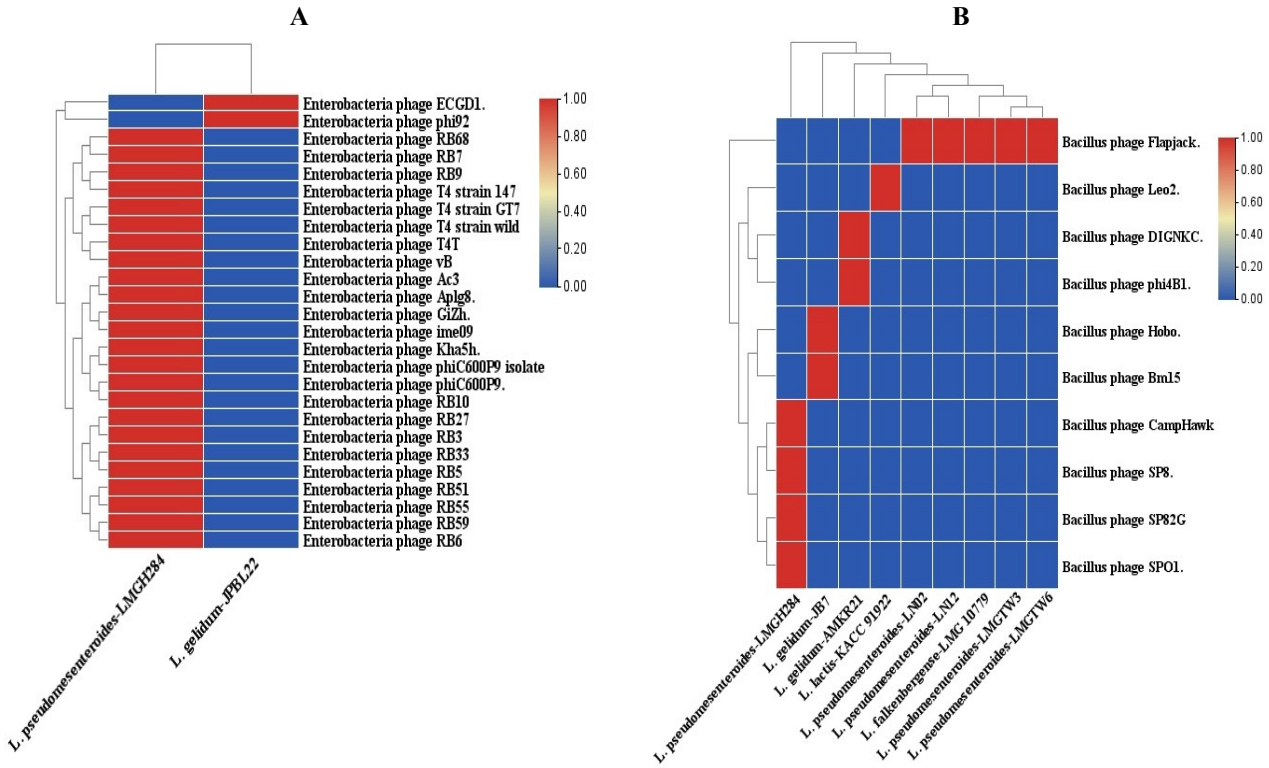

**شکل ۲**- تجزیه کلاستر تطابق فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک* با فاژهای *لاکتوکوکوس*.



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]




**شکل ۳**- تجزیه کلاستر تطابق فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک* با فاژهای *لوکونوستوک*



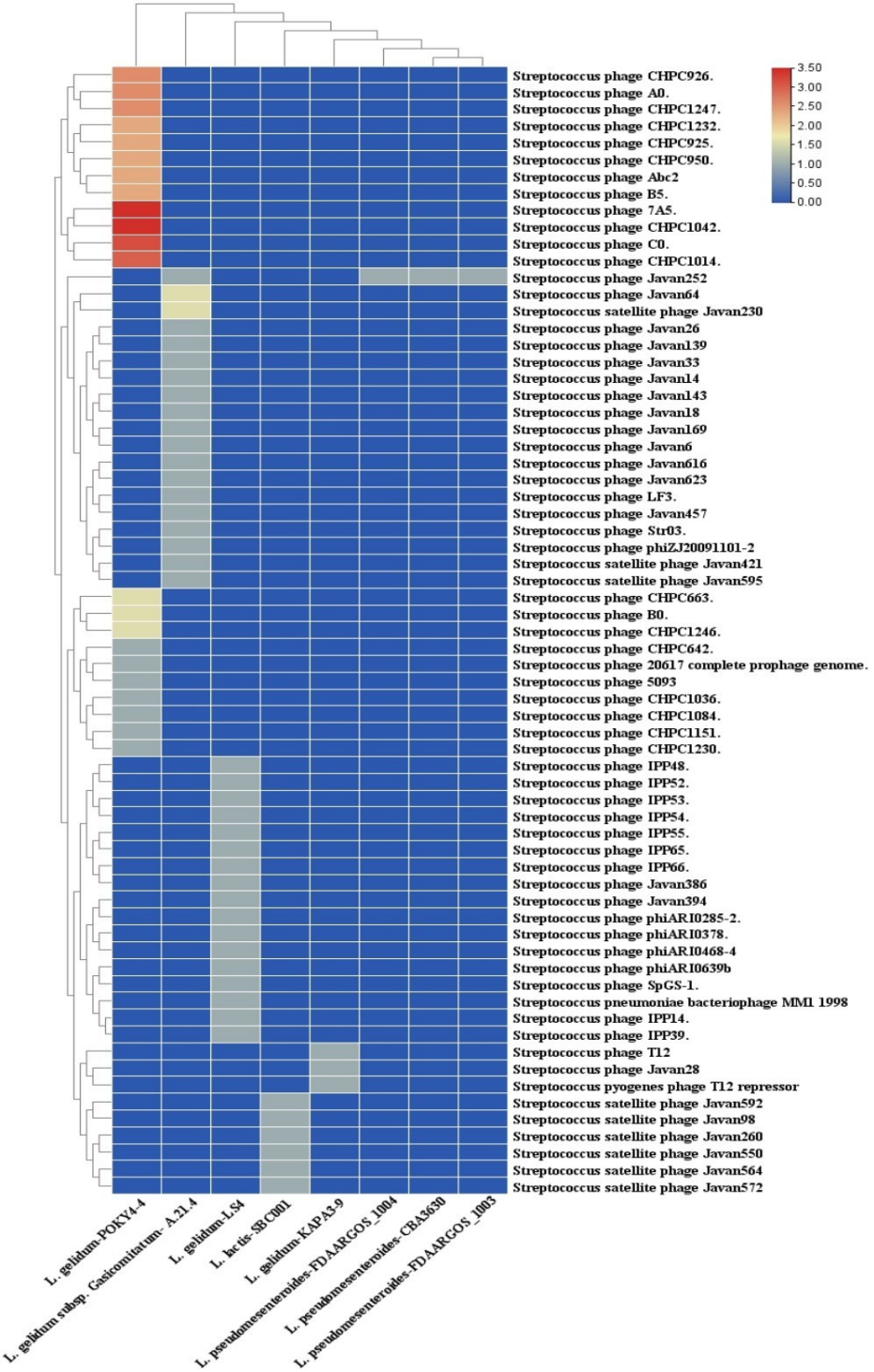

**شکل ۴**- تجزیه کلاستر تطابق فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک* با فاژهای الف) *انتروباکتریوم* و ب) *باسیلوس*.

بیشترین تطابق فاصله‌اندازهای جنس *لوکونوستوک* با انواع فاژهای *Streptococcus* بود (شکل ۵). همچنین بیشترین تطابق فاژهای این سویه با فاصله‌اندازهای سویه POK4-4 از



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

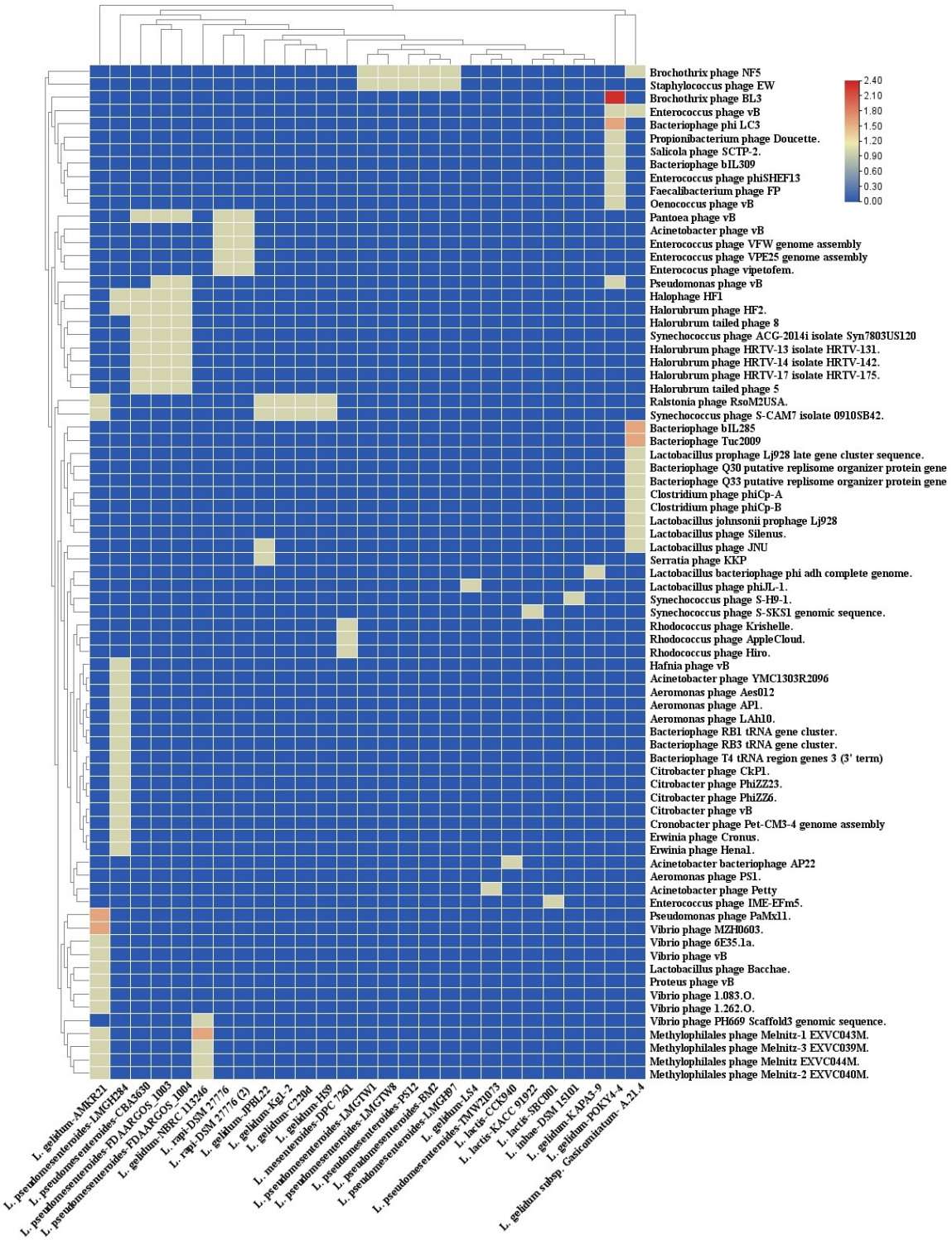
*L. gelidum* مشاهده شد. در بین سویه‌های دارای تطابق با فاصله‌اندازهای این سویه دو فاژ B5 و A5۷ دارای بیشترین مطابقت بودند. سویه‌های FDAARGOS_1003، FDAARGOS_1004 و CBA3630 از *L. pseudomesenteroides* فقط با *Streptococcus* phage Javan252 مطابقت داشتند.




**شکل ۵**- تجزیه کلاستر تطابق فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک* با فاژهای *استرپتوکوکوس*



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]




**شکل ۶**- تجزیه کلاستر تطابق سایرفاژها با فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک*

تجزیه کلاستر تطابق سایر فاژها در شکل ۶ نشان داده شده است. از بین سایر فاژهای دارای مطابقت با فاصله‌اندازهای جنس *لوکونوستوک*، بیشترین تطابق مربوط به Brochothrix بود که با ۴ عدد از فاصله‌اندازهای سویه POK4-4 از *L. gelidum* مطابقت داشتند. از نظر تعداد ۳



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

سویه‌ی POK4-4 از *L. gelidum*، A.21.4 از *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum و LMGH282 از *L. pseudomesenteroides* بیشترین تطابق را از نظر تعداد با انواع مختلف فاژها نشان دادند. تعداد ۴۵ فاصله‌انداز از سویه AMKR21 گونه *L. gelidum* با فاژ *Alteromonas* phage JH01 منطبق بود که بیشترین شدت تطابق در جنس *لوکونوستوک* بود. همچنین بیشترین انواع فاژ شناسایی شده توسط جنس *لوکونوستوک*، مربوط به فاژهای *Escherchia* phage بود.

تجزیه و تحلیل همولوژی توالی‌های فاصله‌انداز سیستم‌های CRISPR/Cas با توالی‌های فاژی و پلاسمیدی در دسترس، در روشن شدن پیچیدگی سیستم ایمنی سویه‌های مورد مطالعه مفید خواهد بود. وجود مطابقت بین توالی‌های فاصله‌انداز با داده‌های ژنومی فاژهای مختلف، نشان دهنده نیاز باکتری میزبان به سیستم دفاعی CRISPR/Cas برای مبارزه با فاژها است (Briner et al. 2015). در راستای این فرضیه، Panahi و همکاران (۲۰۲۲) با بررسی دقیق سویه TR055 از *L. brevis* نشان دادند برخی از فاصله‌اندازها دارای یک ناحیه مشترک با ژن رمزکننده اجزای دم ویروس هستند و این اجزاء عناصر کلیدی در تکثیر فاژ هستند. این امر اثبات می‌کند که یکی از استراتژی‌های ایمنی سیستم CRISPR/Cas، ایجاد اختلال در فرآیند تکثیر فاژها است. همچنین تجزیه همولوژی توالی‌های فاصله‌انداز با ژنوم‌های فاژی نشان داد که فاصله‌اندازهای ۲۰ سویه حداقل دارای یک هدف قراردهنده فاژ هستند (Panahi et al. 2022).

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، فاصله‌اندازهای سیستم CRISPR/Cas گونه‌های مختلف *Acetobacter*، پروفاژها را نه تنها در گونه‌های خود بلکه در سایر گونه‌ها نیز هدف قرار می‌دهند (شکل ۵) (Hidalgo-Cantabrana et al. 2017; Wang et al. 2020).

در این رابطه تطابق فاصله‌اندازهای موجود در *B. pseudocatenulatum* با پروفاژهای دیگر سویه‌های *bifidobacterial* نیز نشان داده شد که می‌تواند نشان‌دهنده‌ی جایگاه اکولوژیکی مشابه آنها در روده انسان باشد. این نتایج نشان می‌دهد سیستم‌های CRISPR-Cas یک مزیت تکاملی برای این گونه‌ها فراهم می‌کنند و به‌عنوان یک مکانیسم دفاعی قوی برای جلوگیری از تهاجم پروفاژ یا دیگر قطعات دی.ان.ای خارجی عمل می‌کنند (Wang et al. 2020). پروفاژهای دارای مطابقت با گونه‌های مختلف *لوکونوستوک* تنوع بسیار بالایی نشان داد. این پدیده نشان می‌دهد که یک فاژ *لوکونوستوک* ممکن است چندین گونه/سویه از *لوکونوستوک* را مورد حمله قرار دهد. همچنین سویه‌های مختلف *لوکونوستوک* فاژهای بسیار متنوعی را هدف قرار دادند. اگرچه دامنه میزبانی



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

فاژ معمولا محدود در نظر گرفته می‌شود، مدارک بسیاری نشان‌دهنده دامنه میزبانی وسیع فاژها در طبیعت است (Dekel-Bird et al. 2015; Kauffman et al. 2018). باکتری‌هایی که دارای جایگاه اکولوژیکی مشابه یا دارای پروتئین‌های متصل‌شونده به گیرنده فاژ در غشا خارجی مشابه هستند احتمالا شکارچی فاژ مشابه دارند (Takeuchi et al. 2016; Dowah and Clokie, 2018). به‌تازگی مطالعه‌ای نشان دهنده تاثیر بیان گیرنده فاژی بر روی حساسیت باکتری به آلودگی فاژی بود (Castillo et al. 2019). همچنین Yang و همکاران گزارش کردند بسیاری از فاصله‌اندازها با نواحی ژنی رمزکننده پروتئین‌های مهم کپسید، اجزای دم و یا ماشین بسته‌بندی دی.ان.اِ مطابقت داشتند. بنابراین سیستم ایمنی CRISPR/Cas با تخریب این اجزای کلیدی می‌تواند از تکثیر فاژ جلوگیری کند و زنده‌مانی باکتری را در محیط غنی از فاژ افزایش دهد (Yang et al. 2020).

**ارزیابی تنوع پلاسمیدی سیستم‌های CRISPR/Cas**

تعداد ۱۷۷ فاصله‌انداز از سویه NBRC113246 گونه *L. gelidum*، با پلاسمید Leuconostoc citreum strain EFEL 2700 plasmid pCB205 مطابقت نشان دادند که بیشترین میزان مطابقت در بین سویه‌های مختلف جنس *لوکونوستوک* بود (شکل ۷). بیشترین تنوع در انواع پلاسمیدهای دارای مطابقت توسط سویه‌های AMKR21 و JPBL22 از *L. gelidum* و سویه LMGH284 از *L. pseudomesenteroides* مشاهده شد. بیشترین تعداد انواع پلاسمید که توسط جنس *لوکونوستوک* شناسایی شدند مربوط به باکتری‌های *Lactiplantibacillus* و به‌ویژه *Lactiplantibacillus plantarum* بود. اما تعداد فاصله‌اندازهای دارای مطابقت بین یک تا دو متغییر بود. از بین تمامی سویه‌های جنس *لوکونوستوک*، فقط سویه ۱۱۵۹ از *L. pseudomesenteroides* با پلاسمیدهای *Rhizobium* مطابقت داشت. همچنین فقط دو سویه DSM27776 و DSM27776 (2) از *L. rapi* با پلاسمیدهای *Clostridium perfringens* مطابقت نشان دادند. پلاسمیدهایی متعلق به باکتری‌های *Lactococcus* و به‌ویژه *L. lactis* با فراوانی و تنوع بیشتر با فاصله‌اندازهای برخی سویه‌های *L. pseudomesenteroides* و *L. gelidum* مطابقت نشان دادند.

پلاسمیدهای جنس *Bacillus* از جمله پلاسمیدهای شناسایی شده توسط سیستم CRISPR/Cas جنس *لوکونوستوک* بودند. پلاسمیدهای این جنس اغلب توسط سویه‌های مختلف گونه *L. gelidum* شناسایی شدند. اغلب پلاسمیدهای جنس *Klebsiella* با فاصله‌اندازهای سویه‌های مختلف *L. pseudomesenteroides*



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

مطابقت داشتند. پلاسمیدهای جنس لوکونوستوک و به‌ویژه پلاسمیدهای گونه *L. lactis*، عمده‌ترین پلاسمیدهای شناسایی شده توسط سیستم CRISPR/Cas جنس *لوکونوستوک* بودند. سویه‌های JPBL22 و KAPA3-9 از *L. gelidum* و سویه‌های LMGH284 و MGBC116435 از *L. pseudomesenteroides* با بیشترین پلاسمیدهای جنس *لوکونوستوک* مطابقت نشان دادند. در مجموع دو سویه‌ی LMGH284 از *L. pseudomesenteroides* و A.21.4 از *L. gelidum* subsp. Gasicomitatum با پلاسمیدهای *Escherichia coli* مطابقت داشتند.

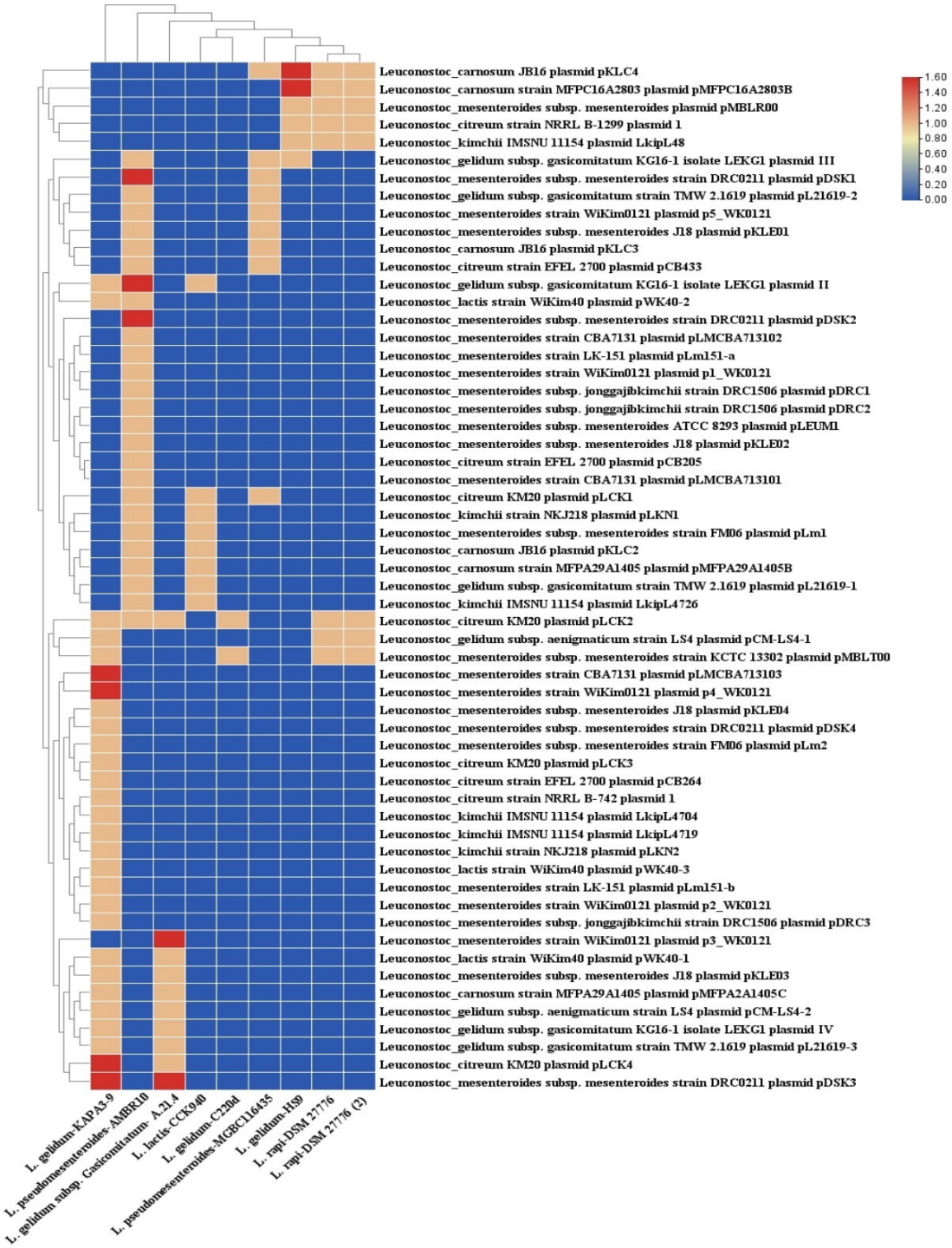
تنوع گونه‌هایی که با پلاسمیدهای گونه‌ی *Levilactobacillus brevis* مطابقت نشان دادند بالا بود و ۵ گونه با پلاسمیدهای این باکتری مطابقت نشان دادند. تنوع زیادی بین تعداد فاصله‌اندازهای دارای مطابقت سویه‌های *لوکونوستوک* با پلاسمیدهای جنس *Weisella* از صفر، یک، دو تا سه وجود داشت. سویه‌هایی از *لوکونوستوک* با ۳ پلاسمید از باکتری‌های *Loigolactobacillus* مطابقت داشتند. سویه‌هایی از ۳ گونه‌ی (SBC001) *L. lactis*، (MGB116435) *L. pseudomesenteroides* و *L. falkenberg* با پلاسمیدهایی از باکتری‌های جنس *Pediococcus* مطابقت داشتند. پلاسمیدهای گونه‌های مختلف از *Latilactobacillus* عمده‌ترین پلاسمیدهای دارای مطابقت با سیستم CRISPR/Cas جنس *لوکونوستوک* بودند. پلاسمیدهایی از سویه‌های بسیار متنوع جنس *لوکونوستوک* توسط سیستم CRISPR/Cas گونه‌های مختلف همین جنس مطابقت نشان دادند. تعداد فاصله‌اندازهای دارای مطابقت بین یک و دو متغییر بود. سیستم CRISPR/Cas دو سویه JPBL22 و AMKR21 از گونه *L. gelidum* با بیشترین انواع پلاسمید از باکتری‌های جنس *Enterococcus* مطابقت داشتند. تعداد انواع فاصله‌انداز دارای تطابق با این پلاسمیدها بین یک تا چهار متنوع بود.

از دیگر پلاسمیدهای دارای مطابقت با سیستم CRISPR/Cas جنس *لوکونوستوک*، پلاسمیدهایی از باکتری‌های جنس *Staphylococcus* دارای بیشترین تطابق بودند. به‌ویژه سویه TMW21195 از گونه‌ی *L. pseudomesenteroides* بیشترین تطابق را داشتند. به‌طوریکه ۹، ۲۰ و ۳۲ فاصله‌انداز از سیسم CRISPR/Cas باکتری‌های سویه TMW21195 با پلاسمیدهای مختلف از باکترهای *Staphylococcus* مطابقت نشان دادند. همچنین سویه TMW21073 از *L. pseudomesenteroides* دارای تعداد زیادی از فاصله‌اندازهای دارای تطابق با پلاسمیدهای باکتری‌های *Staphylococcus* بودند. سویه AMKR21 از گونه *L. gelidum* تنوع بسیار



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

بیشتری از انواع باکتری‌ها را شناسایی کردند. ۱۰ فاصله‌انداز از این سویه با پلاسمید *Bradyrhizobium quebecense* strain 66S1MB plasmid pBq66S1MBb مطابقت داشتند.




**شکل ۷**- تجزیه کلاستر تطابق فاصله‌اندازهای شناسایی شده در سویه‌های *لوکونوستوک* با پلاسمیدهای *لوکونوستوک*



[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

یکی از مکانیسم‌های دفاعی باکتری‌ها در مقابل فاژها، تکامل سیستم‌های CRISPR/Cas بوده است که سیستم دفاع تطبیقی در مقابل آنها ایجاد می‌کند. سیستم CRISPR در باکتری‌ها با قطع و ادغام عناصر ژنتیکی مهاجمان خارجی از عفونت جلوگیری می‌کند. تجزیه همولوژی توالی‌های فاصله‌انداز سیستم‌های CRISPR با توالی‌های فاژی و پلاسمیدی در دسترس می‌تواند در آشکارسازی پیچیدگی سیستم‌های ایمنی مفید باشد. پناهی و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند که از ۲۳ سویه *L. bravis* دارای سیستم کریسپر کامل ۱۹ سویه حداقل دارای یک فاصله‌انداز هدف قراردهنده پلاسمید بودند. در بین سویه‌های دارای فاصله‌اندازهای هدف قراردهنده پلاسمید، تنوع بالایی از نظر انواع پلاسمیدهای مورد شناسایی مشاهده شد. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه سویه‌های دارای سیستم کریسپر type-II فاصله‌اندازهای هدف قراردهنده پلاسمید خارجی بیشتری داشتند. داده‌های این مطالعه نتایج حاصل از مطالعه بر روی *L. casei* (Yang et al. 2020) را تایید نکرد.

بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه، برخی سویه‌های داخل گونه‌ها از نظر تکاملی دارای جد مشترک بودند اما بین گونه‌ها چنین موردی مشاهده نشد. همچنین با وجود اینکه گونه‌های جنس *لوکونوستوک* دارای سیستم CRISPR/Cas مشابهی از نوع II-A بودند، تنوع بسیار بالایی از نظر تشابه توالی فاصله‌اندازها با انواع فاژها و پلاسمیدها نشان دادند. همچنین تنوع بالایی از نظر تعداد فاصله‌اندازهای دارای تشابه مشاهده شد. نتایج این مطالعه فاژها و پلاسمیدهای هدف قرار داده شده توسط سیستم‌های CRISPR/Cas باکتری‌های این جنس را مشخص کرد. نتایج این مطالعه پتانسیل استفاده از تنوع فاصله‌اندازهای سیستم CRISPR در تعیین ژنوتیپ سویه‌های *لوکونوستوک* و مقابله با فاژها و پلاسمیدها و طراحی پلتفرم‌های جدید ویرایش ژنوم را نشان داد.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

## References فهرست منابع

**Aline LF. 1999.** LEUCONOSTOC, In: Carl A. Batt and Mary Lou Tortorello (Ed) Encyclopedia of Food Microbiology, 1nd edition. Academic Press; United States, Cambridge, Massachusetts.

**Atamer Z, Ali Y, Neve H, Heller KJ, Hinrichs J. 2011.** Thermal resistance of bacteriophages attacking flavour-producing dairy *Leuconostoc* starter cultures. International Dairy Journal. 21: 327–334.

**Barrangou R and Dudley EG. 2016.** CRISPR-based typing and next-generation tracking technologies. Annual Review of Food Science and Technology. 7: 395-411 .

**Briner AE and Barrangou R. 2014.** Lactobacillus buchneri genotyping on the basis of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) locus diversity. Applied and Environmental Microbiology. 80: 994-1001.

**Briner AE, Lugli GA, Milani C, Duranti S, Turroni F, Gueimonde M, Margolles A, Sinderen DV, Ventura M, Barrangou R. 2015**. Occurrence and diversity of CRISPR-Cas systems in the genus *Bifidobacterium*. PLoS One. 10: e0133661.

**Castillo D, Rørbo N, Jórgensen J, Lange J, Tan D, Kalatzis PG, Svenningsen SL, Middelboe M. 2019.** Phage defense mechanisms and their genomic and phenotypic implications in the fish pathogen *Vibrio anguillarum*. FEMS Microbiology Ecology. 95: fiz004 .

**Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He Y, Xia R. 2020.** TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. Molecular Plant. 13(8): 1194-1202.

**Chen YS, Wang LT, Wu YC, Mori K, Tamura T, Chang CH, Chang YC, Wu HC, Yi HH, W PY. 2020.** *Leuconostoc litchii* sp. nov., a novel lactic acid bacterium isolated from lychee. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 70: 1585-1590.

**Crawley AB, Henriksen ED, Stout E, Brandt K, Barrangou R. 2018.** Characterizing the activity of abundant, diverse and active CRISPR-Cas systems in *lactobacilli*. Scientific Reports. 8: 1-12.

**Dekel-Bird NP, Sabehi G, Mosevitzky B, Lindell D. 2015.** Host-dependent differences in abundance, composition and host range of cyanophages from the Red Sea. Environmental Microbiology. 17: 1286-1299.

**Dowah ASA and Clokie MRJ. 2018.** Review of the nature, diversity and structure of bacteriophage receptor binding proteins that target Gram-positive bacteria. Biophysical Reviews. 10: 535-542.

**Hidalgo-Cantabrana C, Crawley AB, Sanchez B, and Barrangou R. 2017.** Characterization and Exploitation of CRISPR Loci in Bifidobacterium longum. Front. Microbiology. 8: 1851.

**Jeon HH, Kim KH, Chun BH, Ryu BH, Han NS, Jeon CO. 2017.** A proposal of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. jonggajibkimchii subsp. nov. and reclassification of *Leuconostoc mesenteroides* subsp. suionicum (GU et al., 2012) as *Leuconostoc suionicum* sp. nov. Based on complete genome sequences. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 67: 2225–2230.

**Kauffman KM, Hussain, FA, Yang J, Arevalo P, Brown JM, Chang WK, David VanInsberghe D, Elsherbini J, Sharma RS, Cutler MB, Kelly L, Polz MF. 2018.** A major lineage of non-tailed dsDNA viruses as unrecognized killers of marine bacteria. Nature. 554: 118-122.

**Lillestøl RK, Redder P, Garrett RA, Brügger K. 2006.** A putative viral defence mechanism in archaeal cells. Archaea 2(1): 59–72.

**Long J, Xu Y, Ou L, Yang H, Xi Y, Chen S, Duan G. 2019.** Diversity of CRISPR-Cas system in *Clostridium perfringen*. Molecular Genetics and Genomics. 294: 1263-1275.

**Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJM, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. 2011.** Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nature Reviews Microbiology. 9: 467-477.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

**Makarova KS, Wolf YI, Koonin EV. 2013.** Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. Nucleic Acids Reserch. 41: 4360-4377.

**Nami Y, Imeni N, Panahi B. 2021.** Application of machine learning in bacteriophage research. BMC Microbiology. 21:193 .

**Nami Y, Panahi B, Jalaly HM, Bakhshayesh RV, Hejazi MA. 2020.** Application of unsupervised clustering algorithm and heat-map analysis for selection of lactic acid bacteria isolated from dairy samples based on desired probiotic properties. LWT Food Science and Technology. 118: 108839.

**Nethery MA and Barrangou R. 2019.** Predicting and visualizing features of CRISPR–Cas systems. Methods Enzymology. 616: 1–25 .

**Panahi B, Majidi M, Hejazi MA. 2022.** Genome mining approach reveals the occurrence and diversity pattern of clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated systems in *Lactobacillus brevis* Strains. Frontiers in Microbiology. 13: 911706.

**Riesenberg S, Helmbrecht N, Kanis P, Maricic T, Pääbo S. 2022.** Improved gRNA secondary structures allow editing of target sites resistant to CRISPR-Cas9 cleavage. Nature Communications. 13: 1-8.

**Rostampour M, Masoomi R, Nami Y, Panahi B. 2022.** A review of anti-phage systems in lactic acid bacteria. Journal of Biosafety. 15 (2): 37-54.

**Sadeghi M, Panahi B, Mazlomi A, Hejazi MA, Nami Y. 2022.** Screening of potential probiotic lactic acid bacteria with antimicrobial properties and selection of superior bacteria for application as biocontrol using machine learning models. LWT. 21: 11347.

**Takeuchi I, Osada K, Azam AH, Asakawa H, Miyanaga K, Tanji Y. 2016.** The presence of two receptor-binding proteins contributes to the wide host range of staphylococcal twort-like phages. Applied and Environmental Microbiology. 82: 5763-5774.

**Thunell RK. 1995.** Taxonomy of the Leuconostocs. Journal of Dairy Science. 78(11): 2514-2522.

**Wang G, Liu Q, Pei Z, Wang L, Tian P, Liu Z, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2020.** The diversity of the CRISPR-Cas system and prophages present in the genome reveals the co-evolution of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* and Phages. Frontiers in Microbiology. 11: 1088.

**Zhou X, Yang B, Stanton C, Ross RP, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2020.** Comparative analysis of *Lactobacillus gasseri* from Chinese subjects reveals a new species-level taxa. BMC Genomics. 21: 119.

**Yang L, Li W, Ujiroghene OJ, Yang Yang Y, Jing Lu J, Zhang S, Pang X, Lv j. 2020.** Occurrence and diversity of CRISPR Loci in *Lactobacillus casei* group. Frontiers in Microbiology. 11: 624.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]

# Investigating the Diversity of phage and Plasmid Targets of the CRISPR/Cas Systems in the *Leuconostoc* Genus using the *In-silico* Approach

**Sara Ghaffarian[1*] and Bahman Panahi[2]**

1- Assistant Professor, Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

2- Assistant Professor, Department of Genomics, Branch for Northwest & West region, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tabriz, Iran.

s.ghaffarian@azaruniv.ac.ir

**Abstract**

*Leuconostoc* genus bacteria are part of the natural microbial flora of fields and fermented products. CRISPR/Cas system is one of the main parts of the bacterial immune system. In this study, the *Leuconostoc* genus various strains' evolutionary pathways based on composition, acquisition, and deletion events of spacer sequences under selective pressure were evaluated and the diversity of invasive phages and plasmids targeted by the CRISPR/Cas system of *Leuconostoc* strains was studied. The maximum similarity in terms of composition, acquisition, and deletion events similar pattern between strains within specious detected in *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc pseudomesenteroides*. Forty-five spacers of strain AMKR21 from *L. gelidum* matched *Alteromonas* phage JH01 which harbored the highest numbers of spacers targeting phages. Also, the highest number of identified phages by *Leuconostoc* belonged to Escherichia phages. A plasmid of *Leuconostoc citreum* was the most frequently targeted plasmid by the analyzed spacers of Leuconostoc and it was matched 177 times by spacers of NBRC113246 from *L. gelidum*. The results of this study showed the importance of the bacterial adaptive immune system in stability in bacteriophage-contaminated environments and the usage of this information in defining functional formulations.

**Keywords**: *Leuconostoc* genus, Adaptive immune system, Genetic diversity, Evolution.

[ Downloaded from journalofbiosafety.ir on 2026-02-10 ]