شناسایی و جداسازی اسیدلاکتیک باکتری‌ها از شیر مادر به روش مولکولی

مازیار کرمی[۱]، **فرزانه تفویضی**[۲]، پروانه جعفری[۳]، مریم تاج آبادی ابراهیمی[۴]

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک،اراک، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند، تهران، ایران،

Farzanehtafvizi54@gmail.com

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات اراک، اراک، ایران

۴. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۱۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۹

Archive of SID

چکیده

شیر مادر به‌عنوان تنها منبع تغذیه در ماه‌های اول پس از تولد، می‌تواند عامل مهمی در و توسعه میکروارگانیسم‌های موجود در روده نوزاد باشد. بنا به اهمیت باکتری‌های اسیدلاکتیک به خصوص لاکتوباسیل‌ها در سلامت انسان، شناسایی مولکولی این باکتری‌ها می‌تواند گامی مؤثر در به‌کارگیری آن‌ها در محصولات فرا ویژه باشد. هدف از این تحقیق، تشخیص و شناسایی سویه‌های لاکتوباسیلوس موجود در شیر مادر است. در این مطالعه پس از غنی‌سازی نمونه‌های شیر در محیط ام آر اس براث[۱]، جداسازی و خالص‌سازی سویه‌ها در همان محیط کشت صورت گرفت. پس از بررسی‌های میکروسکوپی با آزمون‌های بیوشیمیایی ازجمله تخمیر قند، تولید گاز و آزمون آنتی‌بیوگرام ، خصوصیات اولیه باکتری‌ها تعیین شد. در نهایت شناسایی مولکولی بر اساس توالی‌های ۱۶s rRNA و سپس انگشت‌نگاری ژنومی از طریق REP-PCR انجام شد. باسیل‌ها و کوکسی‌های گرم مثبت و کاتالاز منفی شناسایی و بر اساس نمونه و مورفولوژی کلنی کدگذاری گردیدند. در مرحله بعد باکتری‌هایی که در آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، تخمیر قند و تولید گاز تفاوت‌هایی از خود نشان داده بودند برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. در نهایت محصولات PCR توالی یابی شدند و توالی‌ها در نرم‌افزار BLAST موردبررسی قرار گرفتند. نتایج توالی یابی با استفاده از سرور Ez Taxon آنالیز شد. نتایج نشان داد که سویه‌های جداشده از نوع *پدیوکوکوس لولی*[۲]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[۳] و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[۴] بودند. شیر مادران می‌تواند به‌عنوان منبعی از اسیدلاکتیک باکتری‌های پروبیوتیکی موردتوجه باشد که ممکن است نقش مهمی در پیشگیری ابتلا نوزادان به بیماری‌های عفونی داشته باشد. از طرفی تحقیق حاضر نشان‌دهنده کارایی انگشت‌نگاری ژنومی REP-PCR با کمک نشانگر (GTG ۵) در بررسی روابط فیلوژنیک و تنوع ژنتیکی باکتری‌ها می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: شیر مادر، *لاکتوباسیلوس*، ۱۶s rRNA، REP-PCR

[1] MRS broth
[2] *Pediococcus lolii*
[3] *Lactobacillus rhamnosus*
[4] *Lactobacillus fermentum*

www.SID.ir

مقدمه

شیر انسان مایع زستی است که نیازهای تغذیه‌ای و ایمنی نوزادان را در ماه‌های اول پس از تولد برآورده می‌کند. شیر می‌تواند عامل مهمی در ایجاد و توسعه میکروارگانیسم‌های موجود در روده نوزاد باشد (۱). در گذشته بیشتر تحقیقات بر روی احتمال حضور میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا در شیر مادر متمرکز گردیده بود تا اینکه تحقیقات نشان دادند که تغذیه با شیر مادر، نوزادان را در برابر بیماری‌های عفونی، حساسیت‌های جلدی و آسم محافظت می‌کند. این تأثیرات می‌تواند درنتیجه حضور و رشد باکتری‌های مفید باشد (۲).

باکتری‌های اسیدلاکتیک، گروه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها هستند که به‌صورت باکتری‌های میله‌ای یا کوکوس‌های گرم مثبت، بدون اسپور و عموماً کاتالاز منفی وجود دارند. به‌صورت سنتی، باکتری‌های اسیدلاکتیک شامل چهار دسته *لاکتوباسیلوس*[1]، *پدیوکوکوس*[2]، *استرپتوکوکوس*[3] و *لوکونوستوک*[4] هستند. این باکتری‌ها از اجزای اصلی فلور میکروبی شیر خام و فراورده‌های شیری هستند. همچنین جز مکمل‌های غذایی به‌حساب می‌آیند که روی میزبان تأثیرات سودمندی دارند. اکثر آن‌ها با تولید ترکیبات ضد میکروبی اثر مهاری بر رشد باکتری‌های بیماری‌زا و تعادل فلور میکروبی روده دارند (۳, ۴). در آغاز قرن ۲۱ دو گروه اروپایی، خاصیت پروبیوتیکی باکتری‌های اسیدلاکتیک شیر مادر را اثبات کردند (۵, ۶) تحقیقات جدید نیز حاکی از وجود خواص پروبیوتیکی برخی از باکتری‌های اسیدلاکتیک جداشده از شیر مادر می‌باشد (۷). به همین دلیل جداسازی و شناسایی این باکتری‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. پروبیوتیک‌ها را می‌توان یکی از مهم‌ترین دستاوردهای محققین در قرن حاضر دانست، اصطلاح پروبیوتیک که ریشه لاتین دارد، به معنی حیات‌بخش می‌باشد. امروزه معنی پروبیوتیک‌ها گسترده شده و تحت عنوان "میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که از طریق مصرف خوراکی باعث بهبود خصوصیات میکروفلور طبیعی میزبان شده، اثرات مفید روی سلامت مصرف‌کننده به‌جا می‌گذارند "، تعریف می‌شوند (۴). ویژگی‌های پروبیوتیکی باکتری‌ها وابسته به سویه می‌باشد. بنا به اهمیت باکتری‌های اسیدلاکتیک در سلامت انسان، شناسایی و طبقه‌بندی مولکولی این باکتری‌ها می‌تواند گامی مؤثر در به‌کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی و تولید محصولات فرا ویژه باشد. با توجه به اینکه ظرفیت‌های پروبیوتیکی وابسته به سویه می‌باشند، انتخاب روش‌های قابل‌اطمینان برای شناسایی اسیدلاکتیک باکتری‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. از طرفی به‌کارگیری روش‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار وقت‌گیر و ابهام‌آمیز می‌باشند. لذا امروزه شناسایی از روش‌های فنوتیپی به ژنوتیپی تغییریافته است، زیرا دارای دقت و صحت بالاتری هستند. مطالعات مولکولی ازجمله هیبریداسیون DNA و شناسایی از طریق ژن‌های rRNA می‌توانند در شناسایی مفید واقع شوند .

لذا با توجه به تاثیر مثبت مصرف شیر مادر سلامت و ایمنی نوزادان شیرخوار و تاثیر تغذیه و شرایط محیطی در ترکیبات و ازجمله فلور میکروبی شیر مادران مناطق مختلف، انجام این تحقیق با هدف بررسی شیر مادران تهرانی به‌منظور جداسازی و شناسایی باکتری‌های مفید که می‌توانند به‌عنوان کاندیدی جهت اثبات خواص پروبیوتیکی مطرح باشند، جهت توصیه برای استفاده در محصولات غذایی با روش دقیق مولکولی و انگشت‌نگاری ژنومی آن‌ها جهت بررسی تنوع ژنتیکی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

در تابستان ۱۳۹۲ به‌صورت تصادفی ۱۵ نفر از مادران سالم و شیرده ۲۵ تا ۳۵ ساله، با فرزندان شیرخواره ۳ تا ۱۲ ماهه و ساکن

[1] *Lactobacillus*
[2] *Pediococcus*
[3] *Streptococcus*
[4] *Leuconostoc*

Archive of SID
www.SID.ir

تهران به‌طور داوطلبانه، انتخاب و پس از آموزش‌های لازم از آن‌ها نمونه‌های شیر جمع‌آوری شد. برای انجام فرآیند نمونه‌گیری، ابتدا نوک سینه و اطراف آن با صابون و آب استریل شستشو داده شد و سپس با کلرهگزدین ضدعفونی گردید و جهت اطمینان از عمل ضدعفونی از نوک سینه و اطراف آن آزمون سوآپ به عمل آمد. مادران درحالی‌که دستکش استریل به دست داشتند نمونه‌های شیر را در لوله فالکون‌های استریل به‌گونه‌ای جمع‌آوری کردند که نوک سینه با لوله تماس پیدا نکند و جهت اطمینان از آلودگی شیر با کلرهگزدین ml ۲ اول جدا دوشیده شد و ۵ الی ml ۱۰ بعدی به‌عنوان نمونه اصلی در یخدان نگهداری و در کمتر از h ۲ به آزمایشگاه منتقل شد.

جداسازی باکتری‌ها

مقادیر متفاوتی از نمونه‌های شیر جهت رشد باکتری‌های اسیدلاکتیک در محیط کشت ام ار اس آگار ، تحت شرایط کاملاً بی‌هوازی در دمای °C ۳۷ به مدت h ۴۸- ۷۲ گرمخانه گذاری شدند. کلنی‌های متفاوت از هر پلیت به‌طور تصادفی انتخاب و جهت دستیابی به کلنی خالص چندین بار روی محیط کشت ام ار اس آگار پاساژ داده شدند. سپس از نظر شکل ظاهری، آزمون کاتالاز و آزمون رنگ‌آمیزی گرم موردبررسی قرار گرفتند و باکتری‌های کوکسی و باسیل شکل گرم مثبت و کاتالاز منفی شناسایی گردیدند. در این مرحله از آزمون‌های بیوشیمیایی نظیر تخمیر قند، تولید گاز و آزمون آنتی‌بیوگرام، برای شناسایی بیشتر باکتری‌ها استفاده شد.

آزمون تخمیر قند و تولید گاز

جهت انجام تخمیر قند ابتدا محلول پایه (عصاره مخمر ۵ gr ، پپتون ۲ gr ، ۱ gr K_2HPO_4[۱] ، ۱gr KH_2PO_4[۲]) تهیه شد و ml ۸ از آن درون لوله‌های آزمایش حاوی لوله دورهام ریخته و سپس ml ۲ از قند موردنظر اضافه و سپس باکتری اضافه شد. باکتری‌ها با تخمیر قند سبب اسیدی شدن محیط می‌شوند و در صورت تولید گاز در لوله دورهام تجمع گاز دیده می‌شود. پس از اضافه شدن باکتری، لوله‌ها در شرایط بی‌هوازی در دمای °C ۳۷ ، به مدت ۴۸ تا ۷۲h انکوبه شدند.

آزمون آنتی‌بیوگرام

برای بررسی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک[3] ابتدا سوسپانسیون میکروبی معادل نیم مک فارلند از کلنی‌های ۱۸ ساعته تهیه شد و سپس با سوآپ استریل از سوسپانسیون میکروبی روی حجم ثابتی از محیط ام ار اس آگار کشت داده و بعد از گذشت min ۱۵ از تلقیح، دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی فوق روی سطح محیط قرار داده شد. بعد از گذشت min ۱۵ پلیت‌ها در دمای ۳۷°C و شرایط بی‌هوازی به مدت h ۱۸- ۱۶ انکوبه گردیدند. قطر هاله عدم رشد با خط کش اندازه‌گیری شد. در نهایت باکتری‌های انتخاب‌شده در محیط مایع ام ار اس کشت داده شد و پس از سانتریفوژ و شستشوی رسوب با بافر نمکی فسفاته استریل، جهت انجام مراحل بعدی در محلول سوکروز ۱۵٪ استریل، لیوفلیزه و در دمای °C ۲۰- نگهداری شدند.

استخراج DNA

یک تک کلنی از هر نمونه مورد آزمایش به محیط ام ار اس براث منتقل و در دمای °C ۳۷ و تراکم ۱۰٪ از در اکسید کربن به مدت h ۲۴-۴۸ (بر اساس سرعت رشد هر سویه) گرم‌خانه‌گذاری شد. بقیه مراحل استخراج با استفاده از کیت MBST Molecular Biological System Transfer بر اساس جذب ستونی DNA بر روی غشاء سیلیکا صورت گرفت. جهت بررسی کیفیت DNA استخراج‌شده در روش فوق ، از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۰/۷٪ استفاده شد.

[1] دی پتاسیم هیدروژن فسفات

[2] پتاسیم دی هیدروژن فسفات

[3] Disk diffusion

Archive of SID
www.SID.ir

تکثیر قطعه 16 SrDNA و شناسایی باکتری

جهت تکثیر قطعه bp ۱۵۰۰ ناحیه ژن ۱۶ S rRNA از پرایمرهای تهیه‌شده از شرکت تکاپوزیست ایران که توالی آن‌ها در ذیل قیدشده است، استفاده شد:

F GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
R CTACGGCTACCTTGTTACGA

واکنش PCR[1] با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio Rad) انجام گرفت. از Master Mix محصول شرکت Ampliqon استفاده شد. این محلول حاوی Taq DNA Polymerase، بافر PCR، MgCl و dNTPs می‌باشد. درواقع این محلول حاوی تمام اجزاء لازم برای PCR به‌جز پرایمر و DNA الگو می‌باشد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز در حجم نهایی ۲۵ µl (۱۲/۵ µl از Master Mix، ۰/۴ µM از هر پرایمر، ۲۰ ng از DNA باکتری و بقیه آب مقطر استریل) در طی سیکل حرارتی شامل، ۱ سیکل به مدت ۵ min در دمای ۹۴ °C و ۳۰ سیکل با برنامه دمایی ۱ min در ۹۴ °C ، ۱ min در دمای ۵۶ °C و ۱ min در دمای ۷۲ °C و در نهایت ۱ سیکل به مدت ۱۰ min در دمای ۷۲ °C انجام شد. محصول PCR روی ژل الکتروفورز ۲٪ مورد ارزیابی قرار گرفت. خالص‌سازی قطعه موردنظر انجام شد. سپس T/A cloning جهت کلون نمودن قطعه موردنظر انجام گرفت. سپس تعیین توالی قطعه تکثیرشده، توسط شرکت بیونیر کره جنوبی انجام گردید. ترادف قطعات تعیین توالی شده در بانک اطلاعاتی BLAST (Blast Local Alignment Search Tool) http://www.ncbi,nlm.nih.gov/BLAST مورد مقایسه قرار گرفت و باکتری‌ها شناسایی شدند.

انگشت‌نگاری ژنومی بر اساس روش REP-PCR با پرایمر GTG ۵

DNA ژنومی استخراج‌شده از ایزوله‌های موردنظر جهت انجام REP-PCR با پرایمر ۵'--GTG GTG GTG GTG GTG ۳' GTG۵ گزارش‌شده در تحقیق (۸) مورداستفاده قرار گرفت.

پرایمر موردنظر از شرکت تکاپو زیست تهیه گردید. واکنش REP-PCR در حجم نهایی ۲۵ µl به شرح ذیل بهینه‌سازی شد:

واکنش PCR متشکل از ۱۲/۵ µl از Master Mix (Ampliqon company) (۰/۸ µM) پرایمر GTG۵ و ۵۰ng از DNA الگو در حجم نهایی ۲۵ µl بهینه‌سازی شد. تکثیر DNA در دستگاه (Palmcycler Gp-) Corbet,Australia انجام شد. دناتوره شدن DNA الگو در دمای ۹۲ °C به مدت ۷ min انجام گرفت و به دنبال آن واکنش تکثیری DNA در ۳۰ سیکل به شرح زیر انجام شد:

دناتوره شدن در ۹۲ °C به مدت ۳۰ s، اتصال پرایمر در ۵۳/۵°C به مدت ۱ min و گسترش پرایمر در ۷۲ °C به مدت ۲ min.

انکوباسیون نهایی به مدت ده دقیقه در ۷۲ °C برای حصول اطمینان از تکمیل و گسترش پرایمرها صورت گرفت. جهت آشکارسازی محصولات PCR از الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ با استفاده از بافر TBE با غلظت ۰/۵ X (۴۴/۵ mM Tris/Borate ,۰/۵ mM EDTA, pH: ۸) استفاده شد. ژل با رنگ Rima Sight DNA رنگ‌آمیزی شد و با نور ماورابنفش، موردبررسی قرار گرفت. مارکر (bp۱۰۰GeneRuler,fermentas) به‌عنوان مارکر مولکولی مورداستفاده قرار گرفت.

بررسی فیلوژنی بر اساس مارکر GTG ۵

پس از ارزش‌گذاری نشانگر GTG ۵ به طریق فوق، آنالیزهای آماری زیر بر روی داده‌ها انجام گرفت .ضریب تشابه Dice در بین ایزوله‌های موردمطالعه محاسبه شد و گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها با نرم‌افزار((NTSYS-PC (Ver۲/۰۲) و با استفاده از روش‌های UPGMA[2] انجام گرفت. دندروگرام حاصل با نتایج توالی یابی مقایسه شد (۹).

[1] Polymerase Chain Reaction

[2] Unweighted Pair Group Method by Arithmetic Average

Archive of SID

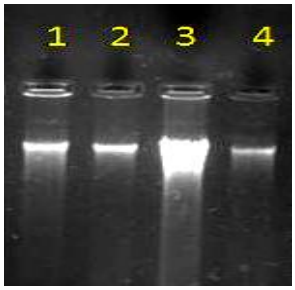
www.SID.ir

نتایج

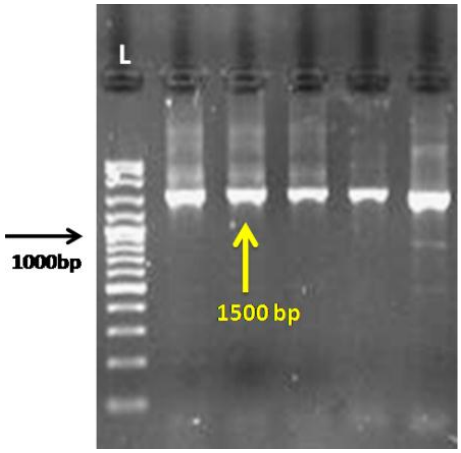
پس از انجام مراحل غنی‌سازی، جداسازی و خالص‌سازی، ۲۳ سویه باسیل و کوکسی گرم مثبت و کاتالاز منفی شناسایی و بر اساس ریخت‌شناسی کلنی کدگذاری گردیدند. سپس با توجه به‌خصوصیات مورفولوژی سویه‌ها و نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های تخمیر قند، تولید گاز و آنتی‌بیوگرام سویه‌ها، ۱۳ سویه برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند. تمامی ایزوله‌ها، به اریترومایسین، آزیترومایسین، آمپی‌سیلین و کلاریترومایسین حساس بودند ولی به ونکومایسین، توبرامایسین و جنتامیسین مقاومت نشان دادند. نتایج تخمیر قند و تولید گاز در جدول ۱ نمایش داده‌شده است.

نتایج کیفی DNA استخراج‌شده در شکل ۱ نمایش داده‌شده است. انجام واکنش PCR جهت شناسایی گونه‌ها با پرایمرهای اختصاصی سبب تکثیر قطعه ۱۵۰۰bp گردید (شکل ۲). پس از تائید روی ژل الکتروفورز ۲٪، ۵ سویه جهت تعیین توالی و شناسایی در حد گونه گزینش شدند.

در نهایت با انجام توالی یابی و مقایسه هم‌ردیفی در پایگاه NCBI Blastn، میزان تشابه مشخص شد که نمونه‌های ۱۰A، ۶A و ۱A توالی یابی شده حداقل ۹۹/۶٪ مشابه *پدیوکوکوس لولی*، و نمونه ۳B دارای ۹۹/۸ ٪ شباهت با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و ۹B نیز دارای ۹۹/۸ ٪ شباهت با *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بودند.



شکل۱- DNA استخراج‌شده بر اساس کیت MBST. چاهک‌های ۱، ۲،۳ و ٤ نمونه‌هایی از DNA استخراج‌شده بر روی ژل آگارز ۰/۷ درصد می‌باشند.



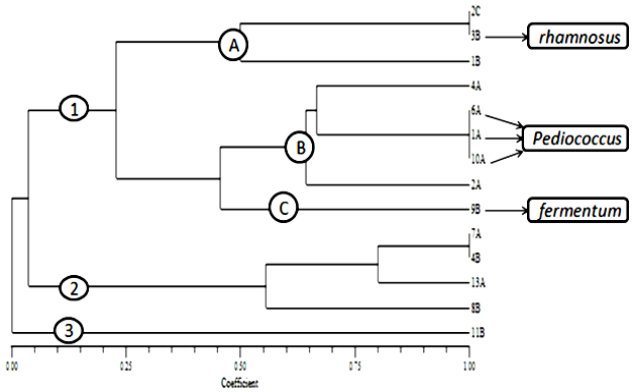
شکل ۲- نمایش محصول PCR (قطعه bp ۱۵۰۰) حاصل از تکثیر ژن ۱۶S rRNA در تعدادی از ایزوله‌های موردمطالعه به همراه DNA Ladder بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد.

بررسی تنوع ژنتیکی حاصل از نتایج REP-PCR

پروفایل انگشت‌نگاری ژنومی ایزوله‌ها بر اساس مارکر 5GTG۵ موردبررسی قرار گرفتند. تمامی باندهای حاصل از تکثیر PCR در محدوده ۲۰۰ تا bp ۳۷۰۰ بر اساس کد صفر و یک امتیازدهی شدند. درمجموع ۱۳ باند مشاهده شد که ۵ باند ویژه بود یعنی تنها در یک ایزوله شناسایی شد. در دندروگرام حاصله ۳ کلاد اصلی شکل گرفت. کلاد ۱ و ۲ خود از خوشه‌های کوچک‌تری تشکیل یافتند. به‌طوری‌که در کلاد ۱، خوشه‌های A وB و C شکل گرفت. در خوشه A، ایزوله‌های ۲C ، ۳B و ۱B قرار گرفتند، در خوشه B، ایزوله‌های۲A ، ۱۰A، ۱A، ۶A و ۴A و در خوشه C ایزوله ۹B قرار گرفت. ایزوله‌هایی که از نظر مولکولی بر اساس مارکر ۱۶S rRNA بررسی شدند همگی در کلاد ۱ قرار داشتند که شامل ایزوله‌های ۳B، ۶A، ۱A، ۱۰A و ۹B بودند. همان‌طور که در دندروگرام مشاهده می‌شود در خوشه B، ایزوله‌های ۶A، ۱A و ۱۰A با بیشترین تشابه ژنتیکی با هم و در یک گروه قرار گرفتند. ایزوله ۹B با حفظ فاصله ژنتیکی نزدیک به خوشه B قرار گرفتند. ایزوله ۳B، در خوشه A، دورتر از ایزوله‌های کلاد B گروه‌بندی‌شده است.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- دندروگرام حاصل از تجزیه خوشه‌ای نمونه‌های جداشده با روش UPGMA و ضریب تشابه Dice توسط نرم‌افزار NTSYS-PC.

جدول ۱- نتایج تخمیر قند و تولید گاز باکتری‌های جداشده از شیر مادر

کلونی	فروکتوز		مالتوز		گلوکز	
	تخمیر	تولید گاز	تخمیر	تولید گاز	تخمیر	تولید گاز
A۱	+	–	+	گاز	+	–
B۱	+	–	+	گاز	+	–
A۲	+	–	–	–	+	–
B۲	+	–	–	–	+	–
C۲	+	–	–	–	+	–
A۳	–	–	+	گاز	+	–
B۳	+	–	+	–	+	–
A۴	+	گاز	–	–	+	–
B۴	–	–	+	گاز	+	گاز
C۴	+	–	–	–	+	گاز
A۶	+	–	–	گاز	+	–
B۶	+	–	–	–	+	–
A۷	+	–	–	–	+	–
B۷	+	–	–	–	+	–
A۸	+	–	+	–	+	گاز
B۸	+	–	+	گاز	+	–
A۹	+	گاز	+	–	+	گاز
B۹	+	–	+	گاز	+	گاز
A۱۰	+	–	+	–	+	گاز
A۱۱	+	–	+	–	+	–
B۱۱	+	–	+	–	+	–
A۱۳	+	–	+	گاز	+	گاز
B۱۳	+	گاز	+	گاز	+	گاز

بحث

در فرایند شناسایی باکتری‌ها، روش‌های بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و تولید گاز رایج می‌باشند ولی این روش‌ها دارای محدودیت‌هایی می‌باشند که از آن جمله می‌توان به‌صرف وقت و هزینه و نیز ابهام‌آمیز بودن نتایج آزمایش‌ها اشاره کرد؛ بنابراین به‌کارگیری روش‌های مولکولی مختلف سبب رفع مشکلات فوق‌الذکر گردیده است. از طرفی همواره تعدادی از باکتری‌ها جداسازی شده، سوش‌های یکسانی از باکتری‌های یک‌گونه می‌باشند؛ بنابراین انتخاب یک روش مولکولی دقیق و قابل‌اطمینان از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. یکی از روش‌های دقیق در شناسایی مولکولی، توالی یابی RNA

Archive of SID
www.SID.ir

ریبوزومی باکتریایی می‌باشد. در این تحقیق نیز روش توالی یابی ناحیه ژنومی 16s rRNA مورداستفاده قرار گرفت. این قسمت از ژنوم دارای نواحی متغیر و حفاظت‌شده می‌باشد که تفاوت سوش‌ها، حاصل تفاوت در نواحی متغیر می‌باشد. محققین با طراحی پرایمرهای مختلف اقدام به تکثیر این ناحیه و شناسایی باکتری‌ها با توالی یابی قطعه موردنظر شده‌اند (۱۰).

در مطالعه حاضر ۲۳ سویه دارای خصوصیات ریخت شناسی و بیوشیمیایی مشابه *لاکتوباسیل‌ها* جداسازی شدند که با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های آنتی‌بیوگرام، تخمیر قند و خصوصیات مورفولوژی سویه‌ها، ۱۳ سویه متفاوت برای شناسایی مولکولی انتخاب شدند و در نهایت پس از توالی یابی مشخص شد که نمونه‌های توالی یابی شده از نوع *پدیوکوکوس لولی*[1]، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*[2] و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*[3] بودند. هانت[4] و همکاران (۲۰۱۲)، به بررسی تنوع جنس‌های باکتریای شیر مادر طول زمان به‌صورت کمی پرداختند (۱۱). در این پژوهش فلور میکروبی شیر با روش توالی یابی ژن 16s rRNA طی سه مرحله زمانی شناسایی شدند که نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نشان داد که جوامع میکروبی شیر انسان در طول زمان به‌طورکلی از نظر منطقی پیچیده است. درحالی‌که در طول زمان برخی از باکتری‌های موردمطالعه سازگاری بیشتر پیدا می‌کنند و جنس‌های غالب در شیر را تشکیل می‌دهند. در این پژوهش نیز همانند مطالعه حاضر از توالی یابی ژن 16s rRNA استفاده شد که نشان‌دهنده دقت بالای این روش است و برخی سویه‌های جداشده همانند مطالعه حاضر بود. البته در این تحقیق در طول زمان‌های مختلف جداسازی سویه‌ها از شیر انجام شد که می‌تواند در مطالعات آتی لحاظ شود (۱۲). لارا ویلوسلادا[5] و همکاران در مطالعه‌ای (۲۰۰۷)، موفق به جداسازی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس گاسری*[6]، *لاکتوباسیلوس سالیواریوس*[7] و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* از شیر مادر شدند. سپس اثرات مفید این باکتری‌ها در کاهش چسبندگی *سالمونلا* را موردبررسی قراردادند (۶). آرویدسون[8] طی پژوهشی (۲۰۰۵) به بررسی فراوانی *لاکتوباسیلوس روتری*[9] موجود در شیر انسان پرداخت. در این مطالعه نمونه‌های شیر ۲۲۰ مادر سالم شهری و روستای ۷ کشور (سوئد – دانمارک – اسرائیل – افریقای جنوبی – ژاپن - کره جنوبی و پرو) موردبررسی قرار گرفت. این نمونه‌گیری در ۶ تا ۳۲ روز پس از زایمان صورت گرفت که بیشترین فراوانی *لاکتوباسیلوس روتری* در بین مادران ژاپنی با ۵۶/۳٪ بود و کمترین نیز در مادران اسرائیلی، پرو و دانمارکی بود که فاقد این باکتری بودند. در زنان روستایی متعلق به پرو و کره، باکتری جداسازی نشد. بر طبق نتایج این مطالعه، فراوانی *لاکتوباسیلوس روتری* در کشورهای مختلف متفاوت است و فراوانی در مناطق روستایی بیشتر از مناطق شهری است (۱۴،۱۳).

مارتین[10] و همکاران (۲۰۰۷)، تنوع *لاکتوباسیلوس‌ها* در شیر مادر و واژن زنان سالم و نقش بالقوه در قرار گرفتن در روده نوزادان را موردبررسی دادند. نتایج این پژوهش نشان داد که شیر انسان، یک منبع مستمر از باکتری‌های بالقوه پروبیوتیک (خصوصاً *لاکتوباسیل‌ها*) است که در روده نوزاد مستقر می‌شوند. همچنین هر زن یک الگوی باکتریای خاص در شیر خود دارد و باکتری‌های روده نوزاد ارتباط معنی‌داری با روش زایمان ندارند (۱۶،۱۵). در این تحقیق نیز با استفاده از PCR انواعی از سویه‌های *لاکتوباسیل* جدا شد که مشابه سویه‌های جداشده از مطالعه حاضر بود. روش تایپینگ دیگری که تحقیق حاضر مورداستفاده قرار گرفت، انگشت‌نگاری REP- PCR با کمک پرایمر GTG ۵ بود. این روش اولین بار توسط ورسولیک[11] (۱۹۹۱)، جهت تایپینگ باکتری‌های گرم منفی

[1] *Pediococcus lolii*
[2] *Lactobacillus rhamnosus*
[3] *lactobacillus fermentum*
[4] Hunt
[5] Villoslada
[6] *Lactobacillus gasseri*
[7] *Lactobacillus salivarious*
[8] Arvidsson
[9] *Lactobacillus reuteri*
[10] Martín
[11] Versalovic

www.SID.ir
Archive of SID

به‌کاربرده شد (۱۷). بعدها محققین دیگری ازاین‌روش جهت ژنوتایپینگ باکتری‌های گرم مثبت استفاده کردند و تجربیات نشان داده است که این نشانگر دارای قدرت تفکیک بالایی در متمایز نمودن باکتری‌ها از هم می‌باشد. گورس[1] و همکاران (۲۰۰۱) ، جهت شناسایی *لاکتوباسیل‌ها* از نشانگر GTG ۵ استفاده نمودند (۸). سوک[2] و همکاران (۲۰۰۵ و ۲۰۰۹) جهت شناسایی *لاکتوباسیل‌ها* از نمونه‌های انسانی و شیر لینک [3] (۲۰۰۷) و ون هورد[4] (۲۰۰۸) جهت شناسایی *لاکتوباسیل‌های* جداشده از منابع غذایی این تکنیک را به کار بردند(۱۸-۲۲). مقایسه نتایج حاصل از روش توالی یابی ژن 16s rRNA و پروفایل حاصل از نتایج REP-PCR در مطالعه حاضر نشان‌دهنده تطابق کامل نتایج به‌دست‌آمده در هر دو روش می‌باشد و همچنین قدرت تفکیک بالای روش انگشت‌نگاری در متمایز نمودن باکتری‌های جداشده را نشان می‌دهد. با توجه به اینکه روش توالی یابی محدودیت‌های دارد مبنی بر هزینه بیشتر و اینکه گاهی نیاز به تکرار دارد. روش انگشت‌نگاری ژنومی REP-PCR با داشتن مزایای چون سهولت انجام کار و سرعت انجام آزمایش و تکرارپذیری، هزینه کمتر و شناسایی دقیق ژنوتیپ‌ها می‌تواند به‌عنوان یک مرحله اولیه غربالگری قبل از توالی یابی مورداستفاده قرار گیرد. با مقایسه نتایج حاصل از توالی یابی و انگشت‌نگاری ژنومی، نتایج جالبی حاصل شد. به‌طوری‌که بر طبق نتایج توالی یابی، کاملاً نتایج گروه‌بندی ژنوتیپ‌ها را تائید نمود. به‌طوری‌که بر طبق نتایج توالی یابی، ایزوله‌های ۱A، ۹A و ۱۰A هر سه با درصد تشابه بالای ۹۹ ٪ تحت عنوان *پدیوکوکوس لولی* معرفی شدند. در دندروگرام نیز، این سه ایزوله با بیشترین تشابه ژنتیکی نزدیک به هم و در خوشه B قرار گرفتند. دو ایزوله دیگر یعنی ۳B و ۹B نیز که دارای تفاوت ژنتیکی بودند با فاصله ژنتیکی نسبت به ایزوله‌های مذکور قرار گرفتند و تحت عنوان *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* معرفی شدند. در کلاد ۲، دو ایزوله ۷A و ۴B نیز دارای بالاترین درجه تشابه ژنتیکی هستند و احتمالاً متعلق به یک‌گونه خواهند بودند که در یک خوشه هم قرارگرفته‌اند.

با توجه به دندروگرام، ایزوله ۱۱B بیشترین تفاوت ژنتیکی را نسبت به سایر ایزوله‌ها دارد و با فاصله نسبت به سایرین در دندروگرام قرارگرفته است.

با توجه به جداسازی و شناسایی باکتری‌های بومی که می‌توانند به‌عنوان کاندیدی جهت اثبات خواص پروبیوتیکی مطرح باشند، به‌خصوص از منبع سالم و با ارزشی مانند شیر مادر و با توجه به نقش مؤثر باکتری‌های پروبیوتیک در سلامت انسان، می‌توان امیدوار بود که بتوان با اثبات خواص پروبیوتیکی و درمانی چنین سویه‌هایی که با شرایط فیزیولوژیک بدن و موکوس روده افراد منطقه نیز سازگاری بیشتری دارند، قدمی مؤثر در جهت تولید مواد غذایی فراسودمند جهت افراد جامعه به‌خصوص نوزادان برداشت. پیشنهاد می‌شود پژوهش گسترده‌تری در شهرهای مختلف کشور انجام شود تا تنوع جمعیت میکروبی شهرهای مختلف و احتمالاً الگوی اختصاصی هر منطقه موردبررسی قرار گیرد تا بتوان کلکسیون میکروبی متنوع‌تری ایجاد نمود. همچنین جداسازی باکتری‌ها در طول زمان‌های مختلف از شیر انجام گیرد تا بتوان الگوی خاصی از تنوع باکتریایی در طول زمان به دست آورد.

[1] Gevers
[2] Švec
[3] Scheirlinck
[4] Van Hoorde

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. Journal of Human Lactation. 2005;21(1):p 8-17.
2. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jimínez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. The Journal of pediatrics. 2003;143(6):p 754-758.
3. van den Hooven HW, Lagerwerf FM, Heerma W, Haverkamp J, Piard J-C, Hilbers CW, Siezen RJ, Kuipers OP, Rollema HS .The structure of the lantibiotic lacticin 481 produced by Lactococcus lactis: location of the thioether bridges. FEBS letters. 1996;391(3):p 317-322;
4. Shortt C. The probiotic century: historical and current perspectives. Trends in food science & Technology. 1999;10(12):p 411-417.
5. Heikkilä M, Saris P. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. Journal of Applied Microbiology. 2003;95(3):471-478.
6. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Miguel Rodríguez J, Boza J, Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. British Journal of Nutrition. 2007;98(S1):S96-S100.
7. Martín Ro, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín MaL, Olivares M, Boza J, Jiménez J, Fernández L, Xaus J. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in food science & Technology. 2004;15(3):p 121-127.
8. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS Microbiology Letters. 2001;205(1):p 31-36.
9. Vauterin L, Vauterin P. Computer-aided objective comparison of electrophoresis patterns for grouping and identification of microorganisms. Eur Microbiol. 1992;1:p 37-41.
10. Collins M, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow J, Martinez-Murcia A, Phillips B, Williams A, Wallbanks S. Phylogenetic analysis of the genus Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiology Letters. 1991;77(1):p 5-12; Vandamme P, Pot B, Gillis M, De Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiological reviews. 1996;60(2):p 407-438.
11. Hunt BJ, Scully M, Benjamin S, Liesner R, Rose P, Peyvandi F, Cheung B, Machin SJ. Guidelines on the diagnosis and management of thrombotic thrombocytopenic purpura and other thrombotic microangiopathies. British journal of haematology. 2012;158(3):p 323-335.
12. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schutte U, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. PLoS One. 2011;6(6):e21313.
13. Arvidsson S, Arvidsson B, Fridlund B, Bergman S. Factors promoting health-related quality of life in people with rheumatic diseases: a 12 month longitudinal study. BMC musculoskeletal disorders. 2011;12(1) : p. 102-118.
14. Arvidsson E. Survey of frequency of Lactobacillus reuteri in human breast milk. Journal of Natural science. 2002;118(9) : p. 823-838.
15. Martín R, Heilig G, Zoetendal E, Smidt H, Rodríguez J. Diversity of the Lactobacillus group in breast milk and vagina of healthy women and potential role in the colonization of the infant gut. Journal of Applied Microbiology. 2007;103(6):p 2638-2644.
16. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. Research in microbiology. 2007;158(1):p 31-37.
17. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to finerpriting of bacterial enomes. Nucleic acids research. 1991;19(24):p 6823-6831.
18. Švec P, Dráb V, Sedláček I. Ribotyping ofLactobacillus casei group strains isolated from dairy products. Folia microbiologica. 2005;50(3):p 223-228.
19. Švec P, Sedláček I, Žáčková L, Nováková D , Kukletová M. Lactobacillus spp. associated with early childhood caries. Folia microbiologica. 2009;54(1):p 53-58.
20. Švec P, Vancanneyt M, Seman M, Snauwaert C, Lefebvre K, Sedláček I, Swings J. Evaluation of (GTG) 5-PCR for identification of Enterococcus spp. FEMS Microbiology Letters. 2005;247(1):p 59-63.

www.SID.ir

21. Scheirlinck I, Van der Meulen R, Van Schoor A, Vancanneyt M, De Vuyst L, Vandamme P, Huys G. Influence of geographical origin and flour type on diversity of lactic acid bacteria in traditional Belgian sourdoughs. Applied and environmental microbiology. 2007;73(19):p 6262-6269.

22. Van Hoorde K, Verstraete T, Vandamme P, Huys G. Diversity of lactic acid bacteria in two Flemish artisan raw milk Gouda-type cheeses. Food microbiology. 2008;25(7):p 929-935.

Archive of SID

www.SID.ir

Isolation and Identification of *Lactobacillus* from breast milk by Molecular methods

Maziar Karami[1], **Farzaneh Tafvizi[2],** Parvaneh Jafari[3], Maryam Tajabadi Ebrahimi[4]
1. Department of Biology, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran
2. Department of Biology, Parand Branch, Islamic Azad University, Parand, Iran
Farzanehtafvizi54@gmail.com
3. Department of Microbiology, Arak Branch Islamic Azad University, Arak, Iran
4. Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Received:1393/07/16
Accepted:1393/10/29

Abstract

Breast milk as the only source of nutrition in the first months after birth, an important factor in the development of microorganisms that are present in the intestines of infants. Given the importance of lactic acid bacteria, especially *lactobacilli* in human health, molecular recognition and classification of these bacteria could be an effective step in applying them in Functional products. The purpose of this research, detection and identification of *Lactobacillus* strains present in the breast milk. In this study, the strains in milk samples were isolated after enrichment in MRS broth, After microscopic examination, the basic characteristics of bacteria was determined by biochemical tests. Finally, to identify the molecular basis Identification of 16SrRNA sequences and genomic fingerprinting by REP-PCR was performed. Gram positive and catalase negative bacilli and cocci, were coded. Finally the PCR products were sequenced, and the sequences were analyzed with BLAST software. Sequencing results were analyzed using Ez Taxon server, the results showed that the strains isolated type of *Pediococcus lolii*, *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus* fermentum. Breast milk can be considered as a source of lactic acid probiotic bacteria that may play a role in preventing of infant infectious disease have in the other hand the present study demonstrates the efficacy of REP-PCR genomic fingerprinting with marker (GTG) 5 in examining phylogenetic relationships and genetic variation in bacteria.

Keyword: Breast milk, *Lactobacillus*, 16S rRNA, REP-PCR

Archive of SID

www.SID.ir