Archive of SID

نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۱ شماره ۲/ سال ۱۳۹۰

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

فریده طباطبایی[۱] و لیلا روزبه نصیرائی[۲*]

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 همچنین 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 و 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 مراز 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 مراز ، اسید لاکتیک باکتریها، پروبیوتیک

www.SID.ir

Archive of SID

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

F Tabatabaie[1] and L Roozbeh Nasiraii[2*]

Received: December 28, 2010 Accepted: June 12, 2011
[1]Assistatnt Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
[2]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 scince breastfeeding protects the newborn against some diesease 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 sepration and identification of local bacteria that could be as a candidat 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 Mshhad. 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

شیر مادر به عنوان یک منبع تغذیه مداوم در ماه های اول پس از تولد، می تواند عامل عمده در ایجاد و توسعه میکروارگانیسم های موجود در روده نوزاد باشد (مارتین و همکاران ۲۰۰۵). برآورد می گردد یک نوزاد در روز، حدود ۸۰۰ میلی لیتر شیر مصرف می کند که تقریبا حاوی $۱۰^{۵}$-$۱۰^{۷}$ عدد از میکروارگانیسم های همراه شیر می باشد. ترکیب باکتریایی روده نوزاد به میزان زیادی از نوع تغذیه اش تاثیر می پذیرد.تغذیه نوزاد با غذاهای جامد که همراه با حذف شیر مادر از غذای نوزاد می باشد موجب تغییر عمده در فلور میکروبی روده می گردد (فاویر و همکاران ۲۰۰۲). علاوه بر این، تحقیقات نشان داده اند که تغذیه با شیر مادر ، نوزادان را در برابر بیماریهای عفونی ، حساسیت های جلدی و آسم محافظت می کند. این تاثیرات می تواند در نتیجه حضور تعدادی از ترکیبات شیر مانند ایمونوگلوبولینها، سلولهای قابلیت دار ایمنی[۱] ، ترکیبات ضد میکروبی وعوامل تحریک کننده رشد باکتریهای مفید باشند (مارتین و همکاران ۲۰۰۳). ذوقی

1-Immunocompetent Cell

www.SID.ir

Archive of SID

(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 منحصرا 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 شمرد (مارتین و همکاران ۲۰۰۴). تاکنون بیشتر تحقیقات برروی 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 عمدتا 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 تاثیرمثبت 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 میکروارگانیسمهای فوق 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 درشیر 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 بلندrDNA را به طور کامل تعیین توالی نماییم و اگر چه سکانسهای اختصاصی گونه معمولا در نیمه اول 16SrDNA (V1-V3) 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 کلرهگزدین[2] ضدعفونی گردیده و جهت اطمینان از عمل ضدعفونی از نوک سینه و 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 فالکونهای استریل به گونه ای جمع آوری کردند که نوک سینه با لوله تماس پیدا نکند و جهت اطمینان از عدم آلودگی شیر با کلرهگزدین، 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 (۵۰، ۷۰ و ۱۰۰ میکرولیتر) به طور مستقیم بر روی محیط کشت غیر اختصاصی MRS (Man Rogosa and Sharp) agar جهت جداسازی لاکتوباسیلها 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 کاملا بی هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۷۲-۴۸ 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 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 فسفاته [3](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[4] 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 الکترفورز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفتومتر مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر قطعه 16SrDNA و شناسایی باکتری

جهت تکثیرقطعه bp ۱۵۰۰ ناحیه 16SrDNA از آغازگرهای پیشرو (5′ GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG 3′) و پسنورد (5′ GAA AGG AGG TGA TCC AGC CG 3′) استفاده شد (طاهری و همکاران ۲۰۰۹). واکنش زنجیره ای [5]PCR با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) انجام گرفته و تمام اجزاء واکنش از شرکت Fermentase خریداری گردید . مخلوط

2-chlorhexidine

3-Phosphate Buffer Saline
4- Ethylen diamine tetraacetic
5-Polymerase Chain Reaction

www.SID.ir

Archive of SID

واکنش (۲۰ میکرولیتر) حاوی ۲ میکرولیتر بافرPCR (۱۰x) ، ۱ میکرولیتر از مخلوط دی اکسی ریبونوکلئوتید تری فسفات (۱۰ میلی مولار) ، ۱/۲ میکرولیتر کلرید منیزیوم (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 مراز در شرایط دمایی ۱ سیکل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و ۳۵ سیکل با برنامه دمایی ۱ دقیقه در ۹۵ رجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد و در نهایت ۱ سیکل به مدت ۳ دقیقه در دمای 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[۶] مورد مقایسه قرار گرفته و باکتریها در حد گونه شناسایی شدند.

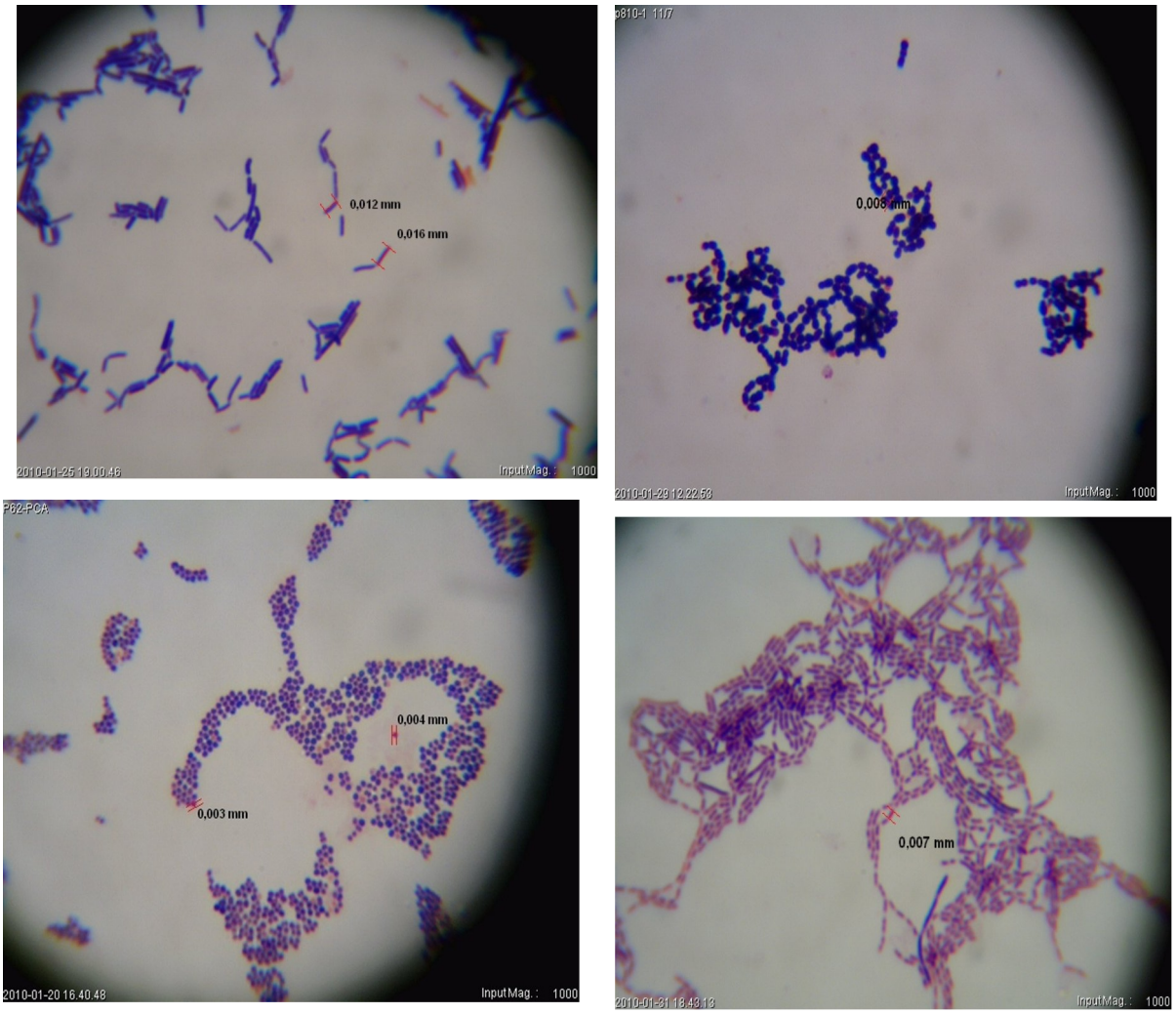
نتایج و بحث

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 پس ازتایید بر روی ژل الکتروفورز (شکل ۲) ، به عنوان الگو در واکنش زنجیره ای پلی مراز مورد استفاده قرار گرفتند. محصول واکنش PCR که باید ۱۵۰۰ bp باشد، پس از تایید روی ژل الکتروفورز ۱٪ (شکل۳)، 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 Streptococcus* و تنها گونه *Lactobacillus 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.

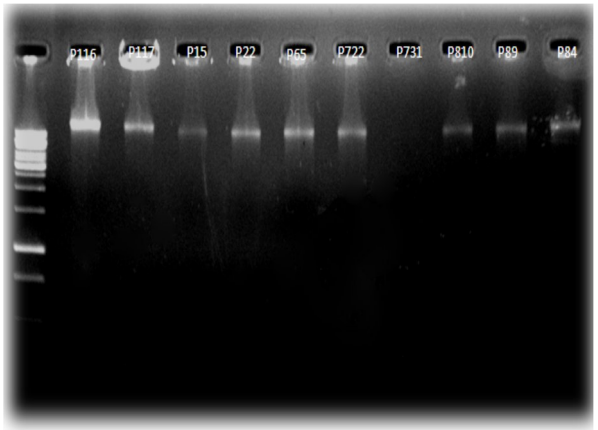
6-Blast Local Alignment Search Tool (http://www.ncbi,nlm.nih.gov/BLAST/).

www.SID.ir

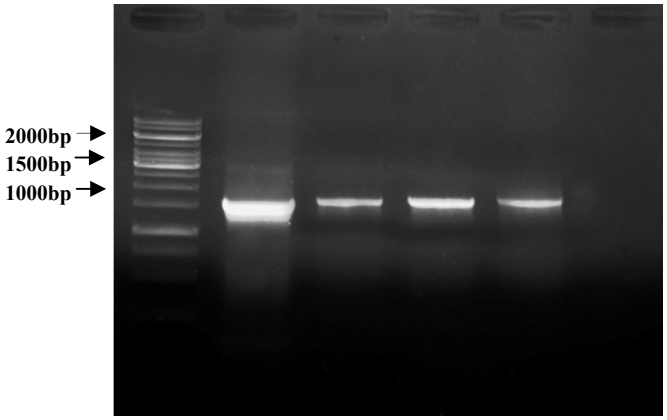
Archive of SID



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



شکل ۲ : نمونه هایی از DNA استخراج شده از باکتریها



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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول۱- شناسایی ۴۰ باکتری ایزوله شده از ۲۰ نمونه شیر مادران سالم

گونه باکتری	کد ژنتیکی	درصد تشابه	تعداد ایزوله ها(٪)	تعداد نمونه شیر مادر(٪)
Enterococcus				
Enterococcus faecium strain HN-N35	FJ378690.1	۹۹	(۱۵)۶	۵
Enterococcus faecium strain HN-N35	FJ378690.1	۹۷	(۷/۵)۳	۲
Enterococcus faecium strain HN-N17	FJ378672.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain R8	EU483112.1	۹۹	(۵)۲	۲
Enterococcus faecium strain HN-N25	FJ378680.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain G130	EF204316.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain IMAU60169	FJ749883.1	۹۹	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain R8	EU483112.1	۱۰۰	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain HN-N32	FJ378658.2	۹۷	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain HN-F22	FJ378707.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
Enterococcus faecium strain HN-F22	FJ378707.1	۹۹	(۲/۵)۱	۱
Total			(۴۷/۵)۱۹	(۵۰)۱۰
Streptococcuss				
Streptococcussp. MV1	GU045364.1	۹۷	(۲/۵)۱	۱
Streptococcus salivarius strain CCUG 25922	FJ154800.1	۹۷	(۷/۵)۳	۲
Streptococcus salivarius strain 735-09	GU175444.1	۹۶	(۲۰)۸	۵
Total			(۳۰)۱۲	(۳۵)۷
Staphylococcus				
Staphylococcus epidermidis strain MB	FJ768459.1	۹۹	(۱۲/۵)۵	(۲۰)۴
Lactobacillus				
Lactobacillus rhamnosus Lc 705	FM179323.1	۹۹	(۱۰)۴	(۲۰)۴
Total			۴۰	۲۰

رویکرد جدید مجامع علمی به باکتریوتراپی و استفاده از باکتریهای مفید برای جلوگیری از تجمع باکتریهای مضر روده و تقویت سیستم ایمنی، که عمدتا 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 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 از دست دادن سوشهای مورد نظر تا حد امکان، بعضی از باکتریهایی که تست منفی کاتالاز آنها مشکوک بود نیز برای شناسایی انتخاب شدند و در نهایت

www.SID.ir

Archive of SID

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 باشد۰ مارتین و همکارنش 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 توجیه می باشد.

هیکیلا و ساریس در ادامه نتایج خود نشان دادند که استرپتوکوکوس ها 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, Lactbacillus 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) *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 همکارنش نیز در سال ۲۰۰۷ توانستند از جنس لاکتوباسیلوس، تنها لاکتوباسیلوس پلانتاروم 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 ۱۹۷۹و رایت و فنی ۱۹۹۸). به طوری که مارتین و همکارانش در سال ۲۰۰۳ دو سوش *Lactobacillus gasseri* و*Enterococcus facium* 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، ۲۰۰۵و 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

www.SID.ir

Archive of SID

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 تاثیرمثبت هر ۴ سویه در کاهش تلفات به میزان ۴۰ تا ۷۰ درصد نسبت به تیمار کنترل بود(الیوارس و همکاران ۲۰۰۶). ادامه تحقیقات هیکیلا و ساریس نیز مبین تولید مواد ضدمیکروبی و ممانعت کننده از رشد *Staphylococcus aureus* توسط بسیاری از سویه های جداشده از شیر مادر بود که از ویژگیهای باکتریهای پروبیوتیک می باشد (هیکیلا 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).

هاتاکا و همکاران در سال ۲۰۰۸ و میلیلوما و همکاران در سال ۲۰۰۷، *Lactobacillus rhamnosus Lc 705* و چیلکوت و همکاران در سال ۲۰۰۵ و سومالاینین ۲۰۰۸ ، *Streptococcus salivariu* را که در این تحقیق شناسایی شده اند ، مورد مطالعه قرار داده و آنها را به عنوان سوشهای پروبیوتیکی معرفی نموده اند (چیلکوت و همکاران۲۰۰۵، هاتاکا و همکاران ۲۰۰۸، میلیلوما 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 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[7] جهت افراد جامعه به خصوص نوزادان برداشت.

تقدیر و تشکر

مقاله فوق مستخرج از طرح پژوهشی با شماره تصویب ۳۸۶پ 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 می‌دارد.

7- Functional food

www.SID.ir

Archive of SID

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 Enviromental of Microbiology. 67:1628-35.

Eidelman A I and Szilagyi G, 1979. Patterns of bacterial colonization of human milk. ObstetricsandGynecology. 53: 550–552.

Favier C F, Vaughan E E and et al, 2002. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appllid and Enviromental 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 humanmilk: 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.

Martín 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.

www.SID.ir

Archive of SID

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,Healthand Convenience, EFFoST Meeting, Copenhagen,(9–11 April 2003).

www.SID.ir