

UNIVERSITETI I TIRANËS
FAKULTETI I SHKENCAVE NATYRORE
DEPARTAMENTI I BIOTEKNOLOGJISË



RAPORT FINAL I PROJEKTIT TË PKKZH

TEMA:

KONFIRMIMI I POZICIONIMIT TAKSONOMIK TË SHTAMEVE TË KOLEKSIONIT KOMBËTAR TË MAJAVE INDUSTRIALE NËPËRMJET TEKNIKAVE QELIZORE E MOLEKULARE. IZOLIMI, PURIFIKIMI DHE RUAJTJA E ADN-SË GJENOMIKE TË KËTYRE SHTAMEVE.

Grupi I punës: *Prof. Dr. Ariola Bacu*

Prof. Dr. Klementina Puto etj.

Tiranë, Shkurt 2015

Propozuar si pjesë e Programit Kombëtar për Kërkim e Zhvillim (PKKZH):

” BUJQËSIA, USHQIMI DHE BIOTEKNOLOGJIA”

Objektivat dhe rezultatet kryesore të arritura

1.

Objektivi i zhvillimit: *studimi i referohet drejtimit përparësor të bioteknologjisë së mikroorganizmave:*

Konkretisht përdorimi i metodave e teknikave qelizore e molekulare për:

- ❖identifikimin,
- ❖karakterizimin
- ❖standartizimin e mikroorganizmave me vlera të veçanta në industrinë ushqimore

OBJEKTIVAT:

Objektivi 1: Izolimi i ADN-së gjenomike të shtameve të majave dhe purifikimi i saj

- **Rezultati 1:** *Një nga kontributet më të rëndësishëm të këtij projekti mendojmë se ishte izolimi i ADN-së gjenomike, rezultat i realizuar me sukses.*
- *Janë izoluar ADN-të gjenomike të 75 shtameve të majave dhe është bërë purifikimi i tyre.*

MICRO

Objektivi 2: Përcaktimi i përqindjes molare të G+C të ADN-së gjenomike (mol. %G+C)

- **Rezultati 1:** *Ky rezultat është realizuar përgjithësisht mirë.*
- **Nga 85** shtame majash, për të cilat njihet treguesi % mol. G+C, tregues shumë i rëndësishm taksonomik, janë përcaktuar përqindjet e 45 shtameve.

Objektivi 3. Eksperimentimi i përdorimit të analizës restriktive të dyfishtë të ADN-së gjenomike dhe i zbulimit të markerëve të randomizuar kodominantë si dy metoda molekulare për të dalluar ndërmjet disa shtameve problematikë në identifikim.

- **Rezultati 1:** Tashmë janë stabilizuar metodikat e analizës restriktive për përdorim të mëtejshëm rutinë.
- **Rezultati 2:** Përveç stabilizimit të metodikës janë gjetur markerët e randomizuar tipikë për majatë. Kjo do të bëjë të mundur përdorimin e tyre për të gjithë koleksionin në të ardhmen.
- **Rezultati 3:** Këto metoda tashmë të përzgjedhura me kujdes dhe pas shumë provash janë të stabilizuara dhe rezultative për aplikimin e teknikave të mësipërme për një numër shtamesh problematikë të identifikuar me metoda konvencionale.

Objektivi 4: Verifikimi dhe rivlerësimi i kulturave të majave që ndodhen në koleksionin Kombëtar të Mikroorganizmave Industrialë e Bujqësorë (KKMIB)

➤ **Rezultati 1:** është bërë rivlerësimi i 85 kulturave të majave të rivitalizuara dhe të pastruara. është dashur një një punë e madhe për rivitalizim, pasi koleksioni ishte në prag dëmtimi për mungesë terrenesh. Për gati tre vjet nuk ishte bërë verifikimi dhe rigjallërimi i shtameve. Një pjesë e mirë nga ato të ruajtura në parafinë nuk u rigjallëruan, pra nuk ishin vitale. Por ruajtja në ngrirje na ndihmoi për ti rivitalizuar dhe rivlerësuar njëkohësisht, gjithashtu na ndihmoi për përcaktim afatesh ruajtjeje.

➤ **Rezultati 2:** U rivlerësuan të 85 kulturat e majave të koleksionit. (Fotot e 87 shtameve ndodhen në shtojcën nr. 1)

Objektivi 5: Ndjekja e ecurisë së procesit të konservimit të majave dhe e materialit të tyre gjenetik (ADN-së gjenomike) me ngrirje të thellë. Kontrolli periodik i vitalitetit, pastërtisë dhe karakteristikave bazë.

- **Rezultati 1:** Tashmë është gjendur efienca e konservimit me metoden e ngrirjes së thellë.
- **Rezultati 2:** Mendojmë se ky rezultat është arritur sipas pritshmërisë. Sugjerojmë se afatet optimale për ruajtje janë: 1 vit për ato të ruajtura në parafinë dhe 2 vjet për ato të ruajtura në ngrirje. Ndërsa për ato të ruajtura në ngrirje, sugjerojmë jo më shumë se dy vjet për ato në parafinë dhe jo më shumë se tre vjet për ato në ngrirje.
- **Rezultati 3:** U përcaktuan afatet optimale dhe maksimale të ruajtjes së ADN-së gjenomike të majave.

Objektivi 6: Plotësimi i kartelave gjenetike me tregues të rinj

d. Organizmat shkencorë bashkëpunëtorë

- Nga ana administrative dhe shkencore Projekti është realizuar me pjesëmarrjen e njësive shkencore të Universitetit të Tiranës:
 - *Fakultetit të Shkencave të Natyrës:*
 - Departamenti i Bioteknologjisë
 - Seksioni i Bioteknologjisë Molekulare
 - Seksioni i Bioteknologjisë Industriale
 - Master Shkencor bioteknologji Industriale dhe Molekulare

PERSONELI SHKENCOR I PROJEKTIT

- **Prof. Dr. Klementina PUTO** – Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Prof. Dr. Ariola BACU** - Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Prof. Dr. Rustem ZENELAJ** - Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Prof. Dr. Fatbardha BABANI** - Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Msc. Linda LUARASI** - Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT
- **Entela AZEMAJ** - Laborante, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN
- **Ermira MISIRI** – Specialiste biokimike, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN
- **Efterpi Terpo** – Ish-laborante, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN

BOTIME NË REVISTA SHKENCORE TË VENDIT DHE TË HUAJA, MONOGRAFI APO REFERIMET NË AKTIVITETET SHKENCORE TË REALIZUARA NË KUADRIN E PROJEKTIT

- **Temë diplomë. Yllka LALA. 2014.** “Krahasimi i shtameve të *Saccharomyces cerevisiae* bazuar në veçoritë morfologjike dhe përqindjes së bazave G-C në gjenomat e tyre”. Mbrojtur dhe vlerësuar maksimalisht pranë Departamentit të Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Temë diplomë. Romina XHAJA. 2014.** “Krahasimi i shtameve të një specijeje të majave bazuar në metodat molekulare dhe mikrobiologjike klasike”. Mbrojtur dhe vlerësuar maksimalisht pranë Departamentit të Bioteknologjisë, FSHN, UT.
- **Temë diplomë. Krisida CIKO. 2014.** “Krahasimi i disa shtameve të majave industriale me metoda të mikrobiologjisë klasike dhe me metoda të bioteknologjisë molekulare”. Mbrojtur dhe vlerësuar maksimalisht pranë Departamentit të Kimisë Ushqimore, FSHN, UT.
- **Temë diplomë. Edionada Gjika. 2013.** “Vlerësimi molekular dhe konvencional i disa shtameve të majave, të seleksionuara nga Koleksioni Kombëtar i Mikroorganizmave Industrialë”.

PREZANTIM NË KONFERENCË:

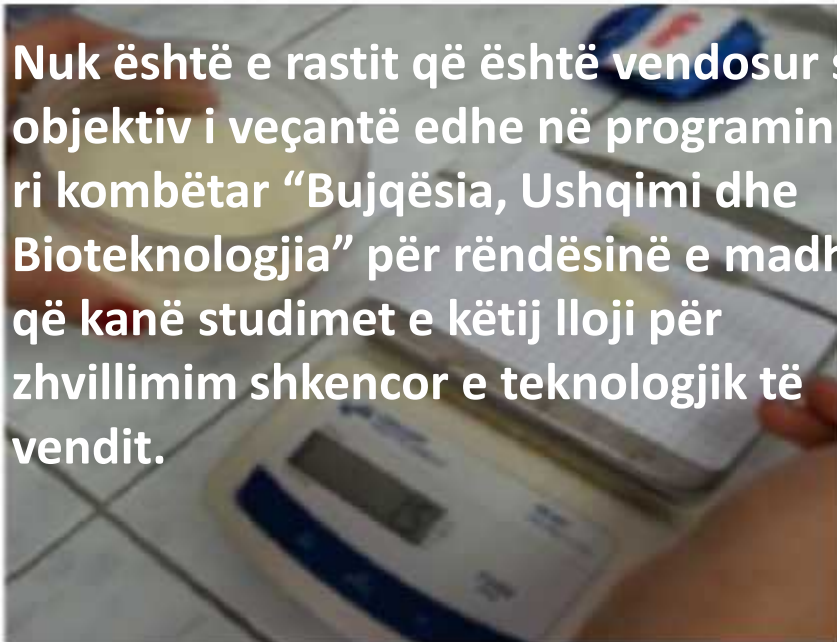
- **Ariola Bacu, Fatbardha Babani, Klementina Puto et al. 2014. *Comparison of molecular methodologies used for the verification of the identity of close yeast strains of the ANCIM.* 2nd International Conference on Applied Biotechnology. Tirana, Albania. Abstract, Proceedings **ISBN: 978-99943-0-367-0**. P 221-232**
- **Buletin AKT-i. Klementina Puto, Ariola Bacu: 2015. KONFIRMIMI I POZICIONIMIT TAKSONOMIK TË SHTAMEVE TË KOLEKSIONIT KOMBËTAR TË MAJAVE INDUSTRIALE NËPËRMJET TEKNIKAVE QELIZORE E MOLEKULARE. IZOLIMI, PURIFIKIMI DHE RUAJTJA E ADN-SË GJENOMIKE TË KËTYRE SHTAMEVE**

PERFITUESIT NGA PROJEKTI

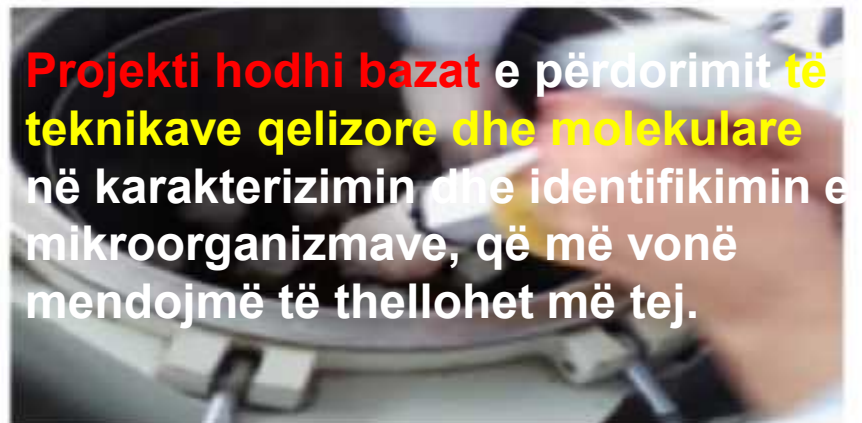
- Në aspektin shkencor, ata janë:
 - institucionet pjesëmarrëse në projekt
 - shkollat e larta me profil biologjik,
 - shkollat e mesme për demonstrime rëndësishme në fushën e biologjisë
 - dhe ajo që është më e rëndësishme **degë të ndryshme të industrisë ushqimore.**



Nuk është e rastit që është vendosur si objektivi i veçantë edhe në programin ri kombëtar “Bujqësia, Ushqimi dhe Bioteknologjia” për rëndësinë e madhe që kanë studimet e këtij lloji për zhvillim shkencor e teknologjik të vendit.



Projekti hodhi bazat e përdorimit të **teknikave qelizore dhe molekulare** në karakterizimin dhe identifikimin e mikroorganizmave, që më vonë mendojmë të thellohet më tej.



❖ Për herë të parë në vendin tonë arritëm të krijojmë një koleksion me ADN gjenomike të specieve dhe shtameve kryesore të majave.

➤ **U përpunuan dhe u futen metoda moderne të biologjisë molekulare si:**

- Izolimi dhe purifikimi i ADN-së gjenomike të majave.
- Përcaktimi i përqindjes molare (mol.%) G+C.
- Përdorimi i analizës restriktive si mjet për të dalluar ndërmjet shtameve të një specijeje.
- Përdorimi i markerëve të randomizuar për të verifikuar variabilitetin ndërmjet shtameve.



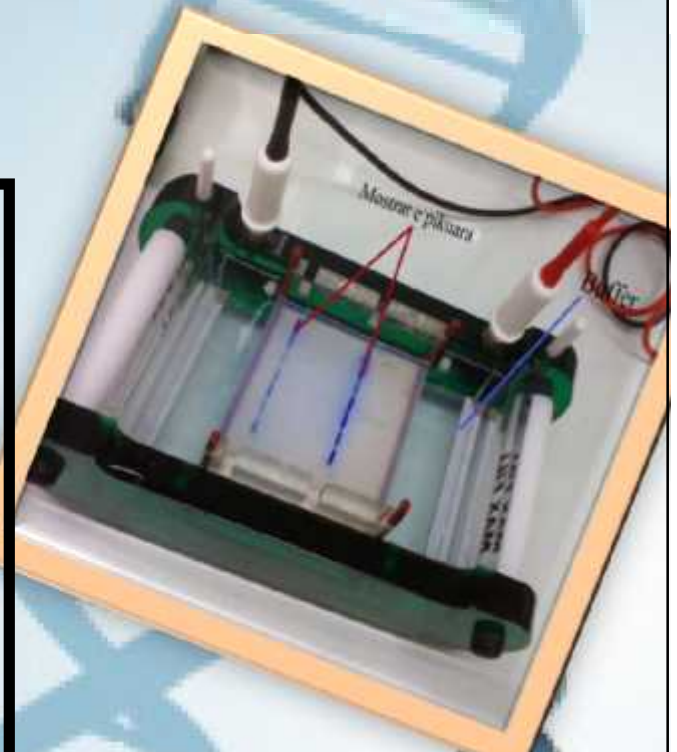
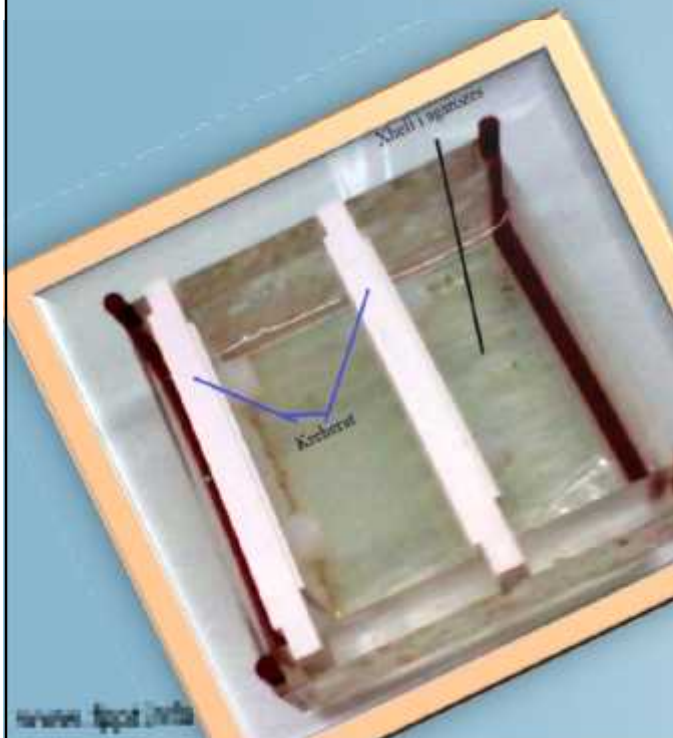
NË ASPEKTI APLIKATIV:

- U izoluan, purifikuan dhe identifikuan me metoda molekulare **shtame endemike** me cilësi specifike, të cilat mund të përdoren me sukses në industrinë ushqimore (fermentimin e drejtuar të verërave e pijeve të tiera alkoolike).



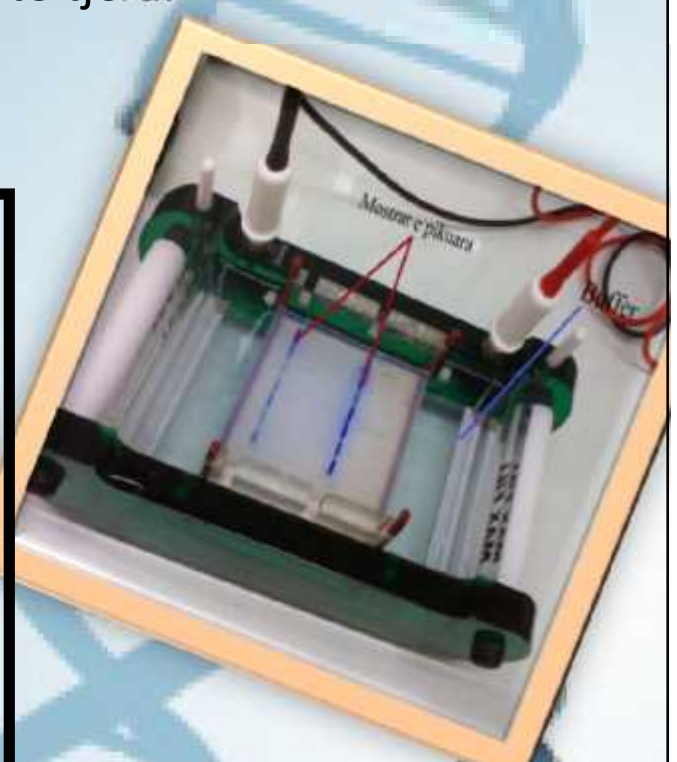
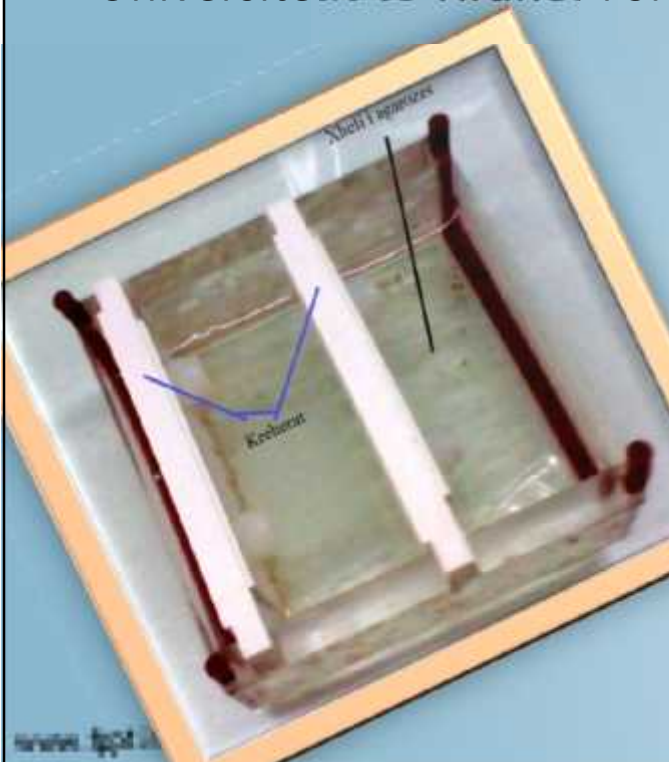
NË ASPEKTIN PRAKTIK:

- *Rezultatet e projektit mund të komercializohen, mbasi:*
- Metodat dhe teknikat molekulare të identifikimit të shtameve synohet që në të ardhmen të vihen në shërbim të klientëve që disponojnë shtame majash dhe duan t'i identifikojnë kundrejt pageses.



NË ASPEKTIN PRAKTIK:

- Shtamet me vlera të veçanta aplikative që janë përfituar
 - mund të patentohen
 - dhe tu shiten ndërmarrjeve prodhuese,
 - ndërsa speciet e shtamet tipike si dhe ADN-të e tyre mund t'u shiten shkollave dhe universiteteve për qëllime mësimore e shkencore, si.
- Studentëve të degës Bioteknologji dhe Kimi Industriale dhe Ushqimore, të Universitetit të Tiranës FSHN, si dhe të Universiteteve të tjera.



KAPITULLI III

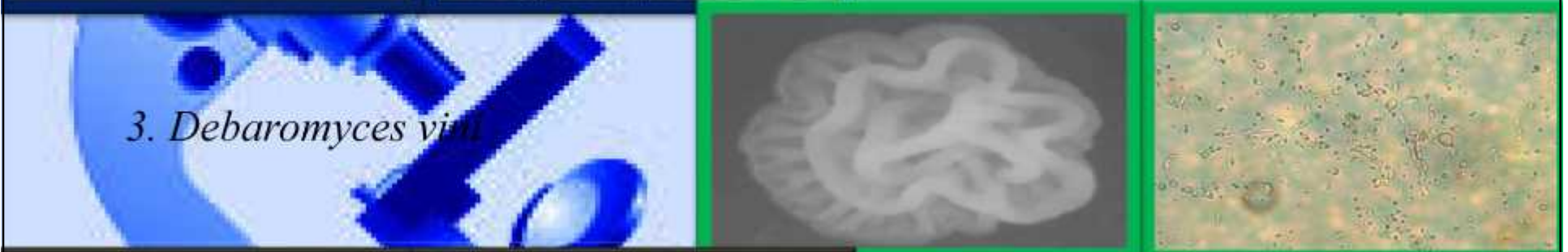
REZULTATE DHE DISKUTIME

Rezultatet e marra nga vrojtimi i kolonive në pjatat e Petrit dhe vrojtimi i qelizave në mikroskop.

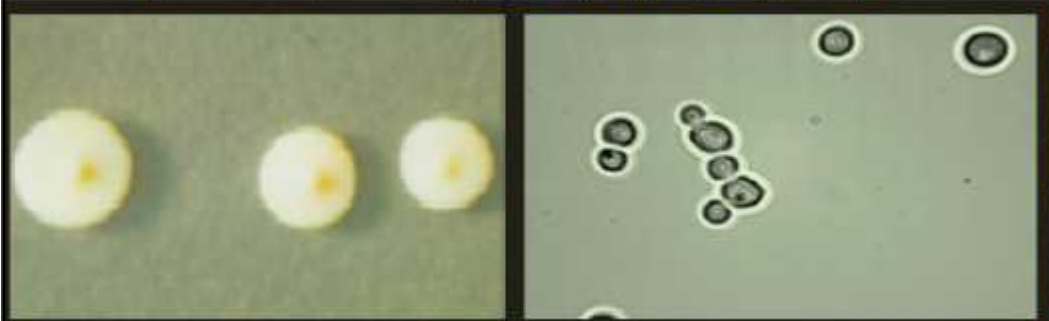
1. *Candida tropicalis*



2. *Debaromyces hansenii* I

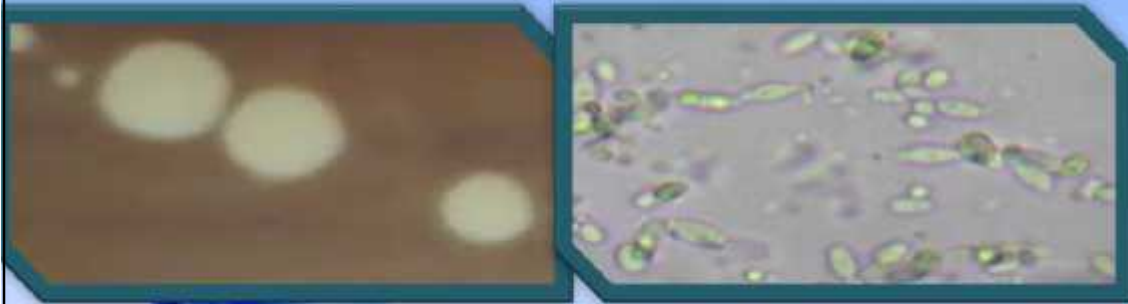


3. *Debaromyces viji*



REZULTATE DHE DISKUTIME

4. *Kloeckera apiculata*



5. *Kloeckera lafarii*



6. *Saccharomyces bayanus*



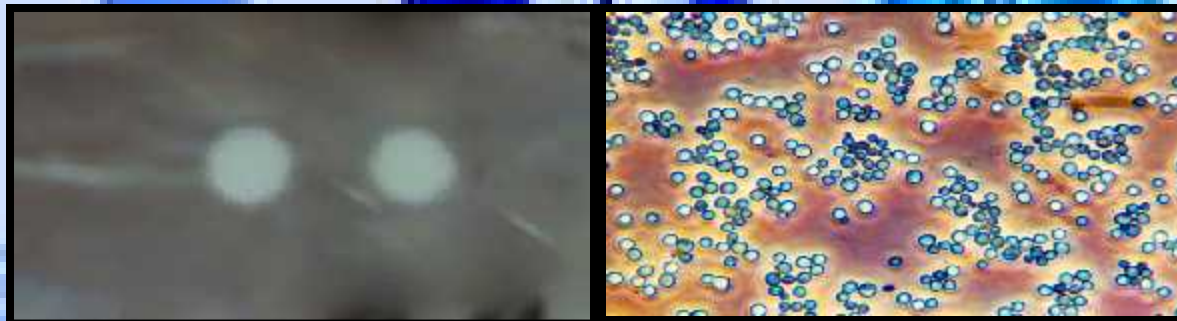
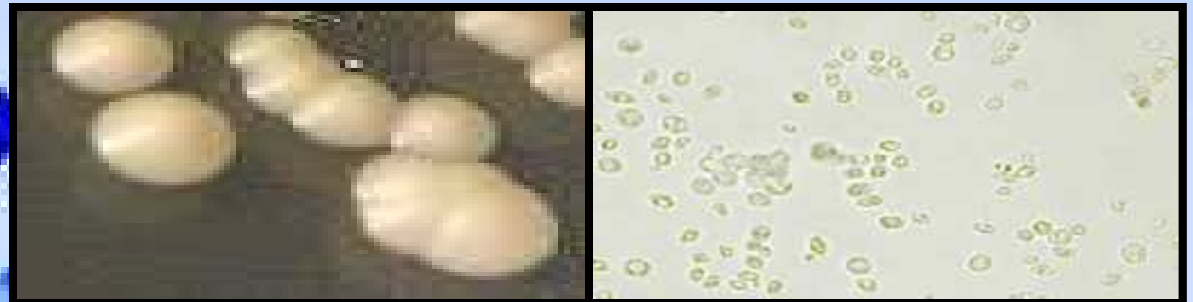
REZULTATE DHE DISKUTIME

7. *Saccharomyces bayanus I*



8. *Saccharomyces bayanus*

9. *Saccharomyces fructuum*



REZULTATE DHE DISKUTIME

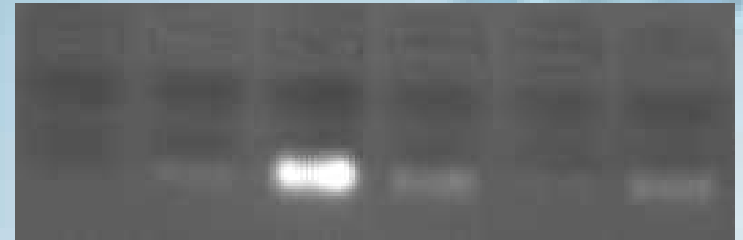
Rezultatet e analizës restriktive me tre enzima të ADN-së së majave industriale.

8 7 6 5 4 3 2 1



Produktet e prerjes me *EcoRI*
të ADN-së gjenomike

6 5 4 3 2 1



Produktet e prerjes me *HpaII*
të ADN-së gjenomike

4 3 2 1



10 9 8 7 6 5



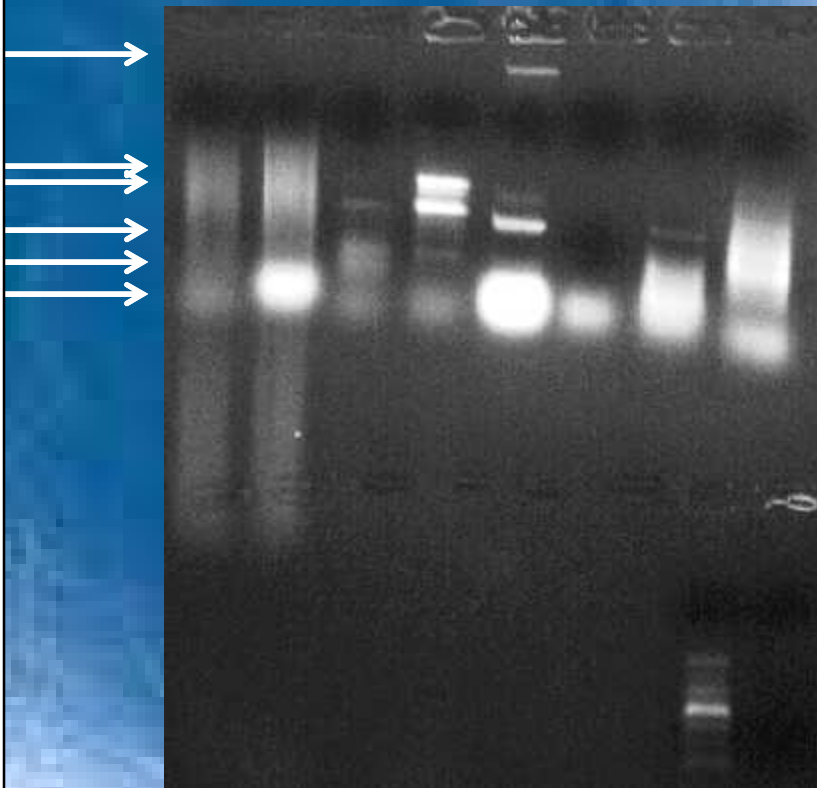
Produktet e prerjes me *Hind III* të ADN-së gjenomike

REZULTATE DHE DISKUTIME

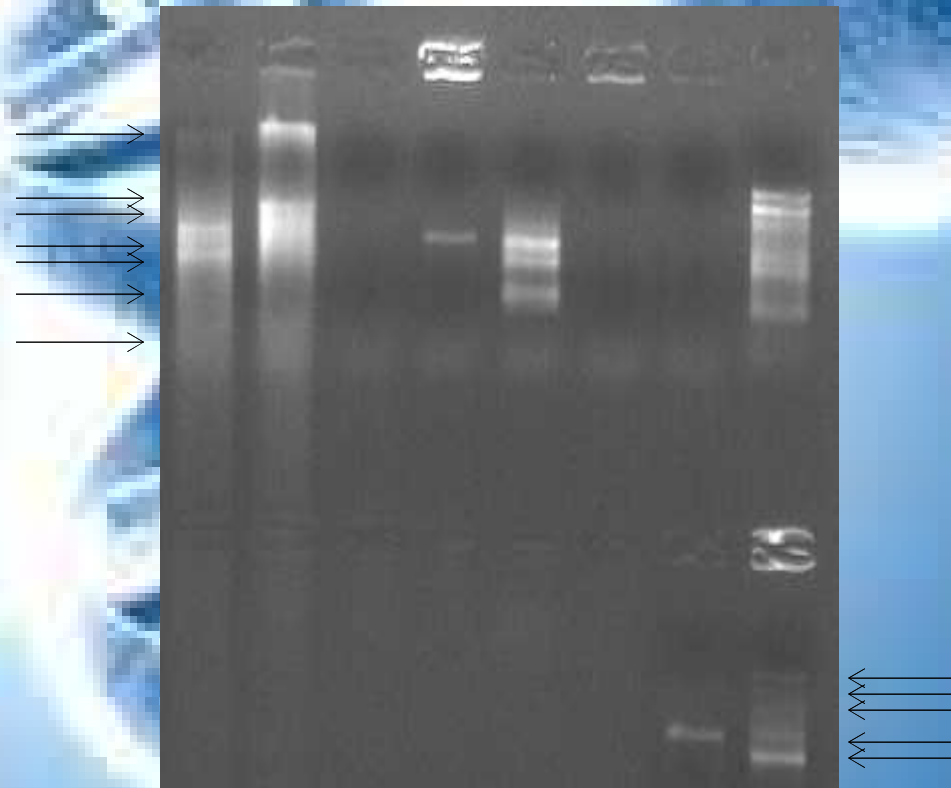
Rezultatet e RAPDs për karakterizimin e dhjetë shtameve të majave industriale

8 7 6 5 4 3 2 1

8' 7' 6' 5' 4' 3' 2' 1'



9 10



10' 9'

PËRFUNDIME

Në përfundim të këtij studimi konkluduar se:

- a) Terreni YMA ishte i përshtatshëm për rritjen e majave.
 - b) Ne disa shtame te koleksionit kishte prani të infeksioneve.
 - c) Metodatat e përzgjedhura në studim ishin Analiza Restriktive dhe PCR-RAPDs.
 - c) Rezultatet provuan se të dyja metodatat mund të përdoren për krahasimin midis shtameve të majave.
 - c) Niveli i krahasimit është më i lartë në rastin e RAPDs dhe për më tepër cilësia e ADN-së që kemi ekstraktuar është brenda intervalit të pastërtisë së pranuar për një PCR të suksesshme.
 - d) Metodatat dhe teknikat molekulare të identifikimit të shtameve synohet **që në të ardhmen të vihen në shërbim edhe të klientëve që disponojnë shtame majash dhe duan t'i identifikojnë kundrejt pagesës.**
- Konkludojmë se kombinimi i të dhënave të mikrobiologjisë klasike me ato molekulare është me shumë vlerë për mirëmbajtjen, rifreskimin, dhe karakterizimin në vazhdimësi të koleksionit të mikroorganizmave industriale të Departamentit të Bioteknologjisë, ndaj sugjerojmë vazhdimin e punës në të dy drejtimet.
 -

REFERENCAT

- ❖ Baleiras Couto, M.M., Vogels, J.T.ë.E., Hofstra, H., Huis in't Veld, J.H.J. & van der Vossen, J.M.B.M., 1995. Random amplified polymorphic DNA and restriction enzyme analysis of PCR amplified rDNA in taxonomy: to identification techniques for food-bourne yeasts. *J. Appl. Bacteriol.* 79, 525-535.
- ❖ Barre P, Vezinhet F, Dequin S, Blondin B (1992) Genetic improvement of ine yeasts. In: Fleet GR (ed) ine microbiology and biotechnology. Hardeood Academic, Neeark, pp 265-287.
- ❖ Bradbury, J.E., Richards, K.D., Niederer, H.A., Soon, A., Lee, P., Dunbar, R. & Gardner, R.C., 2005. A homozygous diploid subset of commercial ine yeast strains. *A. Van Leeu.* 3, 1-12.
- ❖ Britos dos Santos, S.K., Basilio, A.C.M., Brasileiro, B.T.R.V., Simoes, D.A., da Silva-Filho, E.A., & de Moraes Jr., M., 2007. Identification of yeast ithin *Saccharomyces sensu stricto* complex by PCRfingerprinting. *orld J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 1613-1620.
- ❖ Bruns, T.D., hite, T.J. & Taylor, J.., 1991. Fungal molecular systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 22, 524-564.
- ❖ . Capece, A., Salzano, G. & Romano, P., 2003. Molecular typing techniques as a tool to differentiate non- *Saccharomyces ine species*. *Int. J. Food Microbiol.* 84, 33-39.



***Falcminderit
për
vëmendjen!***

