

اندازه گیری میزان آبگریزی، چسبندگی و کلونیزاسیون لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی

فرگس واسجی^۱، مهدیه ایرانمنش^۲، ملیحه حاج قاسمی^۳، محمد امیر کریمی ترشیزی^۴، ناهید مژگانی^{۵*}
۱- مربی پژوهشی، بخش پژوهش های بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور - سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی، کرج-ایران

۲- دکترای علوم و صنایع غذایی-دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم و تحقیقات تهران-ایران

۳- محقق بخش تولید و توسعه، شرکت فن آوری زیستی طبیعت گرا-کرج-ایران

۴- دانشیار گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس - تهران-ایران

۵- دانشیار بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و

ترویج کشاورزی، کرج-ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸

چکیده

در این تحقیق توانایی و میزان چسبندگی لاکتوباسیل های پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. جهت اجرای پروژه، از باکتری های اسید لاکتیک که قبلاً از منابع مختلف (لبنیات، شیر مادر و روده طیور) جدا شده بودند و بر اساس روش های فوتوبی و توالی یابی 16S rRNA در حد جنس و خواص پروبیوتیکی آنها نیز تایید و در کلکسیون میکروبی مؤسسه رازی ثبت شده بودند، استفاده گردید. تمامی سویه ها از نظر تجمع باکتریایی بین میکروارگانسیم های همان سویه (اگرگیشن)، تجمع باکتریایی بین سویه های متفاوت (کو اگرگیشن) و فعالیت هیدروفوبیسیته مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس توانایی و میزان چسبندگی سویه ها به سلول های سرطانی Caco-2 مورد بررسی قرار گرفت. در کل ده سویه لاکتوباسیلوس ها شامل ۸ جدایه بومی (لاکتوباسیلوس پلاتناروم (۲)، لاکتوباسیلوس کازئی (۱)، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۱)، لاکتوباسیلوس سالیواریوس (۱)، لاکتوباسیلوس روتری (۱)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۱) و یک جدایه لاکتوباسیلوس رامنوسوس) و دو سویه استاندارد (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC43556 و لاکتوباسیلوس رامنوسوس ATCC 7469) برای این آزمایشات انتخاب شدند. فعالیت اگرگیشن و کو اگرگیشن، بعد از گذشت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت به طوری که لاکتوباسیلوس کازئی RTCC1296-3 بالاترین فعالیت اگرگیشن و کو اگرگیشن را به ترتیب به میزان ۸۴٪ و ۲۸٪ از خود نشان داد. تفاوتی چشمگیری در مقادیر هیدروفوبیسیته نیز مشاهده شد. این مقادیر بین ۴۳٪ و ۸۰٪ بودند که بیشترین مقدار هیدروفوبیسیته برای لاکتوباسیلوس سالیواریوس RTCC 1304 و کمترین مقدار برای لاکتوباسیلوس پلاتناروم RTCC 1290 بدست آمد. تمام جدایه ها قابلیت اتصال به سلول های Caco-2 را داشته، سویه لاکتوباسیلوس کازئی RTCC1296-3 با ۳۵٪ و لاکتوباسیلوس پلاتناروم RTCC 1290 با ۱۰٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان اتصال را از خود نشان دادند. نتایج نشان دادند که بعضی از سویه های مورد بررسی در این مطالعه توانایی کلونیزاسیون در شرایط روده را دارند و پس از بررسی های بیشتر به ویژه در شرایط درون تنی، می توانند بعنوان باکتری های پروبیوتیک مناسب معرفی شوند.

کلمات کلیدی: کلونیزاسیون، باکتری های اسید لاکتیک، آبگریزی، کو اگرگیشن، CaCo-2

* نویسنده مسئول: ناهید مژگانی

آدرس: دانشیار بخش بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران. تلفن: ۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸
پست الکترونیک: dnmoj@yahoo.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، گروهی از میکروارگانیسم‌های زنده ای هستند که در صورت افزوده شدن به مواد غذایی و یا مصرف آنها به شکل مکمل، می‌توانند با ایجاد یک تعادل بیولوژیک در بدن، موجب بهبود سلامت میزبان (۱، ۱۲) و ایجاد تاثیرات مفیدی همچون کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی (۲)، داشتن فعالیت تخمیری، رشد و ماندگاری مناسب در محصولات غذایی، مقاومت در برابر فاژها، تنظیم فلور نرمال حفره‌های دهانی و روده و مهار باکتری‌های بیماری‌زا و مضر شوند (۱۹). باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها (*Lactobacillus*) از متداول‌ترین باکتری‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می‌باشند. گونه‌های مختلف پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌ها دارای خواص و ویژگی‌های ایمنی و بهداشتی قابل توجه و گسترده هستند (۲۰). از عوامل موثر برای تشخیص یک باکتری پروبیوتیک می‌توان به غیر بیماری‌زایی، عدم ارتباط با باکتری‌های مولد اسهال، توانایی در حفظ پایداری ژنتیکی و عدم توانایی در انتقال ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قابلیت چسبندگی (که اولین مرحله استقرار است) اشاره نمود (۱۷). یکی از مهمترین اقدام جهت انتخاب یک سویه به عنوان پروبیوتیک تعیین قابلیت چسبندگی آن سویه به مخاط میزبان می‌باشد، تا علاوه بر پیشگیری از چسبندگی باکتری‌های بیماری‌زا، با ترشح برخی مواد بتواند محیط را برای رشد آنها نامساعد سازد و بتواند با اتصال به سلول‌های اپیتلیال، مکان‌های هدف باکتری‌های پاتوژن را اشغال کرده و مانع از اتصال و تهاجم آنها به دستگاه گوارش شوند (۱۱). همچنین باکتری‌های پروبیوتیک برای دستیابی و کلونیزاسیون در روده ملزم به عبور از pH

اسیدی معده و املاح صفراوی روده می‌باشند. از این رو مقاومت در برابر اسید و املاح صفراوی خصوصیات اساسی جهت انتخاب باکتری پروبیوتیک هستند. ویژگی‌های کلونیزاسیون اکثر جدایه‌های پروبیوتیک نشان دهنده خاصیت سویه است (۱۵). قابلیت چسبندگی باکتری‌ها به جلوگیری از چسبیدن عامل بیماری‌زا، ترمیم موکوس صدمه دیده و طولانی کردن استقرار توسط باکتری کمک می‌کند (۴، ۱۸). مشکلات موجود در مطالعه اتصال باکتری‌ها در بدن موجود زنده منجر به توسعه مدل‌های آزمایشگاهی مختلف برای بررسی چسبندگی در محیط آزمایشگاهی شده است که می‌توان از موکوس یا لایه سلولی متناسب با اندام هدف استفاده نمود (۱). به نظر می‌رسد اتواگریگشن (*auto aggregation*) گونه‌های پروبیوتیکی برای اتصال به سلول‌های اپیتلیال ضروری است و همچنین توانایی آنها برای ایجاد کو-اگریگشن (*co-aggregation*) با دیگر باکتری‌ها مثل پاتوژن‌ها، مانع از کلونیزاسیون آنها می‌شود. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سطح سلول مانند هیدروفوبیسیته ممکن است بر اگریگشن و اتصال باکتری‌ها به سطوح مختلف تاثیر بگذارد. آزمایشات اگریگشن، اتواگریگشن، کو-اگریگشن و آبگریزی سطحی می‌تواند به عنوان راه‌های ابتدایی شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک با خصوصیات چسبندگی و با ویژگی‌های مناسب برای اهداف تجاری استفاده شوند. در آزمایشات مربوط به چسبندگی، بررسی اتصال باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال همواره به عنوان یک مرحله مهم در انتخاب گونه پروبیوتیک مناسب در نظر گرفته شده است (۵). در بسیاری از این مطالعات از سلول‌های Caco-2 به منظور شبیه سازی شرایط داخلی بدن استفاده شده است. این سلول‌ها اولین بار از آدنوکارسینوم کولون در انسان

(سالمونلا تیفی موریوم) مورد استفاده در این مطالعه نیز در محیط کشت BHI (Brain heart infusion) (Merck) تحت شرایط هوازی، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

اندازه گیری میزان آبگریزی (Hydrophobicity assay)

بررسی میزان آبگریزی باکتری‌های مورد نظر با استفاده از زایلین (xylene) انجام شد. رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه بدست آمد. سپس رسوب بدست آمده به وسیله بافر فسفات پتاسیم با pH ۶/۵ شستشو داده شد و پس از انحلال مجدد در ۵ میلی لیتر از همین بافر، جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. (A₀). پس از اضافه کردن ۱ میلی لیتر زایلین به محلول و مخلوط کردن آن به مدت ۲ دقیقه، اجازه داده شد تا فازها از هم جدا شود. سپس فاز آبی رویی را جدا کرده جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد. (A). در نهایت درصد هیدروفوبیسیته با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۲۱).

$$H\% = [(A_0 - A)/A_0] \times 100$$

H: درصد آبگریزی

A₀: جذب نوری قبل از مخلوط کردن

A₁: جذب نوری بعد از مخلوط کردن

آزمون آگریگشن و کو آگریگشن (Auto-aggregation, Co-aggregation)

ابتدا باکتری‌های کشت داده شده، توسط سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. سپس رسوب حاصل دو بار با PBS (phosphate buffered saline) شستشو داده شد و در نهایت رقت ۱۰^۸ CFU ml⁻¹ از رسوب در PBS تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی (۴ میلی لیتر) به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط و در نهایت تجمع خودکار پس از ۵ ساعت انکوبه کردن در

بدست آمده و آنزیم‌ها و حاشیه‌ی مسواکی آن مشابه سلول‌های گوارشی در بدن موجود زنده است. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که میزان اتصال و پایداری لاکتوباسیل‌ها متفاوت است. انتخاب گونه‌ای از لاکتوباسیل‌ها یا بیفیدو باکتری‌ها که بیشترین اثر را بر روی سلامت انسان و حیوانات داشته باشد همیشه حائز اهمیت بوده است (۱۶). هدف از این بررسی ارزیابی ویژگی‌های کلونیزاسیون گونه‌های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک و شرایط رشد

در این تحقیق باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) از مواد غذایی، روده طیور، مدفوع انسانی جداسازی و سویه‌های استاندارد ATCC به عنوان کنترل استفاده شدند (جدول ۱). دو جدایه لاکتوباسیلوس پلاتاروم، یک جدایه لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس فرمنتوم از روده طیور، یک جدایه لاکتوباسیلوس کازبی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از محصولات لبنی، یک جدایه لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس رامنوسوس از مدفوع انسانی و دو نمونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC ۴۳۵۵۶ و لاکتوباسیلوس رامنوسوس ATCC ۷۴۶۹ به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی جدایه‌ها مورد استفاده در مطالعات قبلی شناسایی و بعنوان پروبیوتیک در کلکسیون میکروبی موسسه رازی ثبت گردیده اند (مژگانی و همکاران ۱۳۹۶)

نمونه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS (De Man Rogosa Sharpe) مایع (Merck) کشت و در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. باکتری پاتوژن



لوله‌های کنترل حاوی ۴ میلی لیتر از هریک از باکتری‌ها به تنهایی است (۲۱).

بررسی اتصال باکتری‌ها به سلول Caco-2 کشت سلول

سلول‌های سـرطانی Caco-2 (Human colonic adenocarcinoma cell) از شرکت GIBCO آمریکا تهیه شد. مقدار یک میکروتیوب از سلول فریز شده Caco-2، داخل فلاسک حاوی محیط کشت سلولی Dulbecco's modified Eagle's (DMEM medium) کشت داده شد. این محیط کشت با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۲ میلی مول گلوتامین، ۱۰۰ واحد/میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتر استرپتومایسین، غنی شده بود. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO₂ به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از ۷۲ ساعت، سلول‌ها برای ادامه رشد، پاساژ (subculture) داده شدند (۳).

اتصال باکتری‌ها به سلول و محاسبه درصد جذب

پس از گذشت ۱۵ روز از زمان کشت اولیه سلول‌ها، محیط کشت درون چاهک‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. همچنین به هر چاهک، ۵۰۰ میکرولیتر محیط DMEM بدون آنتی بیوتیک اضافه شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی ۱۰ باکتری (که با استفاده از تست مک فارلند و خواندن OD بدست آمده بود)، به هر چاهک منتقل گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO₂، گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲ ساعت، محیط رویی

دمای ۲۵ درجه مورد بررسی قرار گرفت. در هر ساعت ۰/۱ میلی لیتر از مایع رویی برداشت شده و با ۳/۹ میلی لیتر از PBS مخلوط و جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان درصد اتواگریگشن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{Auto-aggregation (\%)} = 1 - (A1/A0) \times 100$$

A0: جذب به دست آمده در زمان t=0

A1: جذب به دست آمده از زمان های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ ساعت

اتصال باکتری‌ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم و به وسیله ی میکروسکوپ نوری بررسی شد.

کو اگریگشن نمونه‌های ذکر شده، توسط پاتوزن سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت. بالا بودن سرعت و میزان تجمع بخصوص با باکتری‌های بیماری‌زا به عنوان مزیت پروبیوتیک تلقی می‌شود. رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. پس از دوبار شستشوی رسوب با PBS، رقت ۱۰^۸ CFU ml⁻¹ از باکتری‌ها تهیه شد. سپس حجم‌های مساوی از باکتری پروبیوتیک و پاتوزن (از هریک به میزان ۲ میلی لیتر) تهیه شد و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط و در دمای ۲۵ درجه قرار داده شدند. همانند مراحل قبل، جذب آن در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد کو اگریگشن با استفاده از معادله ی زیر محاسبه شد:

$$\text{Co-aggregation (\%)} = \frac{((Ax+Ay)/2) - A(x+y)}{Ax+Ay/2} \times 100$$

x و y: نشان دهنده ی جذب هریک از دو نمونه در لوله‌های کنترل

(x+y): جذب ترکیب دو باکتری با هم

همچنین اتصال دو باکتری پروبیوتیک و پاتوزن به یکدیگر از طریق رنگ آمیزی گرم نیز بررسی شد.

B0: تعداد کلنی هاپس از کشت رقت اولیه‌ی

باکتری‌های انتقال داده شده

B1: تعداد کلنی‌ها پس از ۴۸-۲۴ ساعت کشت در پلیت

آگار MRS

تحلیل آماری

نتایج آزمون با سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت.

جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰)

استفاده شد. از روش دانکن نیز به منظور مقایسه نتایج و

تعیین اختلاف معنی دار ($P > 0.05$) استفاده شد و نتایج

به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد. همچنین

جهت ترسیم نمودار از Excel استفاده گردید.

نتایج

میزان آبدوستی، کو آگریگشن، اتواگریگیشن، اتصال به

سلول Caco-2 و درصد جذب اتصال به سلول در ۱۰

باکتری جداشده از منابع مختلف مورد بررسی قرار

گرفت (جدول ۱).

حاوی باکتری‌های اتصال نیافته توسط میکروپیت

برداشته شد. سلول‌ها ۴ بار و هر بار با ۱ میلی لیتر

تریپسین - EDTA (۰/۰۲۵ درصد)، به ترتیب مربوط به

شرکت‌های Fluka, Difco، شسته شدند. سپس سلول

ها به آرامی و به وسیله میکروپیت از ته پلیت جدا

شده و بلافاصله تریپسین آن سانتریفیوژ و جدا گردید و

به جای آن ۱ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع اضافه

شد. در نهایت به وسیله ی PBS استریل رقت‌های

سریالی از آن‌ها تهیه و بر روی پلیت آگار MRS کشت

داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷

درجه انکوبه شده سپس تعداد کلنی‌ها شمارش

شدند (B1 cfu/ml). همچنین از رقت اولیه‌ی (10^8)

باکتری‌های انتقال داده شده بر روی سلول نیز رقت‌هایی

تهیه شد و بر روی پلیت MRS آگار برده شد (cfu/ml

B0). درصد باکتری‌های متصل شده توسط این فرمول

محاسبه شد ($3,10$).

$$\text{Adhesion} = (B1 / B0) * 100\%$$

جدول ۱- باکتری‌های اسید لاکتیک مورد استفاده در این تحقیق

ردیف	کد های انتخابی	باکتری های اسید لاکتیک	منبع	شماره ثبت
۱	TA0028	لاکتوباسیلوس پلاتاروم	روده طیور	RTCC 1290
۲	TA0031	لاکتوباسیلوس پلاتاروم	روده طیور	RTCC 1290-1
۳	TA0014	لاکتوباسیلوس روتری	شیر مادر	RTCC 1306
۴	TA0179	لاکتوباسیلوس فرمنتوم	روده طیور	RTCC 1303
۵	TA0200	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	محصولات لبنی	RTCC 1299
۶	TA0021	لاکتوباسیلوس کازنی	محصولات لبنی	RTCC 1296-3
۷	TA0180	لاکتوباسیلوس سالیواریوس	شیر مادر	RTCC 1304
۸	TA0026	لاکتوباسیلوس رامنوسوس	شیر مادر	RTCC 1293-1
۹	ATCC	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	ATCC	ATCC 43556
۱۰	ATCC	لاکتوباسیلوس رامنوسوس	ATCC	ATCC 7469

RTCC: Razi Type Culture Collection; ATCC: American Type Culture Collection

فرمنتوم RTCC 1303 و لاکتوباسیلوس کازنی

RTCC 1296-3 کمترین میزان و با سایر جدایه‌ها

تفاوت معنی دار داشتند ($P > 0.05$). از طرف دیگر

میزان هیدروفوبیستی بین جدایه لاکتوباسیلوس

رامنوسوس ATCC 7469، لاکتوباسیلوس

میزان آبدوستی در جدایه لاکتوباسیلوس رامنوسوس

(RTCC 1293-1) بیشترین میزان را داشت و البته با دو

جدایه لاکتوباسیلوس پلاتاروم RTCC 1290 و

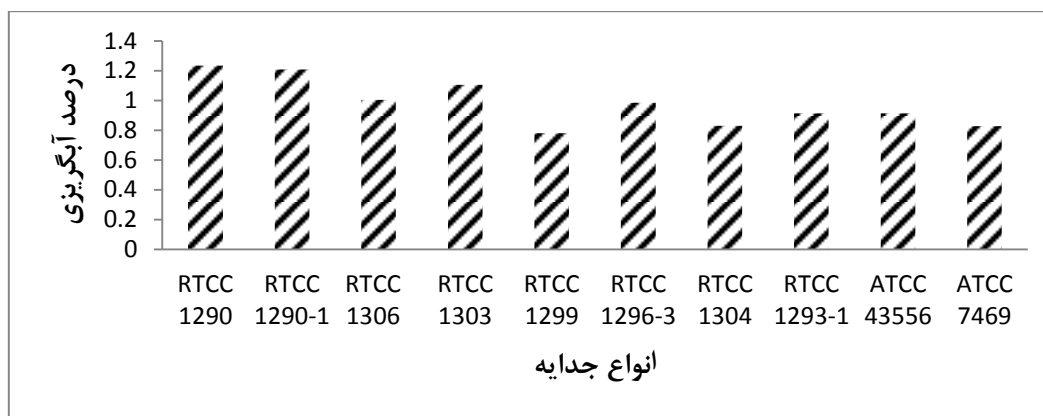
RTCC 1290-1 تفاوت معنی دار نداشت (نمودار ۱).

همچنین میزان آبدوستی در جدایه‌های لاکتوباسیلوس

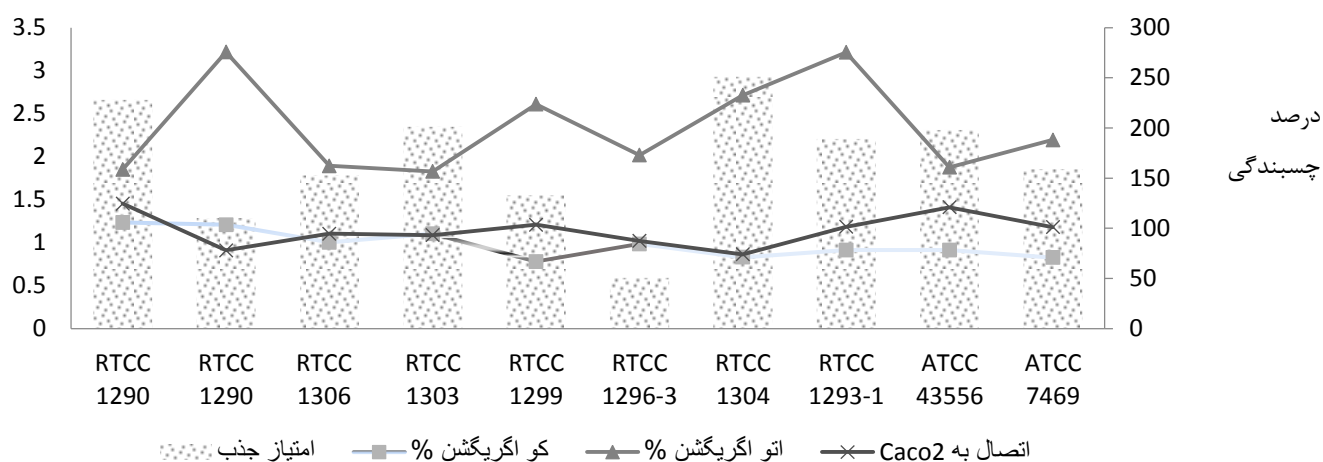
میزان اتصال به سلول Caco-2 در لاکتوباسیلوس پلانناروم RTCC 1290 بیشترین بود که البته بیشترین فعالیت کواگریگشن را نیز داشت و میزان اتصال در این جدایه با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC 43556، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس RTCC 1299، لاکتوباسیلوس رامنوسس RTCC 1293-1 و لاکتوباسیلوس رامنوسس ATCC 7469 تفاوت معنی داری نداشت و کمترین میزان اتصال در لاکتوباسیلوس سالیاریوس RTCC 1304 مشاهده شد.

در شکل ۱ چسبندگی جدایه ها به سطح سلول نمایش داده شده است. درصد جذب باکتری های منتخب به سلول در دو جدایه لاکتوباسیلوس سالیاریوس RTCC 1304 و لاکتوباسیلوس پلانناروم RTCC 1290 بیشترین بود که البته جدایه اخیر دارای بیشترین میزان اتصال به سلول Caco-2 و فعالیت کواگریگشن بود، در مقابل لاکتوباسیلوس سالیاریوس RTCC 1304 کمترین میزان اتصال به سلول Caco-2 را داشت. در لاکتوباسیلوس کازئی RTCC 1296-3 کمترین میزان جذب مشاهده شد که با سایر جدایه ها تفاوت معنی داری داشت، همچنین این جدایه دارای میزان کم اتصال به سلول Caco-2 را نیز داشت. ($P > 0.05$).

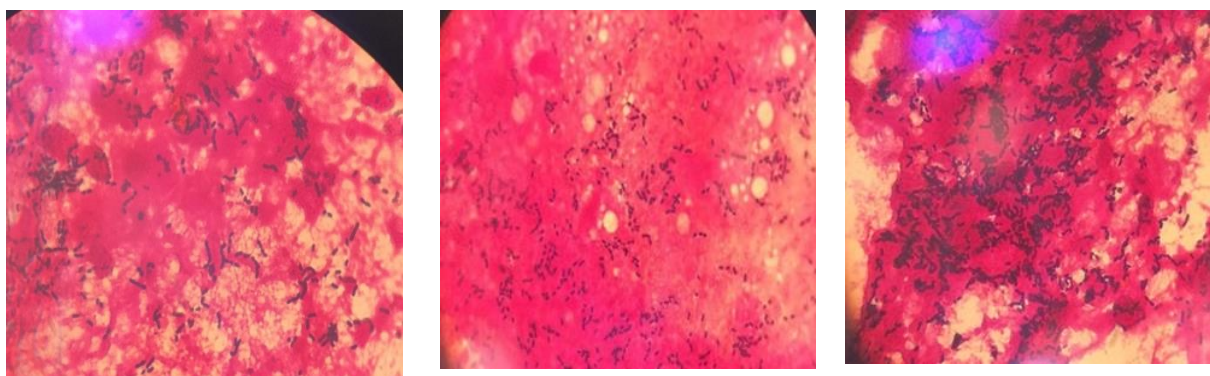
روتتری RTCC 1306 و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس RTCC 1299 تفاوت معنی داری وجود نداشت. سایر ویژگی های جدایه های منتخب در نمودار ۲ نشان داده شده است. طبق نمودار تمامی جدایه ها دارای خاصیت کواگریگشن با پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم را داشتند. فعالیت کواگریگشن در بین اکثر جدایه ها تفاوت معنی داری نداشت و در لاکتوباسیلوس پلانناروم RTCC 1290 بیشترین و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس RTCC 1299 کمترین فعالیت را داشت. فعالیت اتواگریگشن در لاکتوباسیلوس رامنوسس RTCC 1293-1 و لاکتوباسیلوس پلانناروم RTCC 1290-1 بیشترین بود و با سایر جدایه ها تفاوت معنی داری داشتند ($P > 0.05$). همچنین کمترین فعالیت در لاکتوباسیلوس فرمنتوم RTCC 1303 مشاهده شد که البته میزان فعالیت در این جدایه با جدایه های دیگر مانند لاکتوباسیلوس پلانناروم RTCC 1290، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC 43556، لاکتوباسیلوس روتتری RTCC 1306 و لاکتوباسیلوس کازئی RTCC 1296-3 تفاوت معنی داری نداشت. ($P < 0.05$).



نمودار ۱: درصد آبگریزی جدایه های اسید لاکتیک



نمودار ۲: درصد چسبندگی سویه های اسید لاکتیک با روش های اتو آگریگشن، کو آگریگشن، و اتصال به سلول های Caco2



شکل ۱- میزان چسبندگی سویه های اسید لاکتیک به سلول های سرطانی Caco-2

بحث و نتیجه گیری

چسبندگی سلولی یک پروسه پیچیده بوده و شامل تماس بین غشای سلول باکتری و سطوح قابل دسترس می باشد. توانایی چسبندگی به سلول های اپیتلیال و سطوح موکوس یا اتصال به باکتری های پاتوژن، مانع از اتصال پاتوژن ها به سطح روده شده و به مرور باعث حذف پاتوژن ها از دستگاه گوارش می گردد. این خاصیت به عنوان یک ویژگی مهم در بسیاری از باکتری های پروبیوتیک مطرح شده است (۷).

در گزارشات مختلف بر روی ترکیبات، ساختار و فاکتورهای مرتبط با چسبندگی باکتری ها به سلول های اپیتلیال روده (۹، ۱۴). و موکوس (۱۳، ۷). ارائه شده است. در اکثر مواقع، توانایی تجمع باکتری ها مربوط به ویژگی های سلول های چسبنده می باشد. تجمع باکتریایی بین میکروارگانیسم های همان گونه (اتو آگریگشن) یا بین سویه های متفاوت (کو آگریگشن) در چندین نیچ اکولوژیکی بخصوص در روده انسان، که پروبیوتیک ها در آن جا فعال می باشند به میزان قابل

نشان دادند، اما این نتایج کاملاً به زمان و شرایط انکوباسیون و همچنین به نوع سویه وابسته بود (۸). در طی مطالعاتی نیز مشخص شد، سویه‌هایی که بالاترین سطح هیدروفوبیسیته را دارند، مقدار چسبندگی به سلول‌های اتروسیت خوکی بیشتری را از خود نشان دادند (۲۲). نتایج حاصل از مطالعات تحقیق حاضر نشان داد، با افزایش میزان اتو آگریگشن، هیدروفوبیسیته نیز افزایش می‌یابد. نمونه‌هایی با هیدروفوبیسیته بالا چسبندگی خوبی را نشان دادند. اما ارتباط آماری منطقی بین مقدار اتو آگریگشن و چسبندگی یافت نشد. با این همه در نمونه‌های با اتو آگریگشن بالا معمولاً چسبندگی خوبی مشاهده شد. در مجموع چسبندگی نمونه‌های جدا شده از طیور و مدفوع انسانی نسبت به سایر نمونه‌ها بیشتر بود. برخی نمونه‌ها با اتو آگریگشن بالا و هیدروفوبیسیته مناسب نسبت به سایر باکتری‌ها، جذب چندانانی به سلول‌های caco-2 نداشتند. بنابراین نتیجه می‌شود که تنها از طریق چسبندگی نمی‌توان باکتری پروبیوتیک با ویژگی‌های مناسب را برگزید و باید سایر معیارها نیز سنجیده شود. Vlkova و همکاران نشان دادند، هیچ ارتباطی بین هیدروفوبیسیته و توانایی اتو آگریگشن وجود ندارد. اما بیفیدوباکتریوم‌هایی با بیشترین میزان کواگریگشن بیشترین میزان اتو آگریگشن را نیز نشان دادند. همچنین اتصال بیفیدوباکتریوم‌ها به سلول‌های روده‌ای و توانایی کواگریگشن در آن‌ها بسیار وابسته به نوع سویه است (۲۱ و ۲۲).

توجهی مهم است (۸). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، که نمونه‌هایی با اتو آگریگشن بالا توانایی چسبندگی به سلول را نیز دارند. اما فقط در برخی نمونه‌ها افزایش اتو آگریگشن باعث افزایش در میزان چسبندگی به سلول‌های Caco-2 شد. گزارش شده که اتو آگریگشن و چسبندگی به هم وابسته اند (۸). در این مطالعه نیز تمامی نمونه‌ها که توانایی اتو آگریگشن را داشتند، توانایی کواگریگشن را نیز نشان دادند. میزان چسبندگی بیشتر وابسته به نوع سویه می‌باشد. همیشه نمونه‌های با بیشترین اتو آگریگشن تمایل به کواگریگشن را نشان نمی‌دهند. اما نمونه‌های با کواگریگشن بالا، اتو آگریگشن بالا هم نشان داده‌اند. در مطالعه بر روی بیفیدوباکترهای جدا شده از شیرهای معده و روده‌ی انسانی مشخص شد، باکتری‌هایی با درصد بالای اتو آگریگشن و هیدروفوبیسیته، توانایی اتصال به سلول‌های caco-2 را دارند (۹). در مطالعاتی که Pérez و همکارانش انجام دادند، بیفیدوباکتریوم‌ها به دو دسته تقسیم شدند. باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سلول را داشتند، که این باکتری‌ها اتو آگریگشن و هم آگریگشن را نشان دادند و باکتری‌هایی با عدم توانایی اتصال به سلول فاقد توانایی اتو آگریگشن و هم آگریگشن بودند. همچنین نشان دادند، وجود هیدروفوبیسیته برای اتصال باکتری به سلول‌های شبیه اتروسیت، اتو آگریگشن ضروری است. باکتری‌های چسبنده بسیار هیدروفوبیسیته خوبی داشتند و همچنین چسبندگی اندکی به پتانسیل سطحی داشتند. کاهش pH از ۷ به ۲ باعث افزایش بار منفی سطح سلول و در نهایت افزایش اتو آگریگشن می‌شود (۶، ۱۴). همچنین دریافتند که با غیرفعال سازی حرارتی (heat-inactivated) هیدروفوبیسیته افزایش می‌یابد. تمام سویه‌های پروبیوتیکی کواگریگشن خوبی با پاتوژن‌ها

- 9-Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. **31**:438-42.
- 10-Duary, RK., Rajput, YS., Batish, VK., Grover, S. (2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of Medical Research*. **134**: 664-671.
- 11- Gabriela, K., Ivana, H., iveta, H. (2019). In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation*. **54**:1-11.
- 12-Meurman, J., Stamatova, I. (2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases*. **13**: 443-451
- 13-Ouwehand, AC., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82**:279-89.
- 14-Pérez, PF., Minnaard, Y., Disalvo, EA., De Antoni, GL. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**:21-26.
- 15-Rohani, M., Papizadeh, M., Pourshafie, M.R. (2018). Correlation of Biofilm Formation and Caco-2 Cell Attachment Properties in Colonization Ability of Acid-Bile Resistant Fecal Lactobacillus Plantarum Isolates. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. **6**: 13-19.
- 16-Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D., Klaenhammer, T.R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*. **49**: 207-216.
- 17-Shetty, Mamatha S.; Shetty, Yashaswini S. (2015). Probiotics and oral health: myth or reality? *Nitte University Journal of Health Science*. **5**: 40-42.
- 18-Twetman S, Stecksén-Blicks C. (2008). Probiotics and oral health effects in children. *International journal of Paediatric Dentistry*. **18**:3-10.
- 19-Vanderpool C, Yan F, Polk DB. (2008). Mechanisms of probiotic action:

منابع

۱. تکلو، ز. گودرزوند، م. خدایی، ز. (۱۳۹۵). بررسی قابلیت چسبندگی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازنی به لایه سلولی Hep2 cell. فصلنامه علمی پژوهشی دنیای میکروب ها. مقاله ۳۰، دوره ۹، شماره ۱ (پیاپی ۲۶)، ۷۱-۷۵.
۲. حیدری نصرآبادی، م. تاج آبادی ابراهیمی، م. بهرامی، ه. (۱۳۸۸). بررسی توانایی کلونیزاسیون لاکتوباسیلهای جدا شده از پنیر محلی و اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش انسان، لاین سلولی Caco-2. زیست شناسی جانوری، دوره ۱، شماره ۴، ۳۱-۲۷.
- 3-Bahrami, B., Child MW, Macfarlane S, Macfarlane GT. (2011). Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**:2934-42.
- 4- Campana, R., van Hemert, S and Baffone, W. (2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*, **9**:12.
- 5- Celebioglu, H.U and Svensson, B. (2018). Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms*. **6**: 90.
- 6-Chauvière G, Coconnier M-H, Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL. (1992). Competitive exclusion of diarrheagenic *Escherichia coli* (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed *Lactobacillus*. *FEMS Microbiology Letters*. **91**:213-217.
- 7-Collado, MC., Gueimonde, M., Sanz, Y., Salminen, S. (2005). Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*. **68**:2672-2678.
- 8-Collado, MC., Meriluoto, J., Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*. **226**:1065-73.

implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. **14**:1585-1596.

- 20- Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species.. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **172**:72-84.
- 21-Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J.(2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica* . **53**: 263-269.
- 22-Wadstroum T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*. **62**:513-520.