Journal of Microbial World
Volume 17, No. 1, September 2024

Original Article

Isolation, identification and investigation of genetic diversity of lactic acid bacteria (LABs) in human breast milk

Elaheh Hasnavand [1], Behrooz Doosty [2], Kamran Samiei [3]

[1]Student of MSC, Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran. [2] Associted Professor, Department of Biology, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran. [3] Assistant Professor, epartment of Genetics and Plant Breeding, Khorramabad Branch, Islamic Azad University, Khorramabad, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Breast milk is rich in nutritional components and has a high biological value due to the presence of probiotic bacteria. Given the importance of lactic acid bacteria (LABs) and their positive effects on the immune system, the present study was conducted to isolate, identify, and investigate the genetic diversity of probiotic bacteria in breast milk using REP and BOX molecular markers.

Materials and methods: Breast milk samples were collected from different areas of Lorestan province and after culturing the bacteria in each sample, different techniques (gram test, catalase, and antibiogram) were used for their initial confirmation. Genetic distances between 20 selected samples were estimated using REP-PCR and BOX-PCR markers. Based on the initial results, 3 isolates were selected from heterogeneous groups and the type of bacteria was determined using 16SrRNA gene amplification, sequencing, and alignment.

Results: The results showed that the studied bacteria were coccobacilli, gram-positive and catalase-negative. Based on the obtained grouping, the studied bacteria were placed in 5 different groups with a minimum of 23 and a maximum of 86% polymorphism, and the formed groups had relative correspondence with geographical distances. The results of 16SrRNA gene sequencing indicated the identification of 3 bacterial species, *Limosilactobacillus fermentum*, *Apilactobacillus kunckeei* and *Ligilactobacillus apodemi* in breast milk samples.

Conclusion: Breast milk contains a wide range of lactic acid bacteria, and the use of DNA-based molecular markers in grouping and identifying this group of bacteria will be efficient.

Key words: Breast milk, Probiotics, *Lactobacillus*, PCR, 16SrRNA.

Received: 4 June 2024 Revised: 1 July 2024 Accepted: 26 August 2024

Correspondence to: Sasan Saki
Tel: +98 9184251225
E-mail: kamransamiei@yahoo.com

Journal of Microbial World 2024, 17 (2): 119 - 127

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال هفدهم شماره دوم (پیاپی ۵۹) تابستان ۱۴۰۳
صفحات ۱۲۷ –۱۱۹

Original Article

جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک (LABs) شیر مادر

الهه حسنوند[۱]، بهروز دوستی[۲]، کامران سمیعی[۳*]

[۱] دانشجوی کارشناس‌ارشد، گروه زیست‌شناسی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران. [۲] دانشیار، گروه زیست‌شناسی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران. [۳] استادیار، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: شیر مادر غنی از ترکیبات غذایی بوده و به واسطه وجود باکتری‌های پروبیوتیک، از ارزش زیستی بالایی برخوردار است. با توجه به اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک (LABs) و اثرات مثبت آن‌ها بر سیستم ایمنی، تحقیق حاضر به منظور جداسازی، شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌های پروبیوتیک موجود در شیر مادر با استفاده از نشانگرهای مولکولی REP و BOX اجرا شد.

مواد و روش‌ها: نمونه‌های شیر مادر از نواحی مختلف استان لرستان جمع‌آوری و پس از کشت باکتری‌های موجود در هر یک از نمونه‌ها، از تکنیک‌های مختلف (آزمون گرم، کاتالاز و آنتی‌بیوگرام) برای تایید اولیه آن‌ها استفاده شد. فواصل ژنتیکی بین ۲۰ نمونه انتخاب شده با استفاده از نشانگرهای REP-PCR و BOX-PCR برآورد شد. براساس نتایج اولیه، ۳ جدایه از گروه‌های هتروژن انتخاب و با استفاده از تکثیر ژن 16SrRNA و توالی‌یابی و همردیفی آن، نوع باکتری مشخص شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه کوکوباسیل، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. براساس گروه‌بندی به دست آمده، باکتری‌های مورد مطالعه با حداقل ۲۳ و حداکثر ۸۶ درصد چند شکلی در ۵ گروه مختلف قرار گرفته و گروه‌های تشکیل شده با فواصل جغرافیایی مطابقت نسبی داشتند. نتایج توالی‌یابی ژن 16SrRNA بیانگر شناسایی ۳ گونه باکتری *لیموسی‌لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *اپی‌لاکتوباسیلوس کونکئی* و *لیگی‌لاکتوباسیلوس آپودمی* در نمونه‌های شیر مادر بود.

نتیجه‌گیری: شیر مادر حاوی طیف وسیعی از باکتری‌های اسید لاکتیک بوده و استفاده از نشانگرهای مولکولی مبتنی بر DNA در گروه‌بندی و شناسایی این گروه از باکتری‌ها، کارایی بسیار خوبی خواهد داشت.

کلمات کلیدی: شیر مادر، پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس*، PCR، 16SrRNA.

دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۳/۱۵ ویرایش مقاله: ۱۴۰۳/۴/۱۱ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۶/۵

مقدمه

پروبیوتیک به معنای برای زندگی، به مجموعه میکروارگانیسم‌های (باکتری، قارچ و مخمر) زنده و فعالی گفته می‌شود که با استقرار در بخش‌های مختلف بدن و فعالیت زیستی خود، از طریق حفظ و تعادل فلور میکروبی روده، تاثیر مثبتی بر سلامتی و افزایش کارایی سیستم ایمنی بدن میزبان دارند (۱). شیر مادر به دلیل داشتن تنوع میکروبی بالا به عنوان غنی‌ترین ماده غذایی در ماه‌های اول پس از تولد می‌باشد (۲و۳). در مطالعات متعدد بیان شده که تغذیه با شیر مادر ضمن داشتن ارزش غذایی بالا، می‌تواند در کاهش بروز

*) آدرس برای مکاتبه: گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، واحد خرم‌آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم‌آباد، ایران.
تلفن: ۰۹۱۸۴۲۵۱۲۲۵ پست الکترونیک: kamransamiei@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

عفونت‌ها، جلوگیری از واکنش‌های آلرژیک و پیشگیری از بیماری‌های مزمن نقش موثری داشته باشد (۵و۴). فلور میکروبی روده نوزاد در بدو تولد از تنوع پایینی برخوردار بوده و در دوره سه ساله اول زندگی به دلیل تغذیه و شرایط زیستی به پیچیدگی بسیار بالایی دست خواهد یافت (۶) علاوه بر این، عوامل دیگری نظیر مراقبت‌های قبل از زایمان، تغذیه و نحوه زایمان مادر می‌تواند در این زمینه اثر گذار باشد (۷ و۸).

بخش بزرگی از فلور میکروبی موجود در روده نوزادان تغذیه شده با شیر مادر از دو گروه عمده *بیفیدوباکتریوم* (*Bifidobacterium*) و *لاکتوباسیلوس* (*Lactobacillus*) تشکیل شده است (۹). باکتری‌های اسید لاکتیک (Lactic Acid Bacteria-LABs) از جمله مهمترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک بوده که در این میان *لاکتوباسیلوس‌ها* مهمترین جنس موجود در این گروه از باکتری‌ها می باشند. این گروه از باکتری‌ها به صورت میله‌ای یا کوکوباسیل، گرم مثبت، بدون اسپور و عمدتا کاتالاز منفی هستند (۱۰). بازدارندگی باکتری‌های *لاکتوباسیل* بر علیه بسیاری از باکتری‌ها بیماری‌زای دستگاه گوارش به اثبات رسیده است (۱۱). همچنین به دلیل دارا بودن خواص پروبیوتیکی می‌توانند از اتصال سایر باکتری‌ها به حفرات دهانی، مینای دندان و اپی‌تلیال روده جلوگیری کنند (۱۱و۱۲).

ترکیبات ضد میکروبی تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک با نام عمومی باکتریوسین شامل ترکیباتی با وزن مولکولی متفاوت بوده و خواص ضد میکروبی متعددی داشته و از نظر ایمنی زیستی و ارتقای سلامتی اهمیت بالایی دارند (۱۱).

تکنیک‌های مبتنی بر ژنتیکی مولکولی نظیر (PolymeraseChain Reaction)، با توجه به سرعت عمل و دقت اجراء، مورد توجه فراوانی قرار گرفته‌اند. در این بین، توالی‌های تکراری موجود در ژنوم میکروارگانیسم‌ها به‌عنوان هدف بسیار مناسبی برای طراحی آغازگرهای اختصاصی جهت تکثیر قطعات چندشکل بین باکتری‌های مختلف است (۱۵و۱۶).

سه خانواده مهم از این توالی‌های تکراری (RepetitiveExtragnic Palindromic) شامل، REP (۳۵ تا ۴۰ نوکلئوتیدی)، ERIC (۱۲۴ تا ۱۲۷ نوکلئوتید) و BOX (۱۲۴ نوکلئوتید) از مهمترین اهداف برای طراحی نشانگرهای مبتنی بر DNA هستند. آغازگرهای اختصاصی بر اساس این توالی‌ها طراحی شده و ژنوم ما بین این توالی‌ها تکثیر خواهد شد. به طور کلی این روش‌ها ERIC-PCR، REP-PCR و BOX-PCR هستند و در مجموع rep-PCRنامیده می‌شوند (۱۵).

پژوهش‌های گذشته ضمن تائید وجود باکتری‌های اسید لاکتیک در شیر مادر، خواص پروبیوتیکی آن‌ها را نیز مورد توجه قرار داده‌اند (۱۴). شناسایی و تائید باکتری‌های اسید لاکتیک توسط تکنیک‌های مورفولوژیک، بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیار زمان‌بر بوده و از دقت بالایی برخوردار نیستند. لذا در سال‌های اخیر استفاده از روش‌های مولکولی، نشانگرهای ژنتیکی و تکثیر ژن‌های اختصاصی، گسترش فراوانی یافته است. با توجه به اهمیت زیستی شیر مادر و خواص ایمنی پروبیوتیک‌های موجود در آن، مطالعه حاضر به منظور جداسازی، شناسایی و ارزیابی تنوع ژنتیکی باکتری‌های اسید لاکتیک در نمونه‌های شیر مادر از مناطق جغرافیایی مختلف استان لرستان به اجرا درآمد.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه‌برداری و جداسازی باکتری‌ها: به‌منظور تهیه نمونه‌های مورد مطالعه در ۶ ماه نخست سال ۱۴۰۱، تعداد ۲۰مادر به صورت تصادفی با تاریخ زایمان حداکثر یکساله از مناطق جغرافیایی مختلف استان لرستان انتخاب شدند. جهت نمونه‌برداری پس از اخذ رضایت مادران و ضدعفونی محل، مقدار ۵۰ میلی‌لیتر شیر تهیه و پس از قراردهی بر روی یخ به آزمایشگاه منتقل و برای انجام سایر مراحل آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. مقادیرمتفاوتی از نمونه‌های شیر جهت رشد باکتری‌های اسید لاکتیک در محیط کشت MRS (Man Rogosa And Sharps) تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت

گرماخانه‌گذاری شدند. تعداد متعددی کلنی از هر پلیت به طور تصادفی انتخاب و برای دستیابی به کلنی خالص چندین بار روی محیط کشت MRS واکشت شدند. سپس به‌منظور بررسی نمونه‌های شیر جمع‌آوری شده و جداسازی باکتری‌های کاندید، از آزمون گرم و کاتالاز استفاده شد (۱۱).

برای بررسی الگوی حساسیت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی با روش انتشار از دیسک (Disc diffusion)، ابتدا سوسپانسیون میکروبی از کلنی‌های خالص شده تهیه و سپس با سوآپ استریل از سوسپانسیون مورد نظر روی محیط کشت MRS جامد کشت داده شد. بعد از گذشت ۱۵ دقیقه از تلقیح، دیسک‌های آنتی‌بیوتیک تجاری (پادتن طب،ایران) شامل اریترومایسین، آمپی‌سیلین، آزیترومایسین، توبرامایسین، جنتامایسین و ونکومایسین بر روی محیط کشت با فاصله مناسب از همدیگر قرار داده شدند. نمونه‌ها در انکوباتور در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت نگهداری و پس از رشد باکتری، وجود یا عدم وجود هاله و قطر هاله تشکیل شده، اندازه‌گیری شد (۱۰).

ب) تکثیرژن 16SrRNA و شناسایی باکتری‌های جداسازی شده: محتوای DNA ژنومی نمونه‌های باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده، به روش جوشاندن استخراج و تخلیص شد. برای اجرای واکنش‌های PCR و تکثیر ژن 16SrRNA، با آغازگرهای اختصاصی (جدول ۱) انجام شد. برای بهینه‌سازی تکثیر قطعه ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی ژن 16SrRNA، از دستگاه ترموسایکلر (Bio-Rad,USA) و برنامه گرادیانت دمایی استفاده شد. واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری PCR شامل ۱ میلی‌مولار MgCl2، ۱ میکرومولار dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر، ۱۰ پیکومول آغازگر، ۱ واحد آنزیم *Taq* پلیمراز و ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی بودند. واکنش‌های PCR پس از دناتوره شدن اولیه DNA الگو در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و به دنبال آن واکنش‌های تکثیر DNA در ۴۰ سیکل، شامل دناتوره شدن در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگر در دمای محاسبه شده (جدول ۱) به مدت ۱دقیقه،گسترش در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه و گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس صورت گرفت.

پس از فرایند تکثیر و تائید قطعه ۱۵۰۰ نوکلئوتیدی با استفاده از تکنیک ژل الکتروفورز آگارز ۱/۵ درصد، محصول PCR برای توالی‌یابی و شناسایی گونه باکتری مورد استفاده قرار گرفت. با استفاده از ابزار BLAST در بانک اطلاعاتی NCBI، همردیف‌های جفتی بر علیه توالی‌های خانواده لاکتوباسیلوس اجرا و گونه‌های باکتری با بیشترین شباهت انتخاب شدند (۱۶).

ج) بررسی فواصل ژنتیکی و گروه‌بندی باکتری‌ها: براساس مطالعات قبلی (۱۵و۱۶)، جهت تکثیر قطعات چندشکل و بررسی تنوع ژنتیکی بین ۲۰ باکتری اسید لاکتیک جداسازی شده، از آغازگرهای اختصاصی دو نشانگر REP-PCR و BOX-PCR استفاده شد. برای اجرای واکنش‌های PCR، از غلظت واکنش‌ها برنامه زمانی و دمایی مورد استفاده همانند تکثیر ژن 16SrRNA استفاده شد. پس از اتمام مراحل تکثیر و اجرای فرایند الکتروفورز محصولا PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد، براساس وجود یا عدم وجود قطعات در هر ژنوتیپ باکتری، به ترتیب امتیاز یک (۱) و صفر (۰) داده شد و پس از تشکیل ماتریس تشابه جاکارد توسط نرم‌افزار(NTSYS-PC(Ver. 2.02، دندروگرام براساس شباهت ژنتیکی ترسیم و گروه‌بندی ۲۰ باکتری مورد مطالعه انجام گرفت.

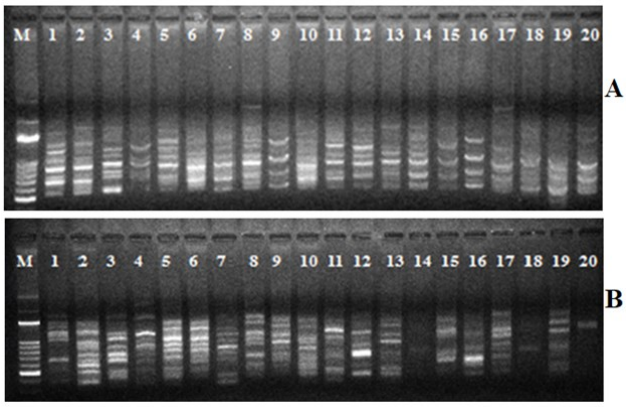
جدول ۱: مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز (PCR).

نام آغازگر	توالی نوکلئوتیدی	دمای اتصال
REP	5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3′	۵۶
BOX	5'-CTACGGCAAGGCGACGCT-3′	۶۱
16SrRNA-F	5'-CTGGCTCAGGACGAACGC-3′	۵۹
16SrRNA-R	5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTC-3′	

یافته‌ها

با بررسی میکروسکوپی، رنگ‌آمیزی گرم و آزمون کاتالاز باکتری‌های رشد یافته روی محیط کشت MRS ، تعداد ۲۰

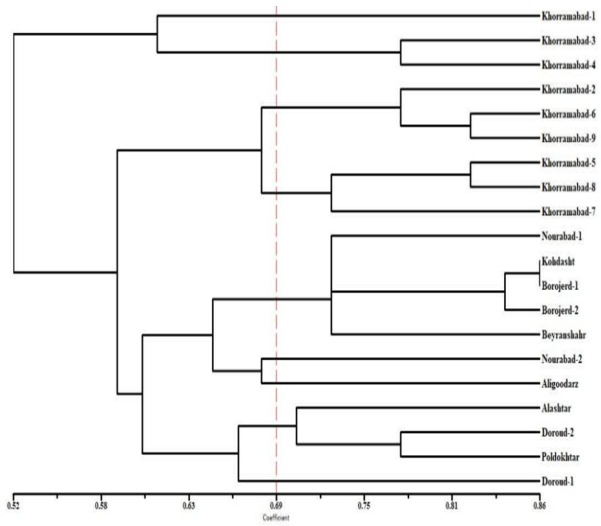
باکتری اسید لاکتیک جداسازی و پس از تخلیص مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه همگی کوکوباسیل، گرم مثبت و کاتالاز منفی بودند. تمامی سویه‌های انتخاب شده به آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، اریترومایسین و آزیترومایسین حساس و به جنتامایسین، ونکومایسین و توبرامایسین مقاومت نشان دادند. بر اساس نتایج به دست آمده و آزمون آنتی بیوگرام، ۳ باکتری از گروه‌های هتروژن انتخاب و در تعیین نوع باکتری از تکثیر ژن 16SrRNA استفاده شد. نتایج توالی‌یابی ژن 16SrRNA به شناسایی ۳ گونه باکتری *لیموسی‌لاکتوباسیلوس فرمنتوم* (*Limosiltobacillus fermentum*)، *اپی‌لاکتوباسیلوس کونکئی* (*Apilactobacillus kunkeei*) و *لیگی‌لاکتوباسیلوس آپودمی* (*Ligilactobacillus apodemi*) در نمونه‌های شیر مادر انجامید. براساس نتایج واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز و تکثیر قطعات چندشکل توسط نشانگرهای REP-PCR و BOX-PCR، مشخص شد که نشانگر REP-PCR با ۱۱ قطعه و ۹۲ درصد چندشکلی و نشانگر BOX-PCR با ۱۰ قطعه و ۹۱ درصد چندشکلی، بین باکتری‌های مورد مطالعه تفاوت وجود داشت.



شکل ۱: الکتروفورز محصول PCR نشانگر (A)REP-PCR و نشانگر BOX-PCR (B) DNA باکتری‌های مورد مطالعه (حرف Mو اعداد ۱ الی ۲۰ به ترتیب بیانگر نشانگر ۱۰۰bp و شماره باکتری‌های مورد مطالعه. می‌باشد).

به‌منظور گروه‌بندی نمونه‌های مورد مطالعه براساس ضرایب تشابه جاکارد، دندروگرام به دست آمده در ضریب تشابه ۷۰ درصد قطع شد. نتایج نشان داد که باکتری‌های مورد مطالعه در ۵ گروه اصلی قرار گرفتند و نمونه شماره ۱ جمع‌آوری شده از خرم‌آباد به تنهایی تشکیل یک گروه داد. تمامی باکتری‌های جداسازی شده از نمونه‌های شیر شهرستان خرم‌آباد در گروه‌های مشابهی قرار گرفتند و به طور کلی ۳ گروه اول به این باکتری‌ها تعلق داشت (شکل ۲).

باکتری‌های شهرستان بروجرد نیز به طور مشترک در گروه چهارم قرار گرفتند. نتایج گروه‌بندی نشان داد که گروه‌های تشکیل شده با الگوی جغرافیایی نمونه‌های باکتری جمع‌آوری شده تا اندازه زیادی مطابقت داشت با این وجود برخی باکتری‌های مربوط به نواحی مشابه در گروه‌های متفاوتی قرار گرفتند (شکل ۲).



شکل ۲: تجزیه خوشه‌ای و گروه‌بندی باکتری‌های مورد مطالعه با استفاده از ضرایب تشابه جاکارد.

بحث

از تکنیک‌ها و روش‌های اولیه‌ای نظیر آزمون‌های بیوشیمیایی و مشاهدات مورفولوژیک، در فرایند شناسایی باکتری‌ها به فراوانی استفاده می‌گردد. آزمون‌های گرم، کاتالاز و آنتی‌بیوگرام از جمله این گروه از تکنیک‌ها بوده که علیرغم محدودیت‌هایی نظیر زمان‌بر بودن و ابهام در نتایج، از اهمیت و کاربرد بالایی برخوردار هستند. بر همین اساس برای افزایش دقت و سرعت در شناسایی باکتری‌ها، استفاده از روش‌های مولکولی مورد توجه قرار گرفته است. تکثیر و توالی‌یابی ژن 16SrDNA را

می‌توان تکنیک دقیق و کارآمدی در شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی باکتری‌ها دانست (۱۷)

در مطالعه حاضر به طور موفقیت‌آمیزی با استفاده از محیط و شرایط اختصاصی، باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* از نمونه‌های شیر مادر جداسازی و توسط آزمون‌های گرم، کاتالاز و آنتی‌بیوگرام، مورد تائید قرار گرفت. براساس توالی ژن 16SrDNA سه گونه باکتری *فرمنتوم*، *کونکئی* و *آپودمی از جنس لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند. نتایج بیانگر این موضوع است که شیر مادر ترکیب متنوعی از گونه‌های *لاکتوباسیلوس* بوده و این تنوع در مناطق جغرافیایی مختلف قابل مشاهده است.

در همین راستا لی (Li) و همکاران (۲۰۱۷) توانستند تنوع ژنتیکی و جغرافیایی فلور میکروبی شیر مادر در مناطق مختلف را با استفاده از توالی‌یابی ژن 16SrDNA مورد تائید قرار دهند. در مطالعه آنها نشان داده شد که تفاوت در نواحی جغرافیایی بر فلور میکروبی بسیار تاثیرگذار است (۱۸). در مطالعات متعدد دیگری نشان داده شده که جمعیت میکروبی شیر مادر تحت تاثیر مراحل مختلف و زمان شیردهی است و سایر عوامل فرعی نظیر فاکتورهای ژنتیکی، رژیم غذایی، شرایط فیزیکی و شاخص توده بدنی مادر نیز موثر هستند (۱۸و۱۹). بر همین اساس تنوع گونه‌ای مشاهده شده در نمونه‌های مطالعه حاضر را می‌توان به اختلافات ناشی از سن زایمان، تنوع تغذیه‌ای، شرایط فیزیکی و سن اهدا کننده دانست.

کومار (Kumar) و همکاران (۲۰۱۶) نیز نشان دادند که تنوع مشاهده شده در فلور میکروبی نمونه‌های جمع‌آوری شده از شیر مادر کشورهای مختلف مورد مطالعه، با نوع زایمان و تغذیه مادران ارتباط دارد (۲۱). دوماسنو (Damaceno) و همکاران (۲۰۱۷) تنوع مشاهده شده گونه‌های باکتری لاکتوباسیلوس شیر مادر را مورد تاکید قرار داده و نشان دادند که این تنوع با شرایط جغرافیایی و سبک زندگی مادران همبستگی بسیار بالایی دارد (۲۲).

براساس تنوع مشاهده شده توسط دو نشانگر REP-PCR و BOX-PCR در ۲۰ باکتری جدا شده، ۵ گروه اصلی تشکیل شد. میانگین ضرایب تشابه حدود ۷۰ درصد بود که بیانگر تنوع بالای ژنتیکی در بین باکتری‌های مورد مطالعه بود. گروه‌بندی صورت گرفته تا حدود زیادی با فواصل جغرافیایی و نواحی جمع‌آوری نمونه‌ها همخوانی داشت. با این وجود برخی نمونه‌های جمع‌آوری شده از نواحی مشابه در گروه‌های مجزایی قرار گرفتند.

در همین رابطه عبدی و همکاران (۲۰۲۱) تنوع ژنتیکی، خواص پروبیوتیکی و ترکیب باکتریوسینی شیر مادر را گزارش داده و بیان نمودند که علاوه بر فواصل جغرافیایی، سن زایمان از عوامل اصلی تنوع مشاهده شده است (۲۳). ماسکو (Masco) و همکاران (۲۰۰۳) ضمن جداسازی گونه‌های مختلف باکتری *لاکتوباسیلوس* از شیر مادر توانستند گروه‌بندی مناسبی براساس اطلاعات نشانگر BOX-PCR ارائه دهند (۲۴). میانگین ضرایب تشابه در مطالعه آنان حدود ۷۵ درصد برآورد شده است. نتایج مشابهی توسط جاست (Jost) و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش شده است. میانگین تنوع ژنتیکی در مطالعه این محققین حدود ۷۰ درصد بیان شده است (۲۵). فواصل ژنتیکی و گروه‌بندی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* شیر مادر در مطالعه حاضر با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد.

نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی ژن 16SrDNA و ترسیم درخت فیلوژنتیکی و پروفایل حاصل از نشانگرهای ژنتیکی REP-PCR و BOX-PCR بیانگر تطابق بالای نتایج به‌دست آمده در هر سه تکنیک بود و توانایی بالای انگشت‌نگاری ژنتیکی در تمایز باکتری‌های جداسازی شده را نشان داد. استفاده از نشانگرهای مبتنی بر PCR جهت برآورد تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی، برآورد صحیحی از فواصل ژنتیکی، در دسترس محققین قرار می‌دهد. با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد باکتری‌های *لاکتوباسیلوس*، تولید زیست توده صنعتی این باکتری‌ها امکان‌پذیر است (۲۶) و می‌توان از آن‌ها در تولید محصولات لبنی تجاری استفاده نمود.

نتیجه‌گیری

شیر مادر به‌عنوان منبع غنی غذایی اولیه برای کودک و به دلیل دارا بودن باکتری‌های پروبیوتیک، نقش مهمی در سلامتی و

افزایش سیستم ایمنی انسان در دوران کودکی و پس از آن را بر عهده دارد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که گونه‌های مختلفی از باکتری *لاکتوباسیلوس* در شیر مادر وجود دارند که به دلیل خصوصیات گوارشی مفید از جمله مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و شرایط سخت دستگاه گوارش، از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند. تنوع ژنتیکی بالای مشاهده شده بین جدایه‌ها، ضمن مطابقت با اختلافات اکولوژیکی و فواصل جغرافیایی، بیانگر تاثیر عوامل مختلف از جمله نحوه زایمان و شرایط پس از آن دارد. به‌طور کلی می‌توان بیان داشت که استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای تکثیر نواحی حفاظت شده BOX و REP، در برآورد تنوع ژنتیکی و گروه‌بندی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس* بسیار موفق خواهند بود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و و داده‌سازی را در مقاله حاضر رعایت نموده و ارائه نتایج به دست آمده مبتنی بر آزمایشات را تایید می‌نمایند.

تشکر و قدردانی

تمامی مراحل این پژوهش در آزمایشگاه مرکزی نانوزیست‌فناوری و مهندسی ژنتیک دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد اجرا شده است. بدین‌وسیله از مدیریت و تمامی کارکنان این آزمایشگاه تشکر و قدردانی می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Pradhan D, Mallappa RH, Grover S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. Food Control. 2020;108:106872.
2. Selma-Royo M, Lerma JC, Cortes-Macias E, Collado MC, editors. Human milk microbiome: from actual knowledge to future perspective. Seminars in perinatology; 2021: Elsevier.
3. Eriksen KG, Christensen SH, Lind MV, Michaelsen KF. Human milk composition and infant growth. Current opinion in clinical nutrition and metabolic care. 2018;21(3):200-6.
4. Plaza-Díaz J, Fontana L, Gil A. Human milk oligosaccharides and immune system development. Nutrients. 2018;10(8):1038.
5. Mosca F, Giannì ML. Human milk: composition and health benefits. La Pediatria Medica e Chirurgica. 2017;39(2).
6. Mitchell CM, Mazzoni C, Hogstrom L, Bryant A, Bergerat A, Cher A, et al. Delivery mode affects stability of early infant gut microbiota. Cell Reports Medicine. 2020;1(9).
7. Yang B, Chen Y, Stanton C, Ross RP, Lee Y-K, Zhao J, et al. *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* composition at species level and gut microbiota diversity in infants before 6 weeks. International journal of molecular sciences. 2019;20(13):3306.
8. Lyu L, Zhou X, Zhang M, Liu L, Niu H, Zhang J, et al. Delivery mode affects intestinal microbial composition and the development of intestinal epithelial cells. Frontiers in Microbiology. 2021;12:626144.
9. Granger CL, Embleton ND, Palmer JM, Lamb CA, Berrington JE, Stewart CJ. Maternal breast milk, infant gut microbiome and the impact on preterm infant health. Acta Paediatrica. 2021;110(2):450-7.
10. Mohammadi F, Eshaghi M, Razavi S, Sarokhalil DD, Talebi M, Pourshafie MR. Characterization of bacteriocin production in *Lactobacillus* spp. isolated from mother's milk. Microbial pathogenesis. 2018;118:242-6.
11. Norouzi J, Hanafari A, Beiglari Sh. Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria in the people's mouth and studying on their inhibitory effect on some entropathogenic bacteria. Journal of Microbial World. 2009 Sep;1(1):29-38. [In Persian]
12. Tahmourespoor S, Tahmourespour A, Kermanshahi RK. Anti adhesive effect of *Lactobacillus rhamnosus* as a probiotic on oral Streptococci. Journal of Microbial World. 2014 Jun;7(2): 128-137. [In Persian]
13. de Almeida Júnior WLG, da Silva Ferrari Í, de Souza JV, da Silva CDA, da Costa MM, Dias FS. Characterization and evaluation of lactic acid bacteria isolated from goat milk. Food control. 2015;53:96-103.

14. Martín Ro, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín MaL Olivares M, et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. Trends in Food Sci and Tech. 2004; 15(3-4): 121-7.

15. Gevers D, Huys G, Swings J. Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of Lactobacillus species. FEMS microbiology letters. 2001;205(1):31-6.

16. Lee CM, Sieo CC, Cheah YK, Abdullah N, Ho YW. Discrimination of probiotic Lactobacillus strains for poultry by repetitive sequenced-based PCR fingerprinting. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2012;92(3):660-6.

17. Collins M, Rodrigues U, Ash C, Aguirre M, Farrow J, Martinez-Murcia A, et al. 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):5-12.

18. Li S, Watanabe K, Hsu C, Chao S, Yang Z, Lin Y, et al. Bacterial composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and mainland China. Front Microbiol 8: 965. 2017.

19. Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between milk microbiota, bacterial load, macronutrients, and human cells during lactation. Frontiers in microbiology. 2016;7:492.

20. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. nature. 2009;457(7228):480-4.

21. Kumar H, Du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. Frontiers in microbiology. 2016;7:1619.

22. Damaceno QS, Souza JP, Nicoli JR, Paula RL, Assis GB, Figueiredo HC, et al. Evaluation of potential probiotics isolated from human milk and colostrum. Probiotics and antimicrobial proteins. 2017;9:371-9.

23. Abdi M, Lohrasbi V, Asadi A, Esghaei M, Jazi FM, Rohani M, et al. Interesting probiotic traits of mother's milk Lactobacillus isolates; from bacteriocin to inflammatory bowel disease improvement. Microbial Pathogenesis. 2021;158:104998.

24. Mosca F, Giannì ML. Human milk: composition and health benefits. La Pediatria Medica e Chirurgica. 2017;39(2).

25. Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother–neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. Environmental microbiology. 2014;16(9):2891-904.

26. Armand M, Gasemi MF, Fazeli MR, Mirpour, M. Optimization of biomass production by probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnonsus* at pilot-plant scale. Journal of Microbial World. 2020 Sep;13(3):202-214. [In Persian]