

## جداسازی و شناسایی باکتریهای خانواده اسید لاکتیک فلور میکروبی شیر مادر به روش سکوننس DNA در ناحیه 16S ریبوزومی

فریده طباطبایی<sup>۱</sup> و لیلا روزبه نصیرائی<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۳/۲۲

۱-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲-مربی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نور

\* مسئول مکاتبه: E mail: Leila\_roozbeh@yahoo.com

### چکیده

شیر مادر بهترین منبع تغذیه ای در طی چند ماه اول زندگی نوزاد می باشد. خواص درمانی بسیاری در رابطه با مصرف این ترکیب ارزشمند شناخته شده که می توان به مقاومت نوزادان شیر مادر خوار در برابر بسیاری عفونتها و بیماریها همچون حساسیتهای جلدی و آسم اشاره کرد که یکی از عوامل آن را مربوط به فلور طبیعی شیر مادر می دانند که متاثر از نوع تغذیه مادران بوده و بسته به شرایط جغرافیایی متغیر است. لذا این تحقیق برای اولین بار با هدف بررسی فلور میکروبی شیر مادران ایرانی به منظور جداسازی و تخلیص میکروارگانیسم های بومی که بتوانند به عنوان کاندیدی جهت باکتریوتراپی داشتن خواص پروبیوتیکی مطرح باشند، انجام می گیرد. برای این منظور در این مطالعه ۳۰۹ کلنی متفاوت به طور تصادفی از ۲۰ نمونه شیر مادران سالم ساکن در شهر مشهد جداسازی شدند. ۴۰ کلنی از ۳۰۹ کلنی بررسی شده، باکتریهای کاتالاز منفی و گرم مثبت کوکسی و باسیلی شکل بودند. ژنوم کامل DNA در ناحیه 16S ریبوزومی این باکتریها به روش واکنش زنجیره ای پلی مرز جهت شناسایی باکتریها در حد گونه تکثیر یافته و بعد از تعیین توالی در بانک اطلاعاتی NCBI مورد مقایسه و شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده شیر مادران حاوی جنسهای مختلف لاکتوباسیل، استرپتوکوکوس و انتروکوکوس بوده که بیشترین باکتری ایزوله شده (۴۷/۵ درصد) مربوط به *Enterococcus faecium* بود که از ۵۰ درصد نمونه های شیر جدا شده بودند. ۱۰ درصد از ایزوله ها *La. rhamnosus Lc 705* و ۲۷/۵ درصد *Streptococcus salivarius* بودند که به ترتیب از ۲۰، ۳۵ درصد از نمونه ای شیر مادر جداسازی شدند.

واژه های کلیدی: شیر مادر، واکنش زنجیره ای پلی مرز، اسید لاکتیک باکتریها، پروبیوتیک

## Isolation and identification of lactic acid bacteria in mother's breast milk using 16S ribosomal DNA sequencing method

F Tabatabaie<sup>1</sup> and L Roozbeh Nasiraii<sup>2\*</sup>

Received: December 28, 2010 Accepted: June 12, 2011

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Lecture, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran

\*Corresponding author: E mail: Leila\_roozbeh@yahoo.com

### Abstract

Human breast milk is known to be the best food for rapidly growing infant since breastfeeding protects the newborn against some disease such as infection disease, asthma and allergy. This effect may be due to the useful and natural microflora of breast milk which could be depending on diets of mothers. For the first time, this study accomplished to evaluate microflora of mother's breast milk along with separation and identification of local bacteria that could be as a candidate for bacteriotherapy and possessing probiotic properties in Iran. In this study, 309 different colonies were isolated from 20 breast milk samples of mothers who were registered in Mashhad. The isolated were selected based on the results of catalase test, gram stain, and bacterial morphology. The results showed that 40 out of 309 selected bacteria were catalase negative and gram positive stain. The whole genomes of 16S ribosomal DNA of isolated colonies were amplified using polymerase chain reaction for identification down to the strain level. According to the results, the breast milk contains various species of *enterococci*, *Streptococci*, *Staphylococci* and *Lactobacilli*. The most abundant bacteria, *enterococcus faecium* was isolated from 50% of samples representing 47.5% of the total isolated bacteria. Generally 10 and 27.5 percentage of isolated bacteria were *La. rhamnosus Lc 705* and *Streptococcus salivarius*, respectively, that were isolated from 20 and 35 percent of milk samples, respectively.

**Keywords:** Breast milk, Polymerase chain reaction, Lactic acid bacteria, Probiotic

### مقدمه

تغییر عمده در فلور میکروبی روده می‌گردد (فاویر و همکاران ۲۰۰۲). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده اند که تغذیه با شیر مادر، نوزادان را در برابر بیماری‌های عفونی، حساسیت‌های جلدی و آسم محافظت می‌کند. این تأثیرات می‌تواند در نتیجه حضور تعدادی از ترکیبات شیر مانند ایمونوگلوبولینها، سلولهای قابلیت دار ایمنی<sup>۱</sup>، ترکیبات ضد میکروبی و عوامل تحریک کننده رشد باکتریهای مفید باشند (مارتین و همکاران ۲۰۰۳). ذوقی

شیر مادر به عنوان یک منبع تغذیه مداوم در ماه‌های اول پس از تولد، می‌تواند عامل عمده در ایجاد و توسعه میکروارگانیزم‌های موجود در روده نوزاد باشد (مارتین و همکاران ۲۰۰۵). برآورد می‌گردد یک نوزاد در روز، حدود ۸۰۰ میلی لیتر شیر مصرف می‌کند که تقریباً حاوی  $10^5-10^7$  عدد از میکروارگانیزم‌های همراه شیر می‌باشد. ترکیب باکتریایی روده نوزاد به میزان زیادی از نوع تغذیه اش تأثیر می‌پذیرد. تغذیه نوزاد با غذاهای جامد که همراه با حذف شیر مادر از غذای نوزاد می‌باشد موجب

متاثر از تغذیه مادران بوده و در هرمنطقه بر اساس شرایط اقلیمی و تغذیه ای خاص خود قابل بررسی است (مارتین و همکاران ۲۰۰۴ و سینکوویس و همکاران ۲۰۰۵). به طوری که سینکووی و همکاران در سال ۲۰۰۷ شیر مادران را در مناطق روستایی و شهری در کشورهای سوئد، اسرائیل، آفریقای جنوبی، ژاپن، پرو، کره و دانمارک از نظر دارا بودن لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکترها مورد بررسی قرار داده و نشان دادند که شیر مادران روستایی حاوی مقادیر لاکتوباسیل بیشتری نسبت به مادران شهری بوده و در شیر مادران در ژاپن و کره مقادیر بیشتری از بیفیدوباکترها وجود دارند. درکل نتایج تحقیقات این دانشمندان حاکی از تفاوت در میزان لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکترها در شیر مادران مناطق مختلف بود (سینکووی و همکاران ۲۰۰۵).

از آنجا که شناسایی باکتریها در حد گونه بر اساس ویژگی های فنوتیپیک به علت تغییرات زیاد خصوصیات بیوشیمیایی (الگوی تخمیر) مشکل است، امروزه مقایسه سکانسهای ژن rDNA روش مناسبی جهت مقایسه فیلوژنتیکی است. پیشرفت روشهای مولکولی به ما اجازه داده است که بتوانیم ژن بلند rDNA را به طور کامل تعیین توالی نماییم و اگر چه سکانسهای اختصاصی گونه معمولاً در نیمه اول 16SrDNA (V3-V1) قرار دارد ولی تعیین توالی کل قطعه ۱/۵ کیلوبایتی می تواند دقت عمل را به مقدار زیادی بالا ببرد (ووز ۱۹۸۷).

لذا با توجه به تاثیر مثبت مصرف شیر مادر در سلامت و ایمنی نوزادان شیر مادر خوار، و تاثیر تغذیه و شرایط محیطی در ترکیبات و از جمله فلور میکروبی شیر مادران مناطق مختلف، انجام این تحقیق با رویکرد بررسی فلور میکروبی شیر مادران ایرانی به منظور جداسازی و شناسایی باکتریهای مفید که می توانند به عنوان کاندیدی جهت اثبات خواص پروبیوتیکی مطرح باشند، جهت توصیه برای استفاده در محصولات غذایی انجام می گیرد، و از آنجا که این باکتریها در صنایع مختلف غذایی، دارویی و مکمل سازی مورد استفاده قرار می گیرند، شناخت و طبقه

(۱۳۷۳) با بررسی رژیم غذایی ۲۵۰ نوزاد که جهت درمان بیماری اسهال به مراکز بهداشتی درمانی شهر تهران مراجعه نموده بودند، شیوع این بیماری را به میزان ۱۴/۳٪ در کودکانی که منحصراً از شیر مادر تغذیه می کنند، ۴۷/۶٪ در شیرتوام خواران و ۶۰/۷٪ در شیرخشک خواران گزارش نمود (ذوقی ۱۳۷۳). این موضوع نیز به اثبات رسیده که فلور طبیعی شیر مادر تا حدود زیادی در جلوگیری از ابتلاء نوزادان به بیماریهای عفونی موثر است و این امر را می توان یکی از دلایل از دست رفتن این خاصیت پس از پاستوریزاسیون شیر بر شمرده (مارتین و همکاران ۲۰۰۴). تاکنون بیشتر تحقیقات بر روی احتمال حضور میکروارگانیزم های بیماریزا در شیر مادر متمرکز گردیده بود تا اینکه از سال ۲۰۰۰ دانشمندان به بررسی پتانسیل باکتریهای جدا شده از شیر مادر به عنوان باکتریهای مناسب جهت باکتریوتراپی پرداختند که عمدتاً این باکتریها از خانواده اسید لاکتیک باکتریها می باشند) هیکیلا و ساریس در سال ۲۰۰۳ و مارتین و همکاران در سال ۲۰۰۴، تحقیقات دیگری نیز از حضور لاکتوباسیل ها و بیفیدوباکترها در شیرمادر حکایت دارد (مارتین و همکاران ۲۰۰۳، ۲۰۰۵، ۲۰۰۷ و سینکوویس و همکاران ۲۰۰۵).

الیوارس و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶، پتانسیل ۴ سویه لاکتوباسیل جدا شده از شیر مادر را در درمان عفونت سالمونلایی روده ای ایجاد شده در نوعی موش آزمایشگاهی بررسی نمودند. نتایج، مبین تاثیر مثبت هر ۴ سویه در کاهش تلفات به میزان ۴۰ تا ۷۰ درصد نسبت به تیمار کنترل بود (الیوارس و همکاران ۲۰۰۶).

از سویی دیگر در سالهای اخیر مقاومت به آنتی بیوتیکهای مختلف منجر به رویکرد جدیدی به باکتریوتراپی گردیده که در این روش از باکتریهای مفید برای جلوگیری از تجمع باکتریهای مضر در روده استفاده می شود. همچنین تنوع فلور میکروبی جدا شده از شیر مادران سالم در مناطق مختلف جغرافیایی می تواند مبین این واقعیت باشد که حضور میکروارگانیسیمهای فوق

MRS agar پاساژ داده شدند. سپس از نظر شکل ظاهری، تست کاتالاز و تست رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفته و باکتریهای کوکسی و باسیلی شکل که کاتالاز منفی و گرم مثبت بودند شناسایی گردیدند. باکتریهای ایزوله شده در محیط مایع MRS کشت داده شده و پس از سانتریفوژ و شستشوی رسوب با بافر نمکی فسفات<sup>۳</sup> (PBS) استریل، در ۲۰۰ میکرولیتر محلول سوکروز ۱۵ درصد استریل، لیوفلیزه گردیده و در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند.

### استخراج DNA

جهت استخراج DNA از کشت ۲۴ ساعته سویه های منتخب، ابتدا به رسوب سلولی شستشو داده شده، ۳۰۰ میکرولیتر از محلول بافر لیزکننده (حاوی ۵۰ میلی مولار سوکروز، ۱۰ میلی مولار EDTA<sup>۴</sup> و ۲۵ میلی مولار Tris-Hcl با PH=۸) و ۱۰ میکرولیتر آنزیم لیزوزیم با غلظت (mg/ml) ۱۰، اضافه گردیده و به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردید. بقیه مراحل استخراج توسط کیت بایونیر کره (USA Bioneer, Inc 1000 atlantic Avenue, ) Alameda, CA 94501 USA) و طبق دستورالعمل ارائه شده برای سلولهای پستانداران انجام گرفت. کیفیت DNA استخراجی توسط ژل الکتروفورز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

### تکثیر قطعه 16SrDNA و شناسایی باکتری

جهت تکثیر قطعه ۱۵۰۰ bp ناحیه 16SrDNA از آغازگرهای پیشرو (5' GAG AGT TTG ATC CTG 3' و پسورد (5' GAA AGG AGG 3' و TGA TCC AGC CG 3') استفاده شد (طاهری و همکاران ۲۰۰۹). واکنش زنجیره ای PCR<sup>۵</sup> با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) انجام گرفته و تمام اجزاء واکنش از شرکت Fermentase خریداری گردید. مخلوط

بندی این گونه از باکتریها در هر محیطی اطلاعات با ارزشی را در اختیار پژوهشگران قرار می دهد.

### مواد و روشها

#### نمونه گیری

در سال ۱۳۸۸، ۲۰ نفر از مادران سالم و شیرده ۲۵ تا ۳۰ ساله، با فرزندان شیرخواره ۲ تا ۶ ماهه و ساکن مشهد به طور داوطلبانه انتخاب شده و پس از آموزشهای لازم نمونه های شیر به شرح ذیل جمع آوری شدند. ابتدا نوک سینه سمت چپ و اطراف آن با صابون و آب استریل شستشو داده شده و سپس با کلرهگزیدین<sup>۲</sup> ضدعفونی گردیده و جهت اطمینان از عمل ضدعفونی از نوک سینه اطراف آن تست سوآپ به عمل آمد. مادران در محیط استریل، در حالی که دستکش استریل به دست داشتند نمونه های شیر را در لوله فالكونهای استریل به گونه ای جمع آوری کردند که نوک سینه با لوله تماس پیدا نکند و جهت اطمینان از عدم آلودگی شیر با کلرهگزیدین، ۲ میلی لیتر اول جدا دوشیده شده و ۵ الی ۱۰ میلی لیتر بعدی به عنوان نمونه اصلی در یخدان نگهداری شده و در کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه منتقل گردید.

#### کشت و جداسازی باکتریها

مقادیر متفاوت از نمونه های شیر (۷۰، ۵۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) به طور مستقیم بر روی محیط کشت غیر اختصاصی MRS (Man Rogosa and Sharp) agar جهت جداسازی لاکتوباسیلیها و M17 که حاوی (w/v) ۰/۱٪ گلوکز بود، جهت جداسازی بهتر لاکتوکوکوسها، استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها کشت داده شده و جهت حمایت از رشد اسید لاکتیک باکتریها در شرایط کاملاً بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت گرمخانه گذاری شدند. کلنی های متفاوت از هر پلیت به طور تصادفی انتخاب شده و جهت دستیابی به کلنی خالص چندین بار روی محیط کشت

3-Phosphate Buffer Saline

4- Ethylen diamine tetraacetic

5-Polymerase Chain Reaction

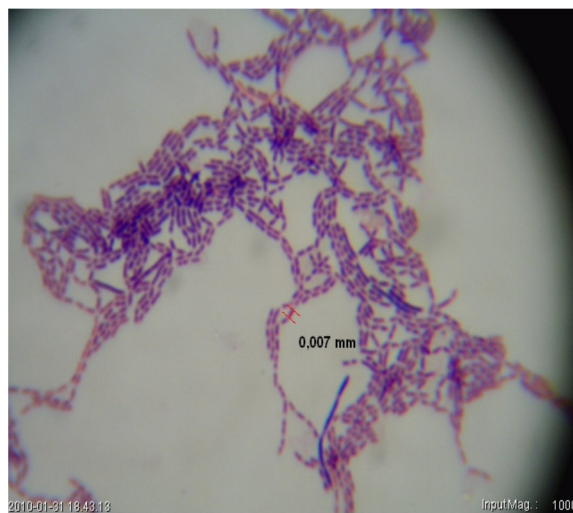
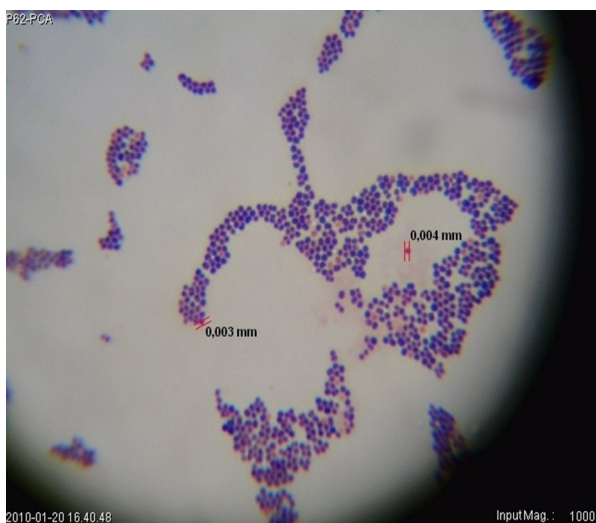
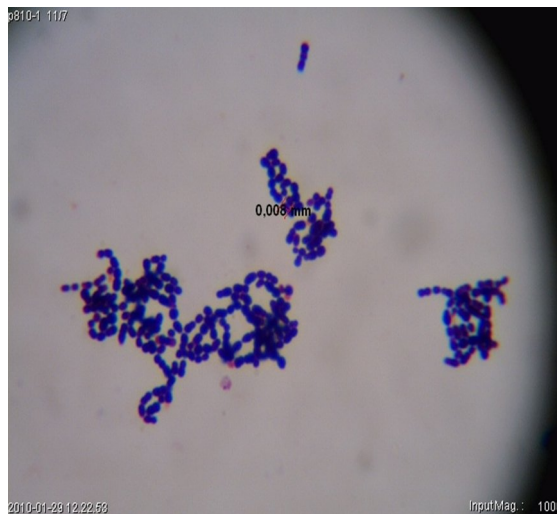
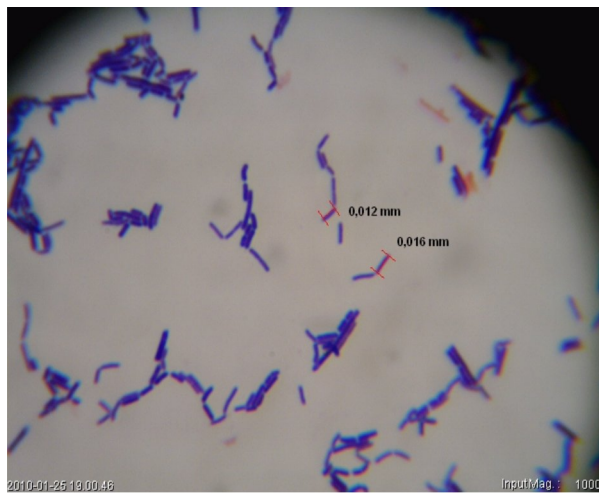
2-chlorhexidine

پس از تایید بر روی ژل الکتروفورز ( شکل ۲ ) ، به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلی مرز مورد استفاده قرار گرفتند. محصول واکنش PCR که باید bp ۱۵۰۰ باشد، پس از تایید روی ژل الکتروفورز ۱٪ ( شکل ۳ )، جهت تعیین توالی ارسال شده و در نهایت با ترادف ژنی آنها ۴۰ سوش در حد گونه شناسایی شدند (جدول ۱). با توجه به نتایج بدست آمده شیر مادران حاوی جنسهای مختلف لاکتوباسیل ، استرپتوکوکوس و انتروکوکوس بوده که در این تحقیق انواع گونه های مختلف *Enterococcus faecium* ، *salivarius* ، *Lactobacillus* و تنه ها گونه *Streptococcus rhamnosus* Lc 705 شناسایی گردیدند. در مجموع ۱۰٪ از باکتریهای ایزوله شده *Lactobacillus rhamnosus* بوده که از ۲۰٪ نمونه های شیر ایزوله شد و ۳۰٪ استرپتوکوکوس (۲۷/۵٪ *Streptococcus salivarius*) از ۳۵ درصد نمونه ها ، و ۴۷/۵ درصد *Enterococcus faecium* بود که از ۵۰ درصد نمونه های شیر مادر ایزوله گردیدند.

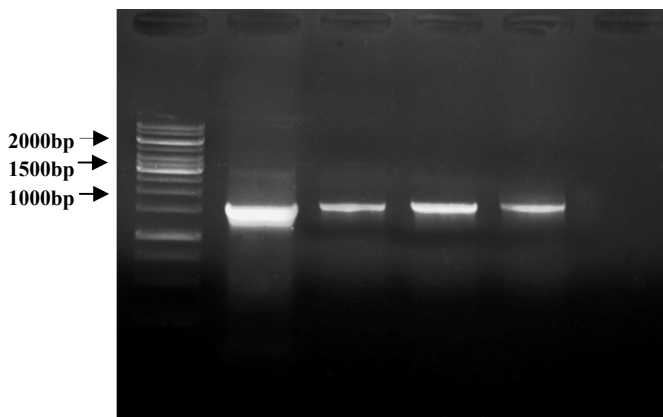
واکنش ( ۲۰ میکرولیتر ) حاوی ۲ میکرولیتر بافر PCR ( ۱۰× ) ، ۱ میکرولیتر از مخلوط دی اکسی ریبونوکلوئید تری فسفات ( ۱۰ میلی مولار ) ، ۱/۲ میکرولیتر کلرید منیزیم ( ۵۰ میلی مولار )، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر ( ۱۰ پیکومول )، ۳ میکرولیتر از DNA الگو و ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA polymerase بود. واکنش زنجیره ای پلی مرز در شرایط دمایی ۱ سیکل به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد و ۳۵ سیکل با برنامه دمایی ۱ دقیقه در ۹۵ رجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۵۳ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت ۱ سیکل به مدت ۳ دقیقه در ۷۳ درجه سانتی گراد انجام شد. محصولات PCR روی ژل الکتروفورز ۱ درصد تفکیک شده و باندهای مورد نظر از روی ژل بریده شده و به میکروتیوپهای ۱/۵ منتقل گردیدند. استحصال مجدد DNA از ژل با استفاده از کیت استخراج DNA بایونیر کره ( USA Bioneer, Inc. 1000 atlantic Avenue, Alameda, CA 94501 USA ) انجام شد. تعیین توالی قطعه تکثیر شده توسط شرکت SeqLab (Gttingen, Germany) انجام گردید. ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتی BLAST<sup>۶</sup> مورد مقایسه قرار گرفته و باکتریها در حد گونه شناسایی شدند.

### نتایج و بحث

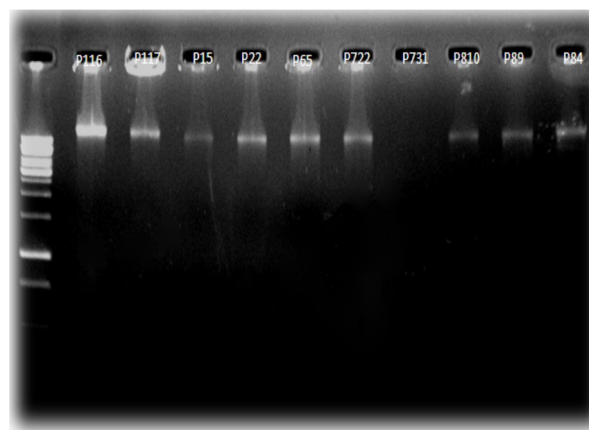
در این مطالعه ۳۰۹ کلنی متفاوت از ۲۰ نمونه شیر مادر جداسازی شدند. ۴۰ کلنی از ۳۰۹ کلنی بررسی شده باکتریهای کاتالاز منفی و گرم مثبت کوکسی و باسیلی شکل بودند ( شکل ۱ )، که جهت شناسایی نگهداری شدند. البته تعداد محدودی از ۴۰ باکتری ایزوله شده تست کاتالازشان مشکوک بود که جهت شناسایی دقیقتر مورد بررسی قرار گرفتند. DNA باکتریهای فوق استخراج و



شکل ۱: باکتریهای کاتالاز منفی که گرم مثبت و باسیلی یا کوکسی شکل بوده و جهت شناسایی انتخاب گردیدند



شکل ۳: محصولات PCR، (۱) مارکر ۱ kb، (۲-۵) نمونه های محصول PCR (۱۵۰۰ bp)، (۶) کنترل منفی



شکل ۲: نمونه هایی از DNA استخراج شده از باکتریها

جدول ۱- شناسایی ۴۰ باکتری ایزوله شده از ۲۰ نمونه شیر مادران سالم

گونه باکتری	کد ژنتیکی	درصد تشابه	تعداد ایزوله ها (%)	تعداد نمونه شیر مادر (%)
<b>Enterococcus</b>				
<i>Enterococcus faecium strain HN-N35</i>	FJ378690.1	۹۹	(۱۵)۶	۵
<i>Enterococcus faecium strain HN-N35</i>	FJ378690.1	۹۷	(۷/۵)۳	۲
<i>Enterococcus faecium strain HN-N17</i>	FJ378672.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain R8</i>	EU483112.1	۹۹	(۵)۲	۲
<i>Enterococcus faecium strain HN-N25</i>	FJ378680.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain G130</i>	EF204316.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain IMAU60169</i>	FJ749883.1	۹۹	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain R8</i>	EU483112.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain HN-N32</i>	FJ378658.2	۹۷	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain HN-F22</i>	FJ378707.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
<i>Enterococcus faecium strain HN-F22</i>	FJ378707.1	۹۹	(۲/۵)۱	۱
<b>Total</b>			(۴۷/۵)۱۹	(۵۰)۱۰
<b>Streptococcus</b>				
<i>Streptococcus sp. MVI</i>	GU045364.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
<i>Streptococcus salivarius strain CCUG 25922</i>	FJ154800.1	۹۷	(۷/۵)۳	۲
<i>Streptococcus salivarius strain 735-09</i>	GU175444.1	۹۶	(۲۰)۸	۵
<b>Total</b>			(۳۰)۱۲	(۳۵)۷
<b>Staphylococcus</b>				
<i>Staphylococcus epidermidis strain MB</i>	FJ768459.1	۹۹	(۱۲/۵)۵	(۲۰)۴
<b>Lactobacillus</b>				
<i>Lactobacillus rhamnosus Lc 705</i>	FM179323.1	۹۹	(۱۰)۴	(۲۰)۴
<b>Total</b>			۴۰	۲۰

ویژگیهای آنها بپردازند. در این راستا ما نیز در تحقیق خود توانستیم گونه های مختلف خانواده اسید لاکتوباکتریاسه را شناسایی نماییم. البته در تحقیق حاضر، برای عدم دادن سوشهای مورد نظر تا حد امکان، بعضی از باکتریهای که تست منفی کاتالاز آنها مشکوک بود نیز برای شناسایی انتخاب شدند و در نهایت

رویکرد جدید مجامع علمی به باکتریوتراپی و استفاده از باکتریهای مفید برای جلوگیری از تجمع باکتریهای مضر روده و تقویت سیستم ایمنی، که عمدتاً از خانواده اسید لاکتیک باکتریها می باشند، موجب شده است تا از سال ۲۰۰۰ توجه دانشمندان معطوف به ایزوله نمودن و شناسایی فلور میکروبی مفید شیر مادر شده و به بررسی

نتایج مولکولی نشان داد که از جنس *Staphylococcus epidermidis* می باشند (جدول ۱) که برخلاف استرپتوکوکوسها کاتالاز مثبت بوده و به خانواده میکروکوکاسه تعلق دارند و این ویژگی وجه تمایز این دو جنس باکتریایی می باشد. مارتین و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که در سوشهای شناسایی شده در ۸ نمونه شیر مادر، *Staphylococcus epidermidis* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص می دهد (مارتین و همکاران ۲۰۰۷). هیکیلا و ساریس نیز در سال ۲۰۰۳ با بررسی فلور میکروبی ۴۰ نمونه شیر مادر و ۵۰۹ کلنی جدا شده از این نمونه ها گزارش نمودند که بیشترین فلور جدا شده (۶۴٪) مربوط به گونه استافیلوکوکها می باشد که از نمونه شیر ۳۹ نفر از مادران ایزوله گردیده است و در بین گونه های مختلف *Staphylococcus epidermidis* گونه غالب بوده که ۵۰ درصد از ۶۴ درصد را به خود اختصاص می دهد. بنابراین با توجه به فراوانی بالای استافیلوکوکوسها در شیر مادر و درجه اطمینانی که ما در آزمایشات خود مد نظر قرار دادیم حضور این جنس در بین ایزوله ای شناسایی شده قابل توجه می باشد. هیکیلا و ساریس در ادامه نتایج خود نشان دادند که استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها به ترتیب ۳۰٪ و ۷/۵٪ ایزوله ها را بخود اختصاص داده اند که به ترتیب از ۲۹ و ۳ نمونه شیر مادر جدا گشته اند و گونه *Strep. Salivarius* و *Enterococcus faecalis* به ترتیب فراوانترین استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها در بین گونه های شناسایی شده، تشخیص داده شدند. گونه های مختلف

*Lactobacillus rhamnosus* را جداسازی نماییم ، در تحقیقات هیکیلا و ساریس نیز تنها ۰/۹ درصد سوشهای ایزوله شده که از ۲ نمونه شیر مادر (از ۴۰ نمونه) جداسازی شده بودند، *Lactobacillus rhamnosus* می باشند (هیکیلا و ساریس ۲۰۰۳). مارتین و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ توانستند از جنس لاکتوباسیلوس، تنها لاکتوباسیلوس پلانتروم را در شیر مادران شناسایی نمایند، در عین حال سایر گونه های شناسایی شده در تحقیق ما با یافته های آنها مطابقت داشت (مارتین و همکاران ۲۰۰۷).

محققین دیگری نیز انواع استافیلوکوکها ، استرپتوکوکوسها، میکروکوکوسها ، لاکتوباسیلوسها و انتروکوکوسها را در شیر مادران شناسایی کرده اند که ایزوله ای ما نیز با بعضی از آنها مطابقت دارد ( اندیمن و همکاران ۱۹۷۹، مارتین و همکاران ۲۰۰۷، وت و همکاران ۱۹۷۹ و رایت و فنی ۱۹۹۸). به طوری که مارتین و همکارانش در سال ۲۰۰۳ دو سوش *Enterococcus faecium* و *Lactobacillus gasseri* را به عنوان دو سوش غالب در شیر مادران اسپانیایی گزارش نمودند.

از طرفی تحقیقات زیادی بر روی این گروه از باکتریهای ایزوله از شیر مادر انجام شده است که نشان می دهد می توانند خواص باکتریهای پروبیوتیکی داشته باشند (مارتین و همکاران ۲۰۰۳، ۲۰۰۵ و اکساز ۲۰۰۳). در این راستا مارتین و همکاران در سال ۲۰۰۵ خواص پروبیوتیکی سویه های *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus fermentum* را که از شیر مادران اسپانیا جدا شده بودند بررسی نموده و نشان دادند که میکروارگانیسمهای مذکور قادر به تحمل شرایط اسیدی معده بوده و با مدلسازی انجام شده در حدود ۷۰٪ قابلیت بقاء را در زمان مصرف خوراکی دارند. مقاومت این باکتریها نسبت به آنتی بیوتیکها و قابلیت اتصال آنها به سلولهای HT-29 و Caco-2 جدار روده نیز مورد ارزیابی و تایید قرار گرفت (مارتین و همکاران ۲۰۰۵). در تحقیق دیگری که

*Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactococcus lactis*, و *Leuconoctoc mesenteroides* نیز در مجموع در ۵/۱۲٪ نمونه ها شناسایی گردیدند ( هیکیلا و ساریس ۲۰۰۳). همانطور که ما نیز در تحقیقات خود توانستیم از درصد کمی از شیر مادران ( ۴ نمونه از ۲۰ نمونه)

نتایج مولکولی نشان داد که از جنس *Staphylococcus epidermidis* می باشند (جدول ۱) که برخلاف استرپتوکوکوسها کاتالاز مثبت بوده و به خانواده میکروکوکاسه تعلق دارند و این ویژگی وجه تمایز این دو جنس باکتریایی می باشد. مارتین و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که در سوشهای شناسایی شده در ۸ نمونه شیر مادر، *Staphylococcus epidermidis* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص می دهد (مارتین و همکاران ۲۰۰۷). هیکیلا و ساریس نیز در سال ۲۰۰۳ با بررسی فلور میکروبی ۴۰ نمونه شیر مادر و ۵۰۹ کلنی جدا شده از این نمونه ها گزارش نمودند که بیشترین فلور جدا شده (۶۴٪) مربوط به گونه استافیلوکوکها می باشد که از نمونه شیر ۳۹ نفر از مادران ایزوله گردیده است و در بین گونه های مختلف *Staphylococcus epidermidis* گونه غالب بوده که ۵۰ درصد از ۶۴ درصد را به خود اختصاص می دهد. بنابراین با توجه به فراوانی بالای استافیلوکوکوسها در شیر مادر و درجه اطمینانی که ما در آزمایشات خود مد نظر قرار دادیم حضور این جنس در بین ایزوله ای شناسایی شده قابل توجه می باشد. هیکیلا و ساریس در ادامه نتایج خود نشان دادند که استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها به ترتیب ۳۰٪ و ۷/۵٪ ایزوله ها را بخود اختصاص داده اند که به ترتیب از ۲۹ و ۳ نمونه شیر مادر جدا گشته اند و گونه *Strep. Salivarius* و *Enterococcus faecalis* به ترتیب فراوانترین استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها در بین گونه های شناسایی شده، تشخیص داده شدند. گونه های مختلف

نتایج مولکولی نشان داد که از جنس *Staphylococcus epidermidis* می باشند (جدول ۱) که برخلاف استرپتوکوکوسها کاتالاز مثبت بوده و به خانواده میکروکوکاسه تعلق دارند و این ویژگی وجه تمایز این دو جنس باکتریایی می باشد. مارتین و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۷ نشان دادند که در سوشهای شناسایی شده در ۸ نمونه شیر مادر، *Staphylococcus epidermidis* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص می دهد (مارتین و همکاران ۲۰۰۷). هیکیلا و ساریس نیز در سال ۲۰۰۳ با بررسی فلور میکروبی ۴۰ نمونه شیر مادر و ۵۰۹ کلنی جدا شده از این نمونه ها گزارش نمودند که بیشترین فلور جدا شده (۶۴٪) مربوط به گونه استافیلوکوکها می باشد که از نمونه شیر ۳۹ نفر از مادران ایزوله گردیده است و در بین گونه های مختلف *Staphylococcus epidermidis* گونه غالب بوده که ۵۰ درصد از ۶۴ درصد را به خود اختصاص می دهد. بنابراین با توجه به فراوانی بالای استافیلوکوکوسها در شیر مادر و درجه اطمینانی که ما در آزمایشات خود مد نظر قرار دادیم حضور این جنس در بین ایزوله ای شناسایی شده قابل توجه می باشد. هیکیلا و ساریس در ادامه نتایج خود نشان دادند که استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها به ترتیب ۳۰٪ و ۷/۵٪ ایزوله ها را بخود اختصاص داده اند که به ترتیب از ۲۹ و ۳ نمونه شیر مادر جدا گشته اند و گونه *Strep. Salivarius* و *Enterococcus faecalis* به ترتیب فراوانترین استرپتوکوکوسها و انتروکوکوسها در بین گونه های شناسایی شده، تشخیص داده شدند. گونه های مختلف



به اثبات رساندند ( ایتون و گاسون ۲۰۰۱). لذا *Enterococcus faecium* ایزوله شده از شیر مادر که در تحقیق حاضر بالاترین درصد فراوانی را به خود اختصاص داده است، علاوه بر بررسی خواص پروبیوتیکی می بایست از نظر عدم بیماریزایی نیز مورد بررسی و مطالعه قرار گیرد. با توجه به تحقیقات انجام شده شیر مادران سالم می تواند به عنوان منبعی از اسید لاکتیک باکتریهای پروبیوتیکی مورد توجه باشد که ممکن است نقش مهمی در پیشگیری ابتلاء نوزادان به بیماریهای عفونی داشته باشد.

### نتیجه گیری

با توجه به جداسازی و شناسایی باکتریهای بومی که می توانند به عنوان کاندیدی جهت اثبات خواص پروبیوتیکی مطرح باشند، به خصوص از منبع سالم و با ارزشی مانند شیر مادر و با توجه به نقش موثر باکتریهای پروبیوتیک در سلامت انسان، می توان امیدوار بود که بتوان با اثبات خواص پروبیوتیکی و درمانی چنین سویه هایی که با شرایط فیزیولوژیک بدن و موکوس روده افراد منطقه نیز سازگاری بیشتری دارند، قدمی موثر در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند<sup>۷</sup> جهت افراد جامعه به خصوص نوزادان برداشت.

### تقدیر و تشکر

مقاله فوق مستخرج از طرح پژوهشی با شماره تصویب ۳۸۶ پ مورخ ۸۸/۱۰/۱۳، در معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد بوده و بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر خود را از همکاری آن معاونت اعلام می دارد.

توسط این دانشمندان در سال ۲۰۰۶ انجام گردید پتانسیل پروبیوتیکی *Lactobacillus salivarius* CECT 5713، که از شیر مادر و مدفوع نوزاد جدا شده بود، مورد بررسی و تایید قرار گرفت (مارتین و همکاران ۲۰۰۶). الیوارس و همکارانش نیز پتانسیل ۴ سویه لاکتوباسیل جدا شده از شیر مادر را در درمان عفونت سالمونلایی روده ای ایجاد شده در نوعی موش آزمایشگاهی بررسی نمودند. نتایج، مبین تاثیر مثبت هر ۴ سویه در کاهش تلفات به میزان ۴۰ تا ۷۰ درصد نسبت به تیمار کنترل بود (الیوارس و همکاران ۲۰۰۶). ادامه تحقیقات هیکلا و ساریس نیز مبین تولید مواد ضد میکروبی و ممانعت کننده از رشد *Staphylococcus aureus* توسط بسیاری از سویه های جدا شده از شیر مادر بود که از ویژگیهای باکتریهای پروبیوتیک می باشد (هیکلا و ساریس ۲۰۰۳). در گزارشی که در سال ۲۰۰۶ منتشر گردید شرکت اسپانیایی Puleva Biotech's مدعی شد اولین فراورده لبنی تخمیری را با استفاده از *Lactobacillus gasseri* جدا شده از شیر مادر، در جهت تقویت سیستم ایمنی مصرف کنندگان تولید نموده است (هالیدی ۲۰۰۶).

هاتاكا و همکاران در سال ۲۰۰۸ و میلیوما و همکاران در سال ۲۰۰۷، *Lactobacillus rhamnosus* Lc 705 و چیلکوت و همکاران در سال ۲۰۰۵ و سومالاینین ۲۰۰۸، *Streptococcus salivarius* را که در این تحقیق شناسایی شده اند، مورد مطالعه قرار داده و آنها را به عنوان سوشهای پروبیوتیکی معرفی نموده اند (چیلکوت و همکاران ۲۰۰۵، هاتاكا و همکاران ۲۰۰۸، میلیوما و همکاران ۲۰۰۷ و سومالاینین ۲۰۰۸).

هر چند انتروکوکوسها در بسیاری از محصولات غذایی تخمیری سنتی وجود داشته و دارای سابقه کاربرد ایمن و بی خطری در محصولات تجاری هستند اما استفاده از آنها به عنوان باکتریهای پروبیوتیک نیازمند بررسی دقیق ایمنی و عدم بیماریزایی آنها می باشد. به طوری که ایتون و گاسون نیز در تحقیقات خود عدم بیماریزایی *Enterococcus faecium* ایزوله شده از شیر مادران را

## منابع مورد استفاده

- ذوقی ک، ۱۳۷۳. بررسی مقایسه ای میزان شیوع اسهال در کودکان صفر تا یکسال با الگوهای منتخب شیردهی مراجعه کننده به مراکز بهداشتی درمانی شهر تهران سال ۱۳۷۳. پایان نامه کارشناسی ارشد. گروه پرستاری و مامایی. دانشگاه علوم پزشکی تهران. دانشکده پرستاری و مامایی
- Chilcott C N, Moore C J, Speiser G A and Tagg J R, 2005. Preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *Journal of Applied Microbiology* .100: 754-764.
- Eaton T, Gasson MJ, 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 67:1628-35.
- Eidelman A I and Szilagyi G, 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. *Obstetrics and Gynecology*. 53: 550-552.
- Favier C F, Vaughan E E and et al, 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*. 68(1):219-226.
- Halliday J, Puleva Biotech's human milk probiotic debuts in Spain. Available at: <http://www.foodnavigator-usa.com/news> .( Feb 2006. Ref Type: Electronic Citation)
- Hatakka K, Mutanen M, Reetta H, Saxelin M and Korpela R, 2008. *Lactobacillus rhamnosus* LC705 Together with *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS Administered in Capsules Is Ineffective in Lowering Serum Lipids. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(4): 441-447.
- Heikkila M p and Saris P E, 2003: Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *Journal Applied of Microbiology*. 95(3):471-478.
- Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiminez E, Marin M L, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM and et al, 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *Journal of Pediatrics*, 143(6):754-758.
- Martin R, Reviriego C, Jiminez E, Marin M L, Xaus J, Fernandez and et al, 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 121-127.
- Martin R, Olivares M, Marin M L, Fernandez L, Xaus J, Rodriguez J M, 2005. Probiotic potential of 3 *Lactobacilli* strains isolated from breast milk. *Journal of Human Lactation*, 21(1):8-17.
- Martin R, Jiménez E, Olivares M, Marín M L, Fernández L, Xaus J, Rodríguez J M, 2006. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *International Journal of Food Microbiology*, 112(1) :35-43.
- Martin R, Heilig H G, Zoetendal E G, Jimenez E, Fernandez L, Smidt H, 2007. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Research in Microbiology*, 158(1):31-37.
- Myllyluoma E, Kajander K, Mikkola H, Kyronpalo S, Rasmussen M, Kankuri E. and et al, 2007. Probiotic intervention decreases serum gastrin-17 in *Helicobacter pylori* infection. *Digestive and Liver Disease*. 39:516-523.
- Olivares M, Diaz-Ropero M P, Martin R, Rodriguez J M, Xaus, J, 2006. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1):72-79.

- Sinkiewicz G and Nordstrom E, 2005. Occurrence of *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* in human breast milk. *Pediatric Research*, 58(2):415.
- Suomalainen T, Sigvart-Mattila P, Matto J, Tynkkynen S, 2008. In vitro and in vivo gastrointestinal survival, antibiotic susceptibility and genetic identification of *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *shermanii* JS. *International Dairy Journal*, 18: 271–278.
- Taheri H R, Moravej H, Tabandeh F, Zaghari M, Shivazad M, 2009. Screening of lactic acid bacteria toward their selection as a source of chicken probiotic. *Poult Sci*, 88(8):1586-1593.
- West P A, Hewitt J H, Murphy O M, 1979. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *Journal of Applied Bacteriology*, 46(2):269-277.
- Wose C R, 1987. Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 51:221-271
- Wright K C, Fenny A M, 1998. The bacteriological screening of donated human milk: Laboratory experience of British Paediatric Association's published guidelines. *Journal of Infection*, 36: 23–27.
- Xaus J, Martin R, Olivares M, Langa S, Reviriego C, Boza and et al, 2003. Human breast milk is a source of probiotics. In NFIF2003. New Functional Ingredients and Foods. Safety, Health and Convenience, EFFoST Meeting, Copenhagen, (9–11 April 2003).