Archive of SID

Origin alArticl

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 13, Number 1 (March - April)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Molecular Analysis of Seven *Lactobacillus* Strains Isolated From Human Origin in West of Mazandaran to Identify Isolates With Probiotic Potential

Simin Arian[1], Hami Kaboosi[1*], Zoheir Heshmatipour[2], Zeinab Khazaei-Koohpar[3], Fatemeh Peyravii Ghadikolaii[4]

1. Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2. Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
3. Department of Cellular and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran
4. Department of Biology, Ghaemshahr Branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran

Article Information

Article Subject:
Food Microbiology

DOI:

Corresponding author:

Hami Kaboosi
Department of Microbiology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
Email:
khomeiri@gau.ac.ir

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: Colorectal cancer is considered to be an important cause of morbidity and mortality worldwide. Anti-cancer properties of probiotic lactic acid bacteria are considerable for treatment of cancers such as colorectal cancer. The aim of this study was to investigate the molecular characterization of probiotic bacterial isolates from collected stool specimens in west of Mazandaran province, in order to confirm the probiotic effect of isolated strains, so to compare their effect on cancer cell lineages, in future studies.

Materials and Methods: In this study, out of 60 stool samples collected from healthy children and adult people, 50 bacterial strains were isolated. Antibiotic susceptibility was performed by 15 antibiotics for 7 strains. Then, pH and bile salts tolerance were measured in the strains. Molecular analysis of these strains was carried out by PCR-sequencing and their results were used to draw a phylogenetic tree.

Results: Of the 50 isolates, 7 isolates were lactic acid bacteria and two strains were completely probiotic. These strains were resistance to low pH and 0.3% bile salt. Molecular analysis showed that two strains SE and SG were probiotics related to *Lactobacillus fermentum* (86% homology) and *Lactobacillus rhamnosus* (61% homology) family, respectively, which were known as new strains.

Conclusion: The results suggested that there are 7 strains with good tolerance in the gastrointestinal tract that have probiotic properties and this is the basis of future studies to evaluate their anti-tumor properties and ultimately oral administration.

Keywords: New probiotics, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, Molecular analysis, West of Mazandaran Province

Received: 2019/02/22 Accepted: 2019/05/11 Available online: 2019/06/20

Copyright © 2019 Iranian Journal of Medical Microbiology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

How to cite this article:

Arian S, Kaboosi H, Heshmatipour Z, Khazaei -Koohpar Z, Peyravii-Ghadikolaii F. Molecular analysis of seven Lactobacillus strains isolated from human origin in West of Mazandaran.. Iran J Med Microbiol. 2019; 13 (1) :56-68

www.SID.ir

Archive of SID

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۳ - شماره ۱ - فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۸

Journal homepage: www.ijmm.ir

آنالیز مولکولی هفت سویه *لاکتوباسیلوس* جداشده با منشأ انسانی در غرب مازندران به منظور شناسایی جدایه‌هایی با توانایی پروبیوتیکی

سیمین آرین[۱]، حامی کابوسی[۱*]، زهیر حشمتی‌پور[۲]، زینب خزائی کوهپر[۳]، فاطمه پیروی قادیکلایی[۴]

۱. گروه میکروبیولوژی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
۲. گروه میکروبیولوژی ، دانشکدهٔ علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
۳. گروه زیست‌شناسی سلولی و مولکولی، دانشکدهٔ علوم زیستی، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران
۴. گروه زیست‌شناسی، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله
دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۰۳
پذیرش:۱۳۹۸/۰۲/۲۱
انتشار آنلاین: ۱۳۹۸/۳/۳۰
موضوع:
میکروبیولوژی مواد غذایی
IJMM1398;13(1): 56-68

نویسندهٔ مسئول:
حامی کابوسی
گروه میکروبیولوژی، واحد آیت‌الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران
پست الکترونیک:
hkaboosi@gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: سرطان کلورکتال به عنوان یکی از مهم‌ترین علل مرگ ناشی از سرطان در جهان است. خواص ضدسرطانی باکتری‌های پروبیوتیک در درمان سرطان کلورکتال گزارش شده است. هدف از این مطالعه بررسی مولکولی و ارزیابی قابلیت پروبیوتیکی چند جدایه باکتریایی گردآوری‌شده از نمونه‌های مدفوع واقع در غرب استان مازندران بود تا در صورت تأیید توانایی پروبیوتیکی، در مطالعات آینده اثر آنها بر رده سلول‌های سرطانی مطالعه شود.

مواد و روش کار: در این مطالعه از ۶۰ نمونه مدفوع جمع‌آوری‌شده از افراد بالغ و خردسال سالم، ۵۰ ایزوله باکتریایی جداسازی شد. پس از اجرای تست‌های بیوشیمیایی، حساسیت آنتی‌بیوتیکی برای تعیین سویه‌های اسید لاکتیکی با ۱۵ آنتی‌بیوتیک انجام شد. سپس تحمل pH و نمک‌های صفراوی اندازه‌گیری شد. آنالیز مولکولی این سویه‌ها به روش PCR-سکوئنسینگ انجام شد و از نتایج آن برای رسم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد.

یافته‌ها: از ۵۰ جدایه، ۷ جدایه باکتری اسید لاکتیک و دو سویه کاملاً خاصیت پروبیوتیک داشتند. این سویه‌ها به pH پایین و نمک صفراوی ۰/۳ درصد مقاوم بودند. آنالیز مولکولی نشان داد دو سویه SE و SG به ترتیب پروبیوتیک‌های مربوط به خانواده‌های *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* (با هموژوی ۸۶ درصد) و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (با هموژوی ۶۱ درصد) بودند که به عنوان سویه‌های جدید شناخته شدند.

نتیجه‌گیری: نتایج پیشنهاد می‌کند ۷ سویه با تحمل مناسب در مجرای گوارشی وجود دارد که از خانواده لاکتوباسیل‌ها هستند و این امر زمینه‌ساز بررسی مطالعات امیدوارانه در آینده به منظور بررسی ویژگی‌های ضدتوموری آنها و درنهایت تجویز خوراکی آنها است.

کلمات کلیدی: پروبیوتیک‌های جدید، *لاکتوباسیلوس فرمانتوم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، آنالیز مولکولی، غرب مازندران

کپی‌رایت © مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران: دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده غیرتجاری با ذکر منبع آزاد است.

مقدمه

استفاده از پروبیوتیک راهکار امیدبخشی برای درمان و جلوگیری از سرطان کلورکتال محسوب می‌شود. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در مقادیر مشخص می توانند در سلامتی میزبان مؤثر باشند (۱، ۲). در دستگاه گوارش انسان یک مجموعه پیچیده با بیش از ۱۰۰ تریلیون سلول میکروبی وجود دارد که در فیزیولوژی، تغذیه و متابولیسم انسان تأثیر می‌گذارند. باکتری‌های گوارشی در سنتز ویتامین B و K و متابولیزه‌کردن اسیدهای چرب، استرول‌ها و زنوبیوتیک‌ها نقش دارند (۳). با این حال باکتری‌های همسفره، توانایی فعال‌کردن پاسخ ایمنی را نیز دارند. فرستادن سیگنال توسط میکروفلور معده و روده همراه با سد اپی‌تلیالی اولین خط دفاعی دستگاه گوارش علیه پاتوژن‌ها محسوب می شود (۴). مهم‌ترین سویه‌های پروبیوتیک از باکتری های اسید لاکتیکی (LAB) از جنس *بیفیدوباکتر* و *لاکتوباسیلوس* هستند (۱).

باکتری‌های اسید لاکتیکی (LAB) در ماست، پنیر، شیر، نوشیدنی‌ها، اسموتی‌ها، غلات و ... وجود دارند. بهترین pH برای

www.SID.ir

Archive of SID

رشد لاکتوباسیلوس ۵- ۶/۵ است، همچنین تراکم ۵ درصد دی اکسید کربن تأثیر بسزایی بر رشد آن‌ها دارد. لاکتوباسیلوس‌ها در شرایط بی‌هوازی با حداقل اکسیژن رشد دارند؛ برای مثال در بدن در بزاق دهان، واژن و در محیط تیوگلیکولات از کوکسی به باسیل تغییر می‌کنند. این باکتری‌ها تخمیرکننده هستند و بیشتر محصولات آنها اسید لاکتیک است و خاصیت پروبیوتیکی دارند. مصرف این باکتری‌ها در ترکیبات دارویی توازن طبیعی باکتری و قارچ را در دستگاه گوارش تنظیم می‌کند. لاکتوباسیل‌ها که به صورت فلور طبیعی در انسان دیده می‌شود عبارتند از: *لاکتوباسیلوس بیفیدوس* در پلاک دندانی و بزاق افراد بزرگسال و در مدفوع نوزادانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند. مطالعات بر روی مدل‌های حیوانی و جمعیت انسانی نشان داده است مصرف پروبیوتیک‌ها در شرایطی چون تحمل‌نکردن لاکتوز، اسهال القاشده با آنتی‌بیوتیک، التهاب معده و روده، یبوست و عفونت‌های مجاری گوارشی سودمند است (۵).

مطالعات مختلف نشان داده است نرخ وقوع (Colorectal Cancer) CRC در افراد سالمی که به طور مرتب از محصولات لبنی تخمیری (حاوی پروبیوتیک) به‌خصوص ماست استفاده می کنند، کاهش یافته است (۱). به نظر می‌رسد اثرات ضد سرطانی پروبیوتیک‌ها به واسطه تنظیم پاسخ ایمنی، القای اپوپتوز و خواص آنتی‌اکسیدانی آنها باشد. همچنین اثبات شده است روده به طور طبیعی از طریق آنزیم‌های گلیکوزیداز، β-گلوکورونیداز، آزوردوکتاز و نیتروردوکتاز پیش‌سرطان‌زاها را به سرطان‌زاهای فعال تبدیل می‌کند. پروبیوتیک‌ها به‌خصوص *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* سبب کاهش فعالیت این آنزیم‌ها می‌شوند (۶). یک ترکیب نامتوازن میکروبی در دستگاه گوارش می‌تواند شرایط را برای کارسینوژنز کولونی مهیا سازد. در حالی که مصرف روزانه سویه‌های خاص پروبیوتیک می‌تواند باعث بازگرداندن توازن میکروبیوتا، سلامتی فرد و مهار کلونی زایی میکروارگانیسم‌های پاتوژن در روده شود (۷).

در یک مطالعه نشان داده شد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG اثر مهاری بر روی کارسینوژنز کولونی القاشده با دی متیل هیدارزین (DMH) دارد (۸). در یک آزمون بالینی بر روی افراد مبتلا به CRC مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها باعث افزایش تعداد *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتر* و *انتروکوکوس* و کاهش تعداد *E.coli* و *استافیلوکوکوس آئروئوس* شد. از سوی دیگر خصوصیات فیزیکوشیمیایی هضم در کولون از جمله pH، ویسکوزیته و میزان اسیدهای صفراوی در موارد مبتلا به CRC دچار تغییر می شود. این شرایط محیطی می‌تواند به واسطه پروبیوتیک‌ها تغییر یابد و باعث مقاومت به کارسینوژنز شود (۷). با توجه به مطالعات *in vitro* و *in vivo*، به نظر می‌رسد پروبیوتیک‌ها توان مهار رشد، پیشرفت و درمان سرطان کلورکتال را داشته باشند (۹). با توجه به شواهد آزمایشگاهی و بالینی قوی از تأثیرات مثبت پروبیوتیک‌ها بر سرطان‌زایی کولون، نیاز است تا گونه‌هایی که خاصیت ضدتوموری بیشتری دارند و گونه‌های مختلف از پروبیوتیک‌ها که تأثیرات متفاوتی به عنوان مکمل دارویی در پیشگیری یا درمان سرطان کلورکتال نشان داده‌اند شناسایی شوند. در این مطالعه تلاش شد دو جدایه *لاکتوباسیلوس* از نظر خصوصیات میکروبی و مولکولی (فیلوژنتیکی) بررسی شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی باکتری

در این مطالعه مقطعی و آزمایشگاهی از سال ۱۳۹۵ تا ۱۳۹۶، مطابق با اصول پرسشنامه طراحی شده، از مدفوع ۶۰ فرد سالم از نظر گوارشی در بیمارستان‌ها و مراکز درمانی شهر تنکابن نمونه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان آزمایش نگهداری شدند. افراد در محدودهٔ سنی ۲ ماه تا ۴۰ سال و سالم از نظر گوارشی در این مطالعه وارد و بین آنها افرادی که بیماری گوارشی داشتند از مطالعه خارج شدند. همچنین در این تحقیق تأییدیه کمیته اخلاق از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به شناسه IR.IAU.TON.REC.1397.032 گرفته شد. جدایه‌ها در محیط کشت MRS (محیط کشت اختصاصی لاکتوباسیل‌ها برگرفته از نام‌های Man Rogosa و Sharpe که در سال ۱۹۶۰ آن را تهیه شده و ترکیبی از گلوکوز، عصاره گوشت و عصاره مخمر همراه با tween 80، منیزیم و منیزم سولفات به عنوان محرک رشد، آمونیوم سیترات و سدیم استات است) گسترده و در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ، ۴۸ و ۷۲ ساعت در شرایط بی هوازی انکوبه شدند. از این تعداد نمونه، ۵۰ ایزوله باکتریایی جدا سازی شد. برای تعیین سویه‌های لاکتوباسیلوس تست‌های مختلفی شامل رنگ‌آمیزی گرم، بررسی مورفولوژی، فعالیت کاتالاز، تخمیر کربوهیدرات، تست مقاومت به pH و تست تحمل نمک‌های صفراوی صورت گرفت.

آزمون مقاومت آنتی‌بیوتیکی

مقاومت آنتی‌بیوتیکی جدایه‌ها در محیط MRS براث به روش انتشار از دیسک (Baur-Kirby) و طبق استاندارد CLSI

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰۱۳ با استفاده از دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی سفالکسین، سفوکسیم، آموکسی سیلین، آمپی سیلین، پنیسیلین، ونکومایسین، کلیندامایسین، سولفومتاکسازول، ریفامپین، نئومایسین، اریترومایسین، تتراسایکلین، جنتامایسین، کانامایسین، کلرامفنیکل تهیه‌شده از شرکت High Media (هند)، تعیین شد. بعد از ۴۸ ساعت انکوباسیون در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷°C، قطر هالهٔ عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و نتایج آن ثبت شد.

تست حرکت

جدایه‌ها به کمک سوزن (نیدل) در محیط کشت SIM به صورت عمودی در مرکز محیط تا اواسط لوله وارد شد. سپس در یک جار بی‌هوازی به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C انکوبه شد. سپس منفی یا مثبت بودن حرکت بررسی شد.

تست مقاومت به pH

برای تعیین شرایط اسیدی معده، ۷ جدایه *لاکتوبا سیلوس* در محیط کشت MRS به مدت ۱۸ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. بعد از تهیه محیط MRS جدید با pHهای ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵ و ۵، جدایه‌ها به این محیط اضافه و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۳۷°C انکوبه شدند. سپس نتایج کشت نسبت به کدورت نیم مک فارلند بررسی شد. برای مقایسه میزان مقاومت جدایه‌ها در pHهای مختلف از آزمون کروسکال والیس استفاده شد.

تست تحمل نمک‌های صفراوی

محلول نمک صفراوی دزوکسی کولات با غلظت ۰/۳ درصد به ۱۰۰ میکرولیتر محیط MRS اضافه و ۱۰۰ میکرولیتر از جدایه‌ها به طور جداگانه به این محیط اضافه و در جار بی‌هوازی در دمای ۳۷°C انکوبه شد. میزان جذب نوری جدایه‌ها در زمان‌های صفر، ۳۰ دقیقه، ۲ ساعت، ۴ ساعت و ۲۴ ساعت بعد از تلقیح، با دستگاه اسپکتوفتومتر و طول موج ۶۰۰ نانومتر خوانده شد. از محیط کشت فاقد باکتری به عنوان نمونه بلانک استفاده شد.

آنالیز مولکولی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس*

به منظور تأیید مولکولی ایزوله‌های جدا سازی شده به عنوان سویه پروبیوتیک، ابتدا استخراج DNA با استفاده از کیت High Pure-Template PCR preparation (شرکت Roche، سوئیس) صورت گرفت. سپس تکثیر ژن *16s rRNA* به روش PCR و با استفاده از مستر میکس (Amplcon، دانمارک) با غلظت ۱۲/۵ ماکرولیتر، DNA با غلظت ۵ ماکرولیتر در حجم نهایی ۲۵ ماکرولیتر، در ترمال سایکلر ABI2720 طبق برنامه ذیل انجام شد: یک مرحله واسرشت‌شدن ابتدایی در ۹۵°C به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل در دمای ۹۵°C به مدت ۱ دقیقه، ۶۰°C به مدت ۱ دقیقه، ۷۲°C به مدت ۷۵ ثانیه و یک مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه.

در این مطالعه از پرایمرهای فراگیر (جهانی) با غلظت ۰/۵ ماکرولیتر و با توالی زیر استفاده شد: پرایمر مستقیم 5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' و پرایمر برگشتی 5'-TACGGTACCTTGTTACGACTT-3' (۱۰). بعد از اطمینان از تک‌باند بودن محصولات PCR، نمونه‌ها با حفظ زنجیره سرمایی به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن کشور کره جنوبی فرستاده شد. نتایج حاصل به کمک نرم‌افزار CLC Main Workbench v3.5 و نرم‌افزار آنلاین بلاست (BLAST) خوانش و با نرم‌افزار Mega7 از نظر قرابت ژنتیکی ارزیابی شد.

آنالیز اماری

دراین مطالعه از آزمون کلموگروف-اسمیرنوف، آزمون تحلیل واریانس و آزمون تعقیبی توکی استفاده شد. داده‌ها بصورت میانگین±انحراف معیار نشان داده شد.

یافته‌ها

تحلیل آزمون‌های میکروب‌شناسی

در این مطالعه هفت باسیل با ویژگی‌های کاتالاز منفی و گرم مثبت تعیین شدند که در تست حرکت، منفی بودند. نتایج آنتی‌بیوگرام ۷ جدایه لاکتوباسیل که به صورت کدگذاری‌شده، نام گذاری شدند، در جدول ۱ نشان داده شده است. بر اساس نتایج آنتی‌بیوگرام مشخص شد هر ۷ جدایه به جنتامایسین، نئومایسین، سولفومتاکسازول و کانامایسین مقاوم بودند. همچنین ۵ جدایه به ونکومایسین مقاومت نشان دادند. در حالی که همهٔ جدایه‌ها به آموکسی‌سیلین، آمپی‌سیلین، تتراسایکلین، پنی‌سیلین و کلرامفنیکل حساس بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی و قطر هاله در جدایه‌های مختلف لاکتوباسیلوس

جدایه آنتی‌بیوتیک	SG	SE	SL	SK	SO	SN_3	SN_5
سفالکسین	۲۶ S	۱۷ S	۰ R	۲۴ S	۰ R	۸ R	**۸** **R**
کلیندامایسین	۳۴ S	۳۶ S	۳۲ S	۳۶ S	۳۵ S	۱۰ R	**۱۰** **R**
آموکسی‌سیلین	۳۷ S	۳۶ S	۲۶ S	۳۲ S	۳۰ S	۲۱ S	**۲۱** **S**
ونکومایسین	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۲۰ S	**۲۱** **S**
سفکسیم	۱۸ I	۱۳ I	۰ R	۲۰ I	۰ R	۰ R	**۰** **R**
آمپی‌سیلین	۳۵ S	۳۷ S	۲۵ S	۳۶ S	۲۶ S	۲۱ S	**۲۱** **S**
سولفامتاکسازول	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	**۰** **R**
تتراسایکلین	۲۸ S	۲۵ S	۳۲ S	۳۰ S	۳۵ S	۲۸ S	**۲۵** **S**
پنی‌سیلین	۴۴ S	۴۷ S	۳۴ S	۴۲ S	۳۶ S	۱۸ S	**۱۹** **S**
کاناماسین	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	۰ R	**۰** **R**
اریترومایسین	۳۶ S	۳۵ S	۳۷ S	۳۲ S	۴۷ S	۲۸ S	**۱۵** **I**
جنتامایسین	۱۲ R	۱۱ R	۱۱ R	۱۲ R	۱۵ S	۸ R	**۸** **R**
کلرامفنیکل	۳۳ S	۳۲ S	۳۰ S	۳۵ S	۳۵ S	۲۴ S	**۲۵** **S**
نئومایسین	۱۳ R	۱۴ R	۱۵ R	۱۵ R	۱۱ R	۱۰ R	**۱۰** **R**
ریفامپین	۳۲ S	۳۱ S	۳۱ S	۳۴ S	۳۵ S	۱۳ R	**۱۳** **R**

R: Resistance; S: Susceptible; I: Intermediate

نتایج مقاومت به pHهای مختلف در ۷ جدایه به صورت ۳ درجه از رشد (۱: رشد ضعیف، ۲: رشد خوب و ۳: رشد عالی) در جدول ۲ نشان داده شده است. به طوری که جدایه‌های SG و SN_5 در $pH\geq ۳/۵$ ، جدایه SE در همهٔ pHها، جدایه SK در $pH\geq ۳$، جدایه SL ، SO و SN_3 در $pH\geq ۴$ رشد عالی داشتند که نشان‌دهندهٔ مقاومت آنها به pHهای مختلف بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲. نتایج آزمون کروسکال والیس مقایسهٔ میزان مقاومت جدایه‌ها بر حسب pH

pH / جدایه	۲/۵	۳	۳/۵	۴	۴/۵	۵	مقدار ارزش P
SG	۲ ± ۱	۲ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۰/۵۷۴
SE	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۱
SK	۲ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۰/۷۸۹
SL	۲ ± ۱	۲/۳۳ ± ۰/۵۷۷	۲ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۰/۵۵۱
SO	۱ ±۱	۲ ±۱	۲ ±۱	۳ ±۱	۳ ±۱	۳ ±۱	۰/۲۰۱
SN_3	۱ ± ۱	۲ ± ۱	۲ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۰/۲۰۱
SN_5	۱ ± ۱	۲ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۳ ± ۱	۰/۲۲۰

میزان جذب نوری در جدایه‌ها نشـــان داد جدایه‌ها توان تحمل نمک‌های صفراوی را دارند و تفاوت حاصل از رشد آنها به کمک آزمون تعقیبی توکی در ســـاعات مختلف تفاوت معنی‌داری (P-Value<0.05) را نشان داد (جدول ۳). به طوری که بیشترین میزان جذب نوری برای جدایه SG، دو ساعت بعد از تیمار با اسید صـفراوی گزارش شـد که میزان آن با دیگر ســاعات تیمار تفاوت معناداری را نشـــان داد. در جدایه های SE ، SK ، SL و SN_5 بیشترین میزان جذب مربوط به زمان ۲۴ ساعت بود که با میزان جذب در بقیهٔ زمان‌ها تفاوت معناداری داشـــت. در جدایه SO بیشترین میزان جذب نوری مربوط به زمان‌های ۲، ۴ و ۲۴ ساعت گزارش شـــد. در جدایه SN_3 ، بیشـــترین و کمترین میزان جذب نوری به ترتیب مربوط به ۴ ساعت و ۲ ساعت بود.

جدول ۳. نتایج آزمون تحلیل واریانس مقایسهٔ میزان جذب جدایه‌ها بر حسب زمان

زمان / جدایه	۰	min۳۰	h۲	h۴	h۲۴	P
SG	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۹۳ ±۰/۰۰۴	۰/۱۶۳ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۴۵ ±۰/۰۶۰	۰/۰۶۳ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵
SE	۰/۰۸۶ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۷۶ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۸۲ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۷۰ ± ۰/۰۰۳	۰/۲۴۹ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵
SK	۰/۱۲۱ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۱۲ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۵۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۵۴ ± ۰/۰۰۳	۰/۲۵۵ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵
SL	۰/۱۲۴ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۷۳ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۲۵ ± ۰/۰۰۴	۰/۲۴۱ ± ۰/۳۹۷	۱/۰۷۳ ± ۰/۰۳۵	<۰/۰۵
SO	۰/۲۳۳ ± ۰/۱۵۳	۰/۴۰۰ ± ۰/۳۰۰	۰/۸۴۷ ± ۰/۰۳۵	۰/۷۹۷ ± ۰/۰۰۴	۰/۹۹۱ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵
SN_3	۰/۰۸۵ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۶۱ ± ۰/۰۰۳	۰/۴۸۷ ± ۰/۰۰۵	۰/۴۴۴ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵
SN_5	۰/۲۰۴ ± ۰/۰۰۴	۰/۰۲۴ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۰۷ ± ۰/۰۰۴	۰/۱۵۳ ± ۰/۰۳۵	۰/۹۹۲ ± ۰/۰۰۳	<۰/۰۵

نتایج مربوط به تخمیر ۱۵ قند (جدول ۴) برای دو جدایه SG و SE نشـــان داد جدایه SG قادر به تخمیر ۹ قند از جمله لاکتوز بود؛ اما SE قادر به تخمیر ۱۰ قند بود که فروکتوز شـــامل آنها نمی‌شد.

جدول ۴. نتایج تست تخمیر قندهای لاکتوباسیل‌های جدایه با قابلیت‌های پروبیوتیکی

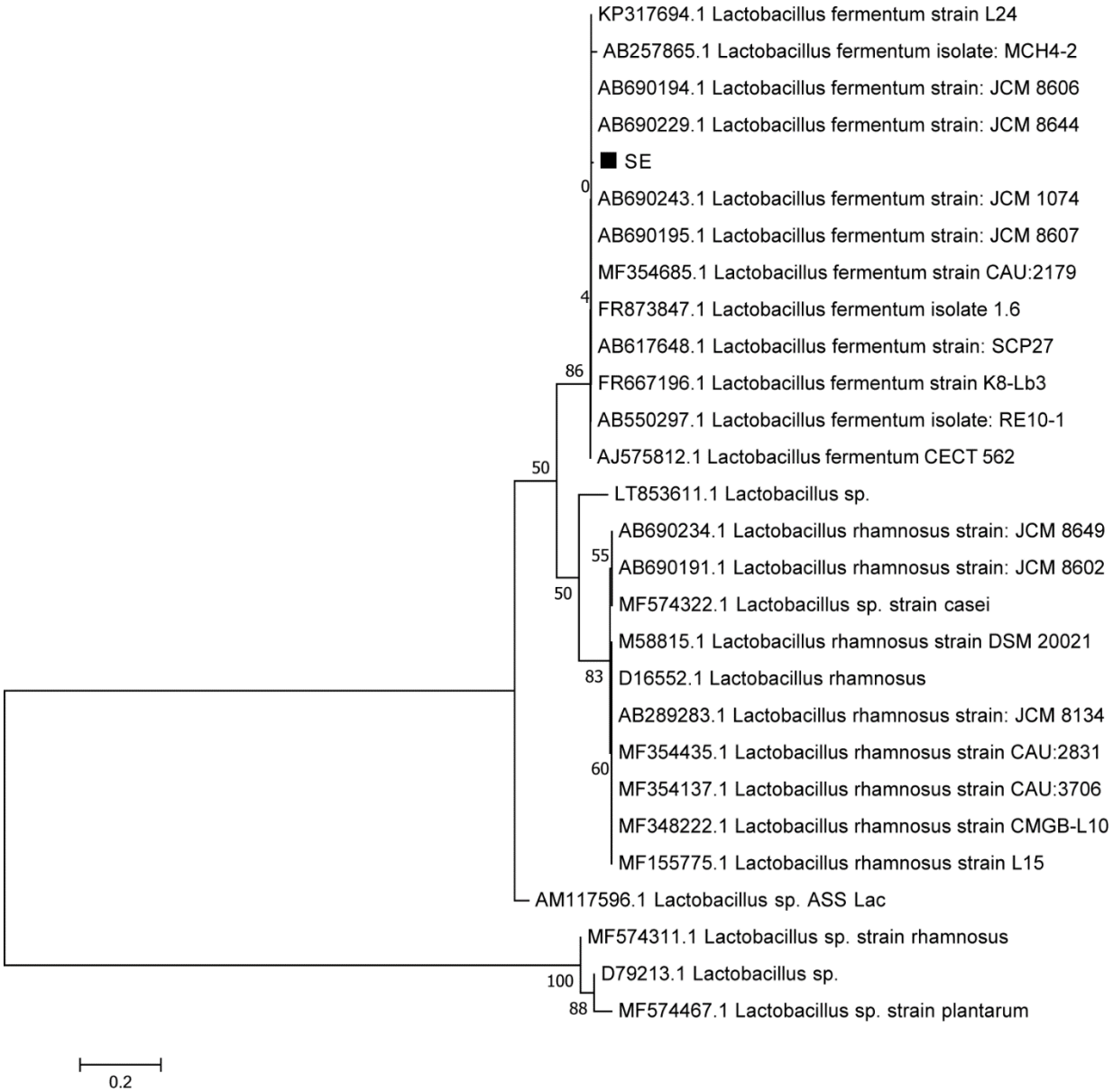
قندها / سویه‌ها	آرابینوز	اینوزیتول	تری‌هالوز	رافینوز	رامنوز	ریبوز	زایلوز	ساکارز	سلوبیوز	فروکتوز	گالاکتوز	گلوکز	لاکتوز	مانوز	مانیتول
SG	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
SE	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+

www.SID.ir

Archive of SID

آنالیز مولکولی

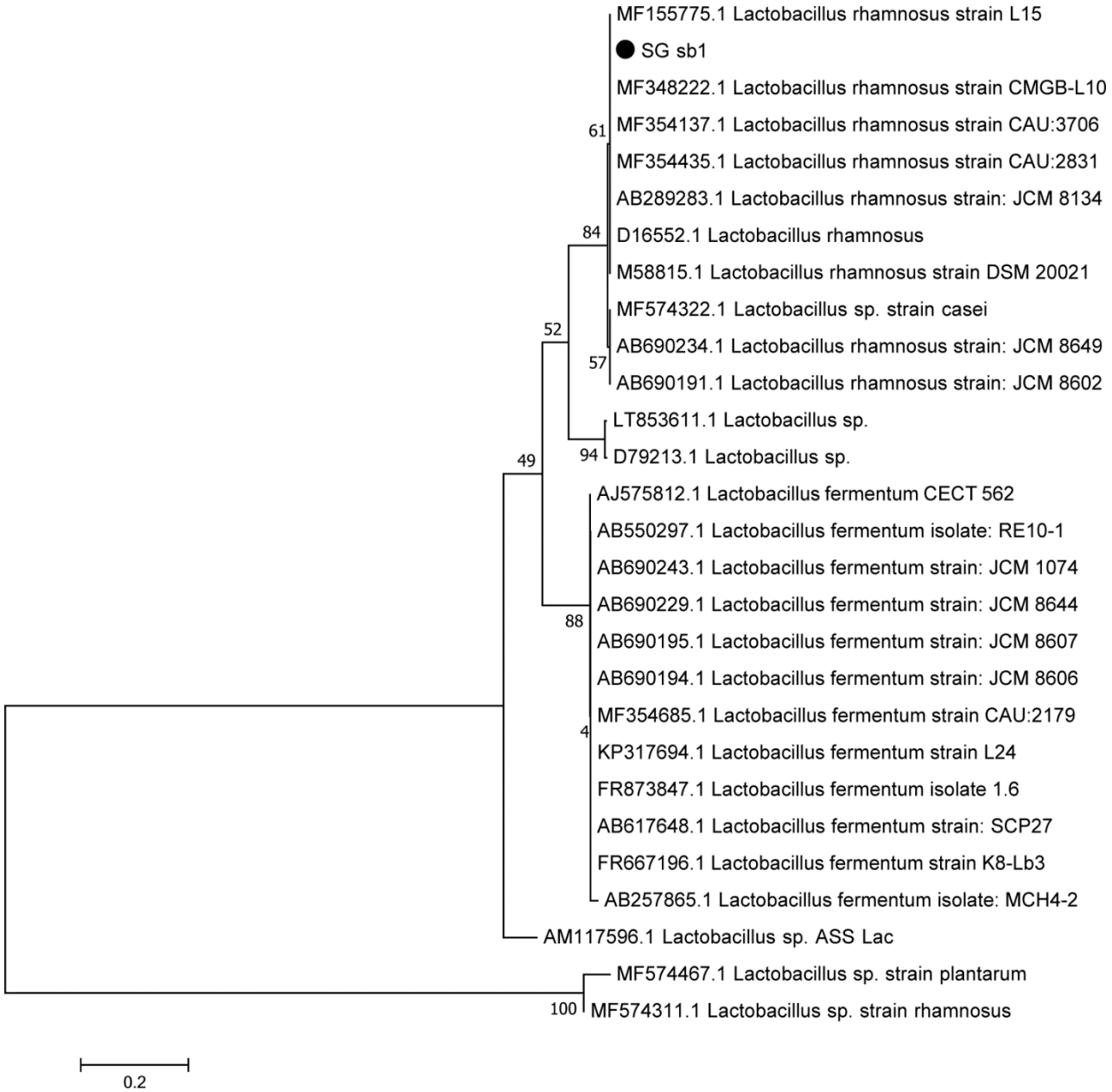
نتایج آنالیز توالی ژن *16s rRNA* نشان داد جدایه‌های SG و SL از نوع *لاکتوبا سیلوس رامنو سوس*، جدایه‌های SE وSK از نوع *لاکتوباسیلوس فرمانتوم*، جدایه‌های SO وSN_5 از نوع *انتروکوکوس فا سیوم* و جدایه SN_3 از نوع *انتروکوکوس دورانس* است. همچنین در بررسی فیلوژنی هفت جدایهٔ بررسی شده مشخص شد جدایه SE با سویه‌های *لاکتوبا سیلوس فرمانتوم* حدود ۸۶ در صد قرابت ژنتیکی دارد و بر اساس درصد قرابت داخل درخت فیلوژنی، به نظر می‌رسد جدایه SE یک سویه جدید از *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* در استان مازندران باشد (شکل ۱). همچنین جدایه SG با سویه‌های L10 وL15 *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۶۱ درصد قرابت ژنتیکی نشان داد (شکل ۲)، که بر اساس درصد قرابت داخل درخت فیلوژنی، جدایه SG نیز احتمالاً یک سویه جدید از *لاکتوبا سیلوس رامنو سوس* باشد. جدایه SL قرابت کم ۱۶ در صد به گونه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* داشت (شکل ۳). جدایه‌های SO و SN با سویه‌های *انتروکوکوس فاسیوم* حدود ۹۹ درصد قرابت ژنتیکی داشتند که بر اساس آنالیز فیلوژنیک به عنوان یک سویه جدید *انتروکوکوس فا سیوم* معرفی می‌شود (شکل ۴).



شکل ۱. تصویر درخت فیلوژنی *SE*. به این منظور توالی ژن *16s rRNA* در سویه مدنظر تعیین توالی و قرابت آن با سویه‌های دیگر بررسی شد.

www.SID.ir

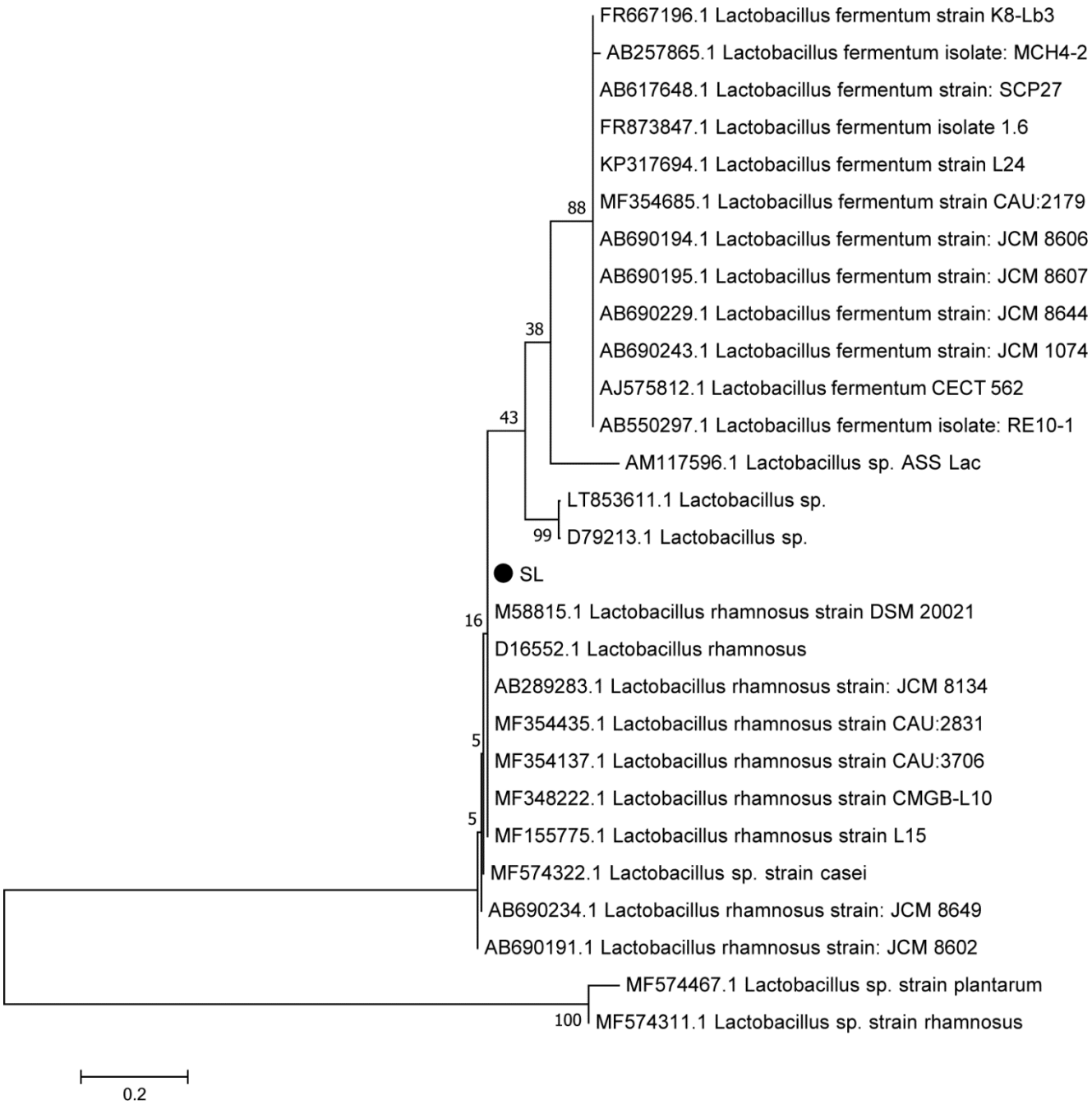
Archive of SID



شکل ۲. تصویر درخت فیلوژنی *SG* به این منظور توالی ژن *16s rRNA* در سویه مدنظر تعیین توالی و قرابت آن با سویه‌های دیگر بررسی شد.

www.SID.ir

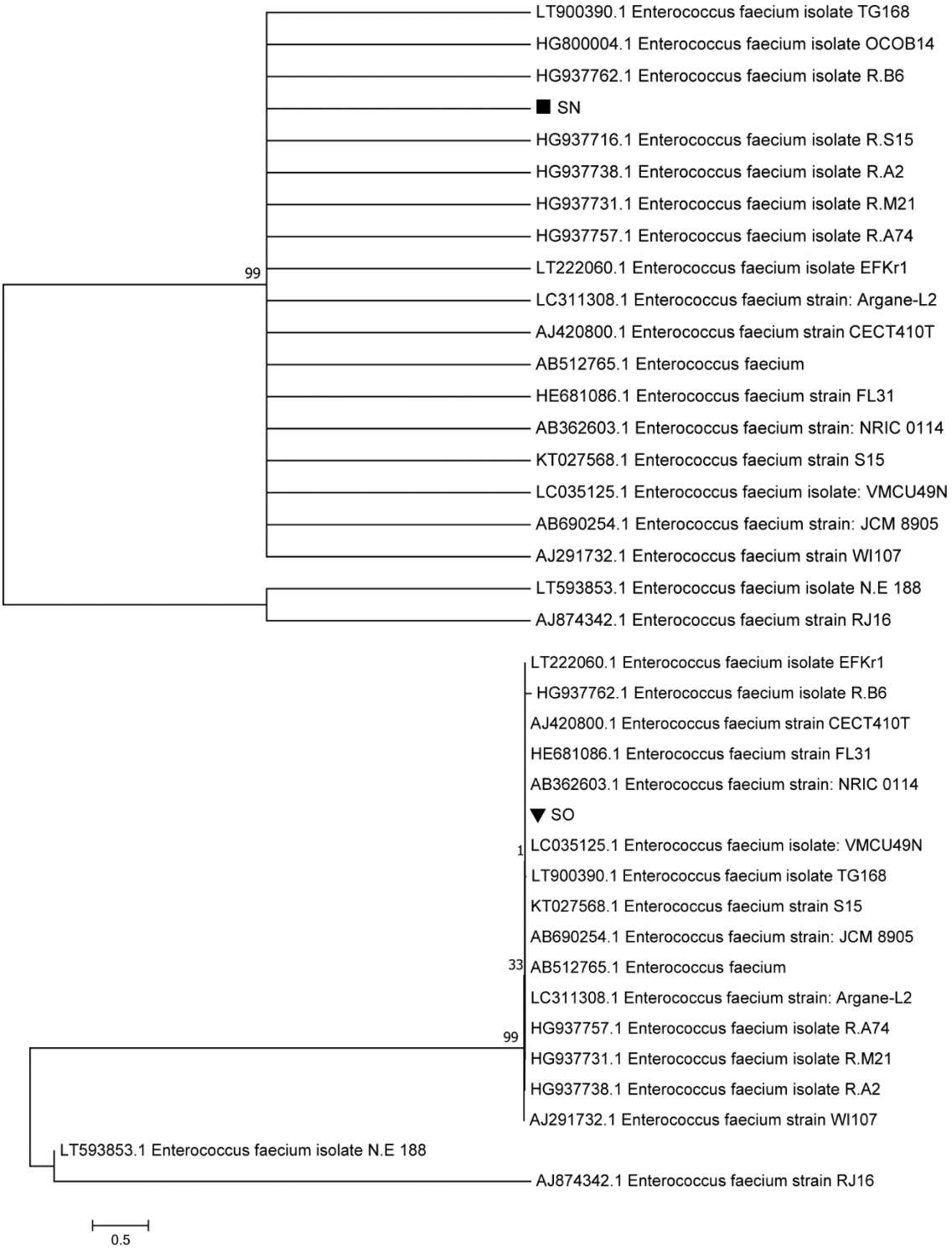
Archive of SID



شکل ۳. تصویر درخت فیلوژنی *SL* به این منظور توالی ژن *16s rRNA* در سویه مدنظر تعیین توالی و قرابت آن با سویه‌های دیگر بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۴. تصویر درخت فیلوژنی SO و SN. به این منظور توالی ژن *16s rRNA* در سویه مدنظر تعیین توالی و قرابت آن با سویه‌های دیگر بررسی شد.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها به عنوان مکمل‌های میکروبی غذایی با توان حفظ توازن میکروبی در دستگاه گوارش می‌توانند نقش مؤثری در حفظ سلامتی میزبان داشته باشند. اثرات ضدسرطانی پروبیوتیک‌ها از گونه‌های *لاکتوباسیلوس*، *بیفیدوباکتر* و *انتروکوک* در مطالعات مختلف در سرطان کلورکتال و سینه و مثانه گزارش شده است (۱۱). در این مطالعه باکتری‌های لاکتیک اسید از مدفوع ۶۰ مراجعه‌کننده به بیمارستان‌های غرب مازندران گردآوری و تعیین هویت شدند. در مطالعات مشخص شده pH معده متغیر است، اما در زمان خالی‌بودن به طور میانگین pH۴ دارد و pH روده تا ۸ هم گزارش شده است.

در پژوهش Soleimanifard و همکاران (۲۰۱۵) توانایی ۷۹ سویه لاکتوباسیل بومی بررسی شد و پس از توالی‌یابی ژن *16S rRNA* چهار سویه برتر به شماره‌های KF735654، KF35655، KJ508201 و KJ508202 در بانک ژنومی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ثبت شد. در مطالعه حاضر نیز از میان ۵۰ ایزوله جداسازی‌شده، ۷ سویه لاکتوباسیل جداسازی شد که دو سویه به عنوان سویه‌های جدید شناسایی شد و قابلیت ثبت در NCBI را دارد. این سویه‌ها به صورت طبیعی در نمونه‌های مدفوعی نوزادان سالم از نظر گوارشی جداسازی شد. همان‌طور که اشاره شد، لاکتوباسیل‌ها که به صورت فلور طبیعی در انسان دیده می‌شود، در پلاک دندانی و بزاق افراد بزرگسال و در مدفوع نوزادانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند وجود دارد (۱۲).

در مطالعه Melo و همکاران در سال ۲۰۱۷ *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* TCUESC01 در pH ۲-۴ طی ۰- ۱۰ ساعت رشد کمی با OD600=~۰/۱ نشان داد، اما با بالارفتن pH>۵ و افزایش مدت زمان کشت، افزایش رشد به OD600 >۰/۵ مشاهده شد (۱۳). در مطالعهٔ Todorov و همکاران در سال ۲۰۰۸ *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ST461BZ و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ST462BZ جداشده از نوشیدنی‌های فرآوری‌شده در بالکان، توان رشد مناسبی در pH۵-۷ نشان دادند (۱۴). در مطالعه Brink و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص شد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۲۴۱، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* ۴۲۳، *لاکتوباسیلوس کورواتوس* DF38 و *لاکتوکوکوس لاکتیس* گونهٔ لاکتیس HV219 توان رشد در pH ۵-۶/۵ را دارند (۱۵). در مطالعهٔ Gupta وSharma در سال ۲۰۱۷ رشد باکتری پروبیوتیک *پدیکوکوس اسیدیلاکتیسی* Ch-2 در pH ۲-۸ مشاهده شد (۱۶).

بر اساس نتایج مطالعه حاضر می‌توان انتظار داشت جدایهSE با رشد زیاد در pH ۲/۵-۵ توان تحمل اسید معده را بیشتر از دیگر جدایه‌ها داشته باشد. بنابراین به عنوان یک پروبیوتیک مناسب‌تر می تواند مورد توجه قرار گیرد. در مطالعه حاضر جدایه‌های SG، SK و SL در رتبهٔ دوم نسبت به دیگر جدایه‌ها، توان تحمل شرایط بسیار اسیدی معده را نشان دادند که می‌توان انتظار داشت در شرایط بسیار اسیدی معده نیز رشد داشته باشند. این می‌تواند یک مزیت در بررسی این سویه‌ها به عنوان عوامل پروبیوتیک مصرفی باشد.

شرایط محیطی دستگاه گوارش برای رشد بسیاری از باکتری‌ها مناسب است، اما تنش‌های مختلف چون اسیدیته، آنزیم‌های دایجستیو و نمک‌های صفراوی می‌تواند بر بقای باکتری‌ها حین انتقال به روده تأثیر منفی بگذارد (۱۳). در مطالعهٔ Gupta وSharma در سال ۲۰۱۷ پروبیوتیک پدیکوکوس *اسیدیلاکتیسی Ch-2* در غلظت نمکی ۰/۳ درصد صفرا بعد از طی ۴ و ۸ ساعت مقاومت بالای ۹۵ درصد گزارش شد (۱۶). در مطالعه Leite و همکاران در سال ۲۰۱۵ بر روی ۳۷ سویه پروبیوتیک از جمله *لاکتوکوکوس لاکتیس* گونه *کریموریس*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* گونه لاکتیس، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لوکونوستوک مزنتروئیدس* مقاومت همهٔ سویه‌ها به غلظت نمکی ۰/۳ درصد صفرا مشاهده شد (۱۷). در مطالعهٔ Kim و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی ۶ سویه موکئونجی مشخص شد همهٔ سویه‌ها به غیر از سویه *G4* تحمل غلظت نمکی ۰/۳ درصد صفرا را در ۱۲ ساعت بیشتر از ۲۴ ساعت دارند، اما میزان بقای سویه *G4* بعد از ۲۴ ساعت در این شرایط نمکی افزایش نشان داد (۱۸). در حالی که در مطالعه حاضر بیشترین رشد سویه *SG* طی ۲ ساعت مشاهده شد و با افزایش مدت زمان کشت در غلظت نمکی ۰/۳ درصد صفرا، کاهش رشد این سویه رخ داد، اما سویه *SE* با افزایش زمان به ۲۴ ساعت بهترین رشد را نشان داد. بنابراین انتظار می‌رود سویه *SE* بیشترین مقاومت را با گذشت زمان به دست می آورد، اما استفاده از سویه‌هایی چون سویه *SG* می‌تواند در صنعت غذایی در مواردی استفاده شود که به مدت زمان کمی برای بقا در دستگاه گوارش نیاز داشته باشند.

لاکتوباسیلوس و *بیفیدوباکتر* مهم‌ترین باکتری‌های پروبیوتیک هستند که از نظر خواص ضدسرطانی مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۹). در مطالعه Choi و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشخص شد بخش پلی ساکاریدی سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۶۰۶ خواص ضدسرطانی دارد (۲۰). در مطالعه Fichera و همکاران در سال ۲۰۱۶ بخش پپتیدوگلیکان سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازئی* اثرات ضدسرطانی بر روی رده‌های سلولی سرطانی خونی انسانی و موشی در شرایط *In vitro* داشت. در این مطالعه با تأثیر این بخش محلول

www.SID.ir

Archive of SID

بر روی موش آلبینوی سوئیسی مشخص شد این ترکیبات اثرات سمی بر روی سلول‌های سالم در شرایط *In vivo* ندارند (۲۱). در این مطالعه تعیین هویت دو جدایه با خواص ضدسرطانی علیه سلول‌های سرطانی روده Caco2 (اطلاعات نشان داده نشده است) نشان داد دو جدایه SG و SE به ترتیب از خانواده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* هستند. به نظر می‌رسد این دو سویه نیز با آزادکردن ترکیبات خاصی به محیط کشت و یا در شرایط *In vivo* (در روده) بتوانند باعث مرگ سلول‌های سرطانی شوند. در مطالعهٔ Kahouli و همکاران در سال ۲۰۱۳ *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* NCIMB 5221 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ATCC 53103 توان تولید اسید چرب آزاد (FFA) در سوپرناتانت را داشتند. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* NCIMB 5221 توان تولید اسید چرب زنجیرهٔ کوتاه (SCFAs) را داشت، اما در سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ATCC 53103 این ترکیب مشاهده نشد. وجود SCFAs در سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* باعث افزایش خاصیت ضدسرطانی این باکتری نسبت به دیگر باکتری‌های مطالعه‌شده بر روی سلول‌های سرطانی Caco2 شد (۷). بنابراین به نظر می‌رسد گونه‌های *لاکتوباسیلوس فرمانتوم* از جمله سویه مطالعه‌شده (سویه *SE*) از طریق تولید ترکیبات ضدسرطانی باعث القای مرگ و کاهش بقای سلول‌های سرطانی می‌شوند.

در مطالعه Lam و همکاران در سال ۲۰۰۷ گزارش شد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG قادر به افزایش مخاط معده در رت دارای آسیب مخاطی القاشده با الکل است. در این مطالعه مشخص شد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG باعث افزایش سطح پایه پروستاگلاندین E3ی مخاطی می‌شود و این سویه پروبیوتیک با افزایش پروستاگلاندین E3 مخاطی باعث حفظ سلول‌های مخاطی معده از آپوپتوز و مهار سرطان می‌شود (۲۲).

بنابراین می‌توان انتظار داشت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (سویه *SG*) در این مطالعه با ترکیبات خاصی که به محیط ترشح می‌کند باعث مرگ سلول‌های سرطانی شود. همچنین در تأیید این مطلب، مطالعه Escamilla و همکاران در سال ۲۰۱۲ نشان داد سوپرناتانت فاقد سلول از *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG و *لاکتوباسیلوس کازئی* با کاهش میزان متالوپروتئیناز ۹ ماتریکس سلولی (MMP-9) باعث کاهش متاستاز سلول‌های سرطانی روده HT-29 می‌شود (۲۳). همچنین در مطالعه Linsalata در سال ۲۰۱۰ بر روی ردهٔ سرطانی معده HGC-27 مشخص شد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG قادر به کاهش ۲۰ درصدی پلی آمین‌ها (محرک ایجاد سرطان و افزایش تکثیر سلولی) بعد از ۴۸ ساعت است (۲۴). بر این اساس مشخص می‌شود این دو سویه پروبیوتیکی در مطالعه حاضر مشابه با دیگر سویه‌های لاکتوباسیلی از طرق مختلف بتوانند اثرات ضدسرطانی خود را بر سلول‌ها اعمال نمایند که این امر در مطالعات آتی انجام خواهد شد. از محدودیت‌های تحقیق می‌توان به جلب رضایت افراد، هزینهٔ زیاد تحقیق و دسترسی به افراد برای تهیهٔ نمونه اشاره کرد. استفاده از روش‌های مولکولی نیز از نقاط قوت این مطالعه محسوب می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله تحقیقاتی حاصل رسالهٔ دکترای تخصصی در رشته میکروبیولوژی است. نویسندگان مقاله از دست‌اندرکاران پژوهش و دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن به خاطر همکاری در زمینهٔ ارائه امکانات آزمایشگاهی برای انجام این پایان‌نامه کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی ندارند.

References

1. Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermudez-Humaran LG. Probiotic Strain Lactobacillus Casei BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. Frontiers in Immunology. 2017; 8:1553.
2. Mattar MC, Lough D, Pishvaian MJ, Charabaty A. Current Management of Inflammatory Bowel Disease and Colorectal Cancer. Gastrointestinal Cancer Research: GCR. 2011; 4(2):53-61.
3. Ciernikova S, Mego M, Semanova M, Wachsmannova L, Adamcikova Z, Stevurkova V, et al. Probiotic Survey in Cancer Patients Treated in the Outpatient Department in a Comprehensive Cancer Center. Integrative Cancer Therapies. 2017; 16(2):188-195.
4. Goto Y, Kiyono H. Epithelial Barrier: An Interface for the Cross-Communication Between Gut Flora and Immune System. Immunological Reviews. 2012; 245(1):147-163.
5. Uccello M, Malaguarnera G, Basile F, D'Agata V, Malaguarnera M, Bertino G, et al. Potential Role of Probiotics on Colorectal Cancer Prevention. BMC Surgery. 2012; 12 Suppl 1:S35.
6. Zhong L, Zhang X, Covasa M. Emerging Roles of Lactic Acid Bacteria in Protection Against Colorectal Cancer. World Journal of Gastroenterology. 2014; 20(24):7878-7886.
7. Kahouli I, Tomaro-Duchesneau C, Prakash S. Probiotics in Colorectal Cancer (CRC) With Emphasis on Mechanisms of Action and Current Perspectives. Journal of Medical Microbiology. 2013; 62(Pt 8):1107-1123.

www.SID.ir

Archive of SID

8. Bertkova I, Hijova E, Chmelarova A, Mojzisova G, Petrasova D, Strojny L, et al. The Effect of Probiotic Microorganisms and Bioactive Compounds on Chemically Induced Carcinogenesis in Rats. Neoplasma. 2010; 57(5):422-428.
9. Hendler R, Zhang Y. Probiotics in the Treatment of Colorectal Cancer. Medicines (Basel). 2018; 5(3).
10. Turner S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD. Investigating Deep Phylogenetic Relationships Among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis 1. Journal of Eukaryotic Microbiology. 1999; 46(4):327-338.
11. Raman M, Ambalam P, Kondepudi KK, Pithva S, Kothari C, Patel AT, et al. Potential of Probiotics, Prebiotics and Synbiotics for Management of Colorectal Cancer. Gut Microbes. 2013; 4(3):181-192.
12. Soleimani Ff, Ghobadi DM, Piravivanak Z. Screening Local Lactobacilli From Iran in Terms of Production of Lactic Acid and Identification of Superior Strains. Biological Journal of Microorganism. 2015; 4(15):155-166.
13. Melo TA, Dos Santos TF, Pereira LR, Passos HM, Rezende RP, Romano CC. Functional Profile Evaluation of Lactobacillus fermentum TCUESC01: A New Potential Probiotic Strain Isolated during Cocoa Fermentation. BioMed Research International. 2017; 2017:5165916.
14. Todorov SD, Botes M, Guigas C, Schillinger U, Wiid I, Wachsman MB, et al. Boza, A Natural Source of Probiotic Lactic Acid Bacteria. Journal of Applied Microbiology. 2008; 104(2):465-477.
15. Brink M, Todorov SD, Martin JH, Senekal M, Dicks LM. The Effect of Prebiotics on Production of Antimicrobial Compounds, Resistance to Growth at Low pH and in the Presence of Bile, and Adhesion of Probiotic Cells to Intestinal Mucus. Journal of Applied Microbiology. 2006; 100(4):813-820.
16. Gupta A SN. Characterization of Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria- Pediococcus acidilactici Ch-2 Isolated from Chuli: A Traditional Apricot Product of Himalayan Region for the Production of Novel Bioactive Compounds with Special Therapeutic Properties. J Food Microbiol Saf Hyg. 2017; 2(1):1-11.
17. Leite AM, Miguel MA, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VM, Mayo B, et al. Probiotic Potential of Selected Lactic Acid Bacteria Strains Isolated From Brazilian Kefir Grains. Journal of Dairy Science. 2015; 98(6):3622-3632.
18. Kim SE, Kim YH, Lee H, Kim DO, Kim HY. Probiotic Properties of Lactic Acid Bacteria Isolated From Mukeunji, A Long-Term Ripened Kimchi. Food Science and Biotechnology. 2012; 21(4):1135-1140.
19. Wang SM, Zhang LW, Fan RB, Han X, Yi HX, Zhang LL, et al. Induction of HT-29 Cells Apoptosis by Lactobacilli Isolated From Fermented Products. Research in Microbiology. 2014; 165(3):202-214.
20. Choi SS, Kim Y, Han KS, You S, Oh S, Kim SH. Effects of Lactobacillus Strains on Cancer Cell Proliferation and Oxidative Stress In Vitro. Letters in Applied Microbiology. 2006; 42(5):452-458.
21. Fichera GA, Fichera M, Milone G. Antitumoural Activity of a Cytotoxic Peptide of Lactobacillus Casei Peptidoglycan and Its Interaction With Mitochondrial-Bound Hexokinase. Anti-Cancer Drugs. 2016; 27(7):609-619.
22. Lam EK, Tai EK, Koo MW, Wong HP, Wu WK, Yu L, et al. Enhancement of Gastric Mucosal Integrity by Lactobacillus Rhamnosus GG. Life Sciences. 2007; 80(23):2128-2136.
23. Escamilla J, Lane MA, Maitin V. Cell-Free Supernatants From Probiotic Lactobacillus Casei and Lactobacillus Rhamnosus GG Decrease Colon Cancer Cell Invasion In Vitro. Nutrition and Cancer. 2012; 64(6):871-678.
24. Linsalata M, Cavallini A, Messa C, Orlando A, Refolo MG, Russo F. Lactobacillus Rhamnosus GG Influences Polyamine Metabolism in HGC-27 Gastric Cancer Cell Line: A Strategy Toward Nutritional Approach to Chemoprevention of Gastric Cancer. Current Pharmaceutical Design. 2010; 16(7):847-853.

www.SID.ir