



بررسی توانایی کلونیزاسیون لاکتوباسیل‌های جدا شده از پنیر محلی و اتصال به سلول‌های

پوششی لوله گوارش انسان، لاین سلولی Caco2

میترا حیدری نصر آبادی^{۱*}، مریم تاج آبادی ابراهیمی^۲، هدی بهرامی^۳

چکیده

هدف این مطالعه ارزیابی توانایی کلونیزاسیون ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی در دستگاه گوارش است. از این رودر این بررسی مقاومت در برابر pH اسیدی، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول‌های کشت Caco-2 در شرایط *in vitro* سنجیده شده است. نتایج نشان داد تیمار ۲ ساعته اسیدی منجر به کاهش ۰-۴ لگاریتمی جمعیت این سویه‌ها گردید و ایزوله B1D2 کاملاً به تیمار اسیدی مقاوم و هیچ کاهش جمعیتی نشان نداد. زمان تاخیر رشد سویه‌ها در حضور املاح صفراوی بین ۲۵ تا ۱۸۰ دقیقه متغیر بود و سویه‌ی BHI با زمان تاخیر رشد $25 \pm 4/80$ مقاومترین سویه لاکتوباسیل نسبت به املاح صفراوی بود. اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول‌های کشت Caco-2 بسیار متغیر بود. سویه GI2 کمترین اتصال و SL2 بالاترین اتصال را نشان دادند. ارزیابی مجموع این سه عامل در شرایط *in vitro* نشان داد احتمالاً سویه‌های SM3, BD2, SM1, SL2 جدا شده از پنیر سنتی سمنان و بابل توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند.

کلمات کلیدی: کلونیزاسیون، لاکتوباسیلوس، اتصال، لاین سلولی Caco-2

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها به تعداد معین ایجاد تأثیرات مفیدی در مصرف‌کننده می‌کند. از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی اشاره کرد. بیشتر مطالعات در این زمینه روی لاکتوباسیل‌ها^۱ و بیفیدوباکتریوم‌ها^۲ صورت گرفته است [۱۷، ۱۵].

سالم‌است که اهمیت مصرف محصولات لبنی در سلامت انسان به اثبات رسیده است. اما امروزه مطالعات زیادی جهت افزودن باکتری‌های پروبیوتیک به محصولات لبنی و بررسی تأثیر این باکتری‌ها روی سلامت مصرف‌کننده صورت می‌گیرد. یکی از مشکلات بکارگیری باکتری‌های پروبیوتیک در محصولات لبنی عدم تحمل شرایط اکولوژیکی محصول و از بین رفتن باکتری پروبیوتیک در این محصولات می‌باشد. همچنین ایجاد طعم و عطر نامطلوب توسط باکتری پروبیوتیک در این محصولات مشکل دیگری است که تولید کنندگان محصولات لبنی با آن روبرو هستند [۱۷، ۱].

از این رو جدا سازی باکتری پروبیوتیک از محصول لبنی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی جهت تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که بطور طبیعی حاوی باکتری پروبیوتیک هستند به ما عرضه دارد. از سوی دیگر انتخاب محصول لبنی صنعتی مشابه منشاء جدا سازی پروبیوتیک می

*- نویسنده مسئول مکاتبات (heydari_nasr@yahoo.com)

۱- استادیار دانشکده زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند

۲- استادیار دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

۳- کارشناس دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

بررسی میزان تحمل به نمک های صفراوی در سویه‌های ایزوله شده :

از کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه ها به میزان ۱٪ به محیط MRS broth حاوی ۰/۳٪ نمک‌های صفراوی (Oxgall) تلقیح شد. همچنین تلقیح مشابهی به محیط MRS broth فاقد نمک های صفراوی بعنوان شاهد صورت گرفت. بعد از تلقیح تا ۸ ساعت هر ۳۰ دقیقه و بعد از ۲۴ ساعت، میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین شد. تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت ۰/۳ واحدی در دو محیط مذکور بعنوان زمان تاخیر رشد تعیین شد [۵،۶].

کشت سلول‌های روده:

محیط Caco-2 از موسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت Dulbecco's modified eagle's, minimal essential medium شامل ۲۵ mM گلوکز ۲۰ V/V٪ سرم گوساله غیر فعال با حرارت و ۱٪ اسیدهای آمینه غیر ضروری است در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO₂ اتمسفر کشت داده شدند. جهت بررسی اتصال ۱×۱۰^۶ سلول Caco-2 در یک میلی لیتر محیط کشت سلول به هر چاهک اسلاید چمبر تلقیح شد. بعد از ۲۴ ساعت و تک لایه سلول‌ها با بافر فسفات (pH ۷/۲) شسته شدند [۱۰].

اتصال باکتری‌های پروبیوتیک:

به هر چاهک ۳۰۰ μl بافر فسفات و لاکتوباسیل به غلظت ۱۰^۹-۱۰^۹CFU/ml اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه گرمخانه گذاری همراه با تکان آرام سلول‌ها سه بار با بافر فسفات (۷/۲ pH) شستشو و باکتری‌های متصل نشده حذف شدند.

شمارش سلول‌های متصل به کشت سلول Caco-2 بعد از ۱۵ دقیقه فیکس کردن در استون، لام‌ها (اسلاید چمبرها) با روش گرم رنگ آمیزی شدند. باکتری‌های پروبیوتیک با رنگ بنفش متصل به سلول‌های کشت در ۱۰ زمینه میکروسکوپی بصورت تصادفی روئیت و شمارش شدند [۹].

تواند گامی مناسب برای کاهش مشکلات افزودن باکتری پروبیوتیک به محصول لبنی باشد.

مطالعه بقاء باکتری‌ها در سیستم گوارشی یکی از مهمترین فاکتورها در انتخاب سویه پروبیوتیک است. باکتری پروبیوتیک برای دستیابی و کلونیزاسیون در روده ملزم به عبور از pH اسیدی معده و املاح صفراوی روده می‌باشد. از این رو مقاومت در برابر اسید و املاح صفراوی خصوصیات اساسی جهت انتخاب باکتری پروبیوتیک هستند. از سوی دیگر شرط لازم کلونیزاسیون باکتری پروبیوتیک در روده توانایی اتصال این باکتری‌ها به سلول‌های پوشش لوله گوارش است [۱۳،۶].

هدف این بررسی ارزیابی توانایی کلونیزاسیون لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی در شرایط *in vitro* است. از این رو میزان تحمل به اسید، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول‌های کشت Caco-2 سویه لاکتوباسیل بومی ایران مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

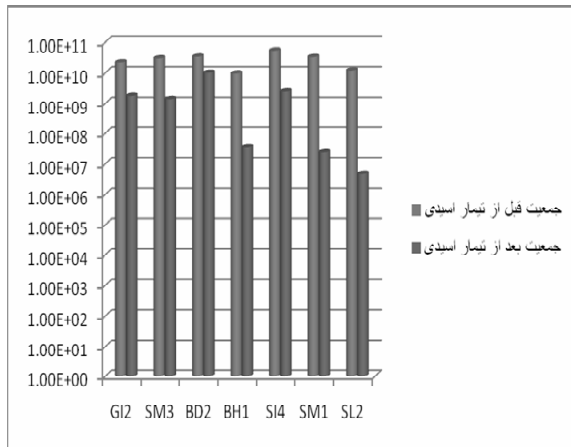
مواد و روش کار

در این تحقیق از ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر سنتی سمنان، بابل و قم استفاده شد. این سویه‌ها بر اساس منطقه تهیه نمونه و مورفولوژی کلنی کد گذاری شدند (جدول ۱). قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط MRS broth در شرایط بی‌هوایی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

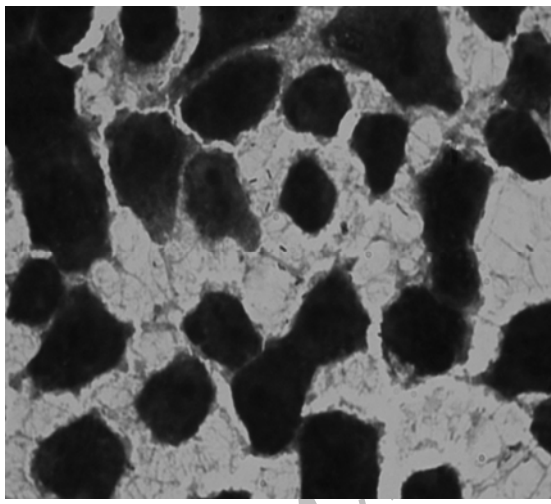
بررسی میزان تحمل به اسید در سویه‌های ایزوله شده:

از کشت ۲۴ ساعته هر یک از سویه‌ها بعد از تهیه سریال رقت و تعیین جمعیت ۱ میلی لیتر به ۲۰ میلی لیتر بافر نمک فسفات اسیدی (pH=۲/۵) تلقیح شد. بعد از ۲ ساعت گرمخانه گذاری، از هر نمونه سریال رقت تهیه گردید و برای بار دوم تعیین جمعیت صورت گرفت. نتایج جهت تعیین تاثیر محیط اسیدی در کاهش جمعیت سویه‌های جداسازی شده مقایسه شدند [۴].

نتایج



نمودار ۱- میزان مقاومت به اسید در ۷ ایزوله لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی



شکل ۱- لاکتوباسیل های متصل به سلول های Caco-2

ارزیابی مجموع سه عامل مقاومت به شرایط اسیدی، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های کشت Caco-2 در شرایط *in vitro* نشان داد احتمالا سویه های SM3, BD2, SM1, SL2 جدا شده از پنیر سنتی سمنان و بابل توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند. این سویه ها گزینه های مناسبی جهت بررسی های تکمیلی *in vivo* هستند. بدیهی است در صورت تایید این نتایج در شرایط *in vivo* و ارزیابی های ایمنی این سویه ها به عنوان پروبیوتیک های بومی ایران معرفی خواهند شد.

جدول ۱- مقایسه زمان تاخیر رشد و توانایی اتصال لاکتوباسیل های جدا شده از پنیر محلی

کد سویه	محل جداسازی	زمان تاخیر رشد ^۱ (D) دقیقه ^۲	تعداد لاکتوباسیل متصل به ۱۰۰ سلول کشت Caco-2
GI2	قم	90 ± 5/72	54 ± 12
SM3	سمنان	25 ± 4/80	453 ± 34
BD2	بابل	60 ± 6/80	504 ± 32
BH1	بابل	180 ± 6/90	713 ± 54
SI4	سمنان	90 ± 4/08	504 ± 64
SM1	سمنان	40 ± 4/09	460 ± 45
SL2	سمنان	60 ± 1/69	1540 ± 76

۱- زمان تاخیر رشد در حضور ۰/۳٪ املاح صفراوی

۲- نتایج بر اساس SEM ± SD گزارش و تمام آزمون ها سه بار تکرار شده است.

بحث

بررسی مقاومت به اسید بر روی ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی نشان داد تیمار ۲ ساعته اسیدی منجر به کاهش ۴-۰ لگاریتمی جمعیت این ایزوله ها گردید (نمودار ۱). سویه های GI2, SM3, BD2, SI4 تنها یک لگاریتم کاهش جمعیت نشان دادند. سویه BD2 کاملا به تیمار اسیدی مقاوم و هیچ کاهش جمعیتی نشان نداد.



مطالعات نشان داده است بررسی توانایی اتصال به سلول های کشت در شرایط *in vitro* پیش بینی مناسبی برای امکان اتصال در روده انسان در شرایط *in vivo* است (۲). اگرچه جهت حصول اطمینان مطالعات تکمیلی در شرایط *in vitro* و *in vivo* لازم است.

Matija و همکاران (۲۰۰۳) اتصال دو سویه لاکتوباسیلوس گازی به سلول های Caco-2 در دو pH ۷,۵ و ۴/۵ را بررسی و نشان دادند سویه LF221 از توانایی اتصال بیشتری نسبت به سویه تجاری لاکتوباسیلوس رامنوسوس برخوردار است [۱۲]. Chauviere و همکاران (۱۹۹۲) توانایی اتصال ۲۵ سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بررسی و نشان دادند توانایی اتصال حتی در یک گونه از جنس لاکتوباسیلوس متغیر و وابسته به سویه است. این نتایج اهمیت بررسی مقاومت در برابر شرایط اسیدی و املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در شرایط *invitro* به منظور انتخاب سویه های پروبیوتیک را تأیید می کند [۳].

منابع

1. Ambadoyiannis G, Hatzikamari M, Litopoulou-Tzanetaki E, and Tzanetakis N. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. *Food Biotechnology* 18: 307-325, 2005.
2. Bezkorovainy A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 399S, 2001.
3. Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, and Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Microbiology* 138: 1689, 1992.
4. Erkkilä S and Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science* 55: 297-300, 2000.

زمان تاخیر رشد سویه ها در حضور املاح صفراوی بین ۲۵ تا ۱۸۰ دقیقه متغیر بود سویه های SM3 و BH1 با زمان تاخیر رشد $25 \pm 4/80$ و $180 \pm 6/90$ به ترتیب مقاومترین و حساس ترین سویه لاکتوباسیل نسبت به املاح صفراوی بودند. نتایج این آزمون در (جدول ۱) قید شده است. این بررسی نشان داد، توانایی مقاومت و تحمل املاح صفراوی، وابسته به گونه نیست و در بین سویه های یگ گونه متفاوت است. دامنه وسیع میزان مقاومت به املاح صفراوی و گوناگونی در میزان مقاومت سویه های مختلف که در این مطالعه مشاهده می شود در بسیاری از گزارشات ارائه شده توسط دیگر محققین، Succì (۲۰۰۵)، Liong (۲۰۰۵)، pennacchia (۲۰۰۴) و Jacobsen (۱۹۹۹) نیز قید گردیده است [۸، ۱۱، ۱۷، ۱۸].

این نتایج با نتایجی که Ortu در سال ۲۰۰۷ از بررسی لاکتوباسیل های جدا شده از شیر تخمیری ساردینا بدست آورد منطبق است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات این پژوهشگر، سویه های جدا شده از فرآورده های لبنی سنتی نسبت به پروبیوتیک تجاری از مقاومت بالاتری برخوردار هستند [۱۴].

اتصال سویه های لاکتوباسیل به سلول های کشت Caco-2 بسیار متغیر بود. سویه GI2 کمترین اتصال و SL2 بالاترین اتصال را نشان دادند (شکل ۱). نتایج متوسط شمارش لاکتوباسیل های متصل به سلول های Caco-2 در ۱۰ زمینه میکروسکوپی در جدول ۱ قید شده است.

از آنجا که بررسی کلونیزاسیون باکتری های پروبیوتیک در روده انسان و حیوان با محدودیت هایی مواجه است. از این رو جهت بررسی توانایی کلونیزاسیون باکتری های پروبیوتیک در روده از سلول های کشت بافت و موکوس جدا شده از روده بعنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می شود. در این بررسی ها معمولا از لاین کشت سلولی Caco-2 و HT-29 و لاین سلولی تولید کننده موکوس HT-20MTX استفاده می شود [۱۶].



13. Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1: 59-67, 2000.
14. Ortu S, Felis GE, Marzotto M, Deriu A, Molicotti P, Sechi LA, Dellaglio F, and Zanetti S. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal* 17: 1312-1320, 2007.
15. Ouwehand AC, Salminen S, and Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289, 2002.
16. Ouwehand AC, Tuomola EM, Lee YK, and Salminen S. Microbial interactions to intestinal mucosal models. *Methods in enzymology* 337: 200, 2001.
17. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, and Villani F. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat science* 67: 309-317, 2004.
18. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, and Coppola R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters* 244: 129-137, 2005.
5. Gilliland SE, Staley TE, and Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science* 67: 3045, 1984.
6. Gilliland SE and Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *Journal of dairy science* 73: 905-911, 1990.
7. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 374-379., 2001.
8. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandstrom B, Tvede M, and Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4949-4956, 1999.
9. Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, and Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3692-3697, 2000.
10. Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, and Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of medical microbiology* 52: 925-930, 2003.
11. Liong MT and Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of dairy science* 88: 55-66, 2005.
12. Matija BB, Narat M, and Zori M. Adhesion of Two *Lactobacillus gasseri* Probiotic Strains on Caco-2 Cells. *Food Technology Biotechnology* 41: 83-88, 2003.