Archive of SID

بررسی خواص پروبیوتیکی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 بر پایه توانایی چسبندگی آن به سلول‌های اپیتلیال روده

فرشته فلاح، **سید علی مرتضوی***، فریده طباطبایی یزدی

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۱/۲۷

چکیده

امروزه افزایش بیماری‌ها و پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، محققان را بر آن داشته تا با روش‌های جدید و به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید از جمله پروبیوتیک‌ها، بهداشت غذایی جامعه را افزایش دهند. بنابراین جداسازی و شناسایی میکروارگانیسم‌های مفید با خصوصیات پروبیوتیکی برای افزایش سلامت در انسان، اهمیت ویژه‌ای پیدا کرده است.از مهمترین باکتری‌های پروبیوتیک، جنس *لاکتوباسیلوس*[1]ها هستند. هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری *لاکتوباسیلوس برویس*[2] سویه PML1 می باشد. زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده، مقاومت به نمک‌های صفراوی، مقاومت به آنتی‌بیوتیک، بررسی خاصیت ضدمیکروبی و همچنین پتانسیل آب‌گریزی سویه مورد نظر بررسی شد. سپس در آزمایش تکمیلی، قابلیت چسبندگی به سلول‌های سرطانی و شبیه سازی شده روده انسان، Caco-2، مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد سویه مورد نظر پتانسیل بالایی برای زنده‌مانی در شرایط اسیدی معده، روده و همچنین نمک صفراوی برخوردار است. بیشترین اثر بازدارندگی سویه روی پاتوژن *سالمونلا تایفیموریوم*[3]بوده که عامل مسمومیت‌های غذایی می‌باشد. درصد آب گریزی سویه *لاکتوباسیلوس برویس* ۱۸/۳۳ درصد بود. درصد چسبندگی به سلول‌های Caco-2 نیز ۸/۷ درصد محاسبه گردید. با توجه به نتایج به دست آمده باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 از پتانسیل پروبیوتیکی مطلوبی برخوردار است. بنابراین پیشنهاد می‌شود، بعد از انجام تست‌های تاییدی بیشتر از این سویه به عنوان مکمل پروبیوتیکی در کشت‌های تخمیری و یا به عنوان کشت همراه در فرایند تخمیر مواد غذایی مختلف استفاده گردد.

کلمات کلیدی: پتانسیل پروبیوتیکی، چسبندگی، *لاکتوباسیلوس برویس*، Caco-2.

* morteza@um.ac.ir

[1] *Lactobacillus*
[2] *Lactobacillus brevis*
[3] *Salmonella typhimurium*

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دستگاه گوارش و مخاط روده متشکل از مجموعه باکتری‌هایی است که اهمیت آن‌ها در حفظ سلامتی بدن قابل توجه می‌باشد. در سال ۱۸۷۳ جوزف لیستر[1] در ادامه راه پاستور به طور اتفاقی اولین سویه باکتری‌های اسید لاکتیک را از شیر استخراج کرد و آن را *باکتریوم لاکتیس*[2] نامید که امروزه تحت عنوان *استرپتوکوکوس لاکتیس*[3] خوانده می‌شود(۱, ۲). پروبیوتیک مشتق شده از کلمه پرولایف[4] به معنی "برای زندگی" است. سازمان غذا و کشاورزی (FAO)[5] و نیز سازمان بهداشت جهانی (WHO)[6] تعریف جامعی برای پروبیوتیک‌ها مطرح نمودند. طبق این تعریف پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که درصورت مصرف مقادیر مشخص(10^7 CFU/ml) ازآن‌ها آثار سلامتی بخشی بر میزبان خواهند داشت. در گذشته از پروبیوتیک‌ها به عنوان مواد ترشح شده به وسیله‌ی یک میکروارگانیسم که محرک رشد میکروارگانیسم دیگر می‌باشد، استفاده می‌شد(۲). امروزه پروبیوتیک‌ها مکمل‌های میکروبی تعریف می‌شوند که با اصلاح تعادل فلور میکروبی روده تاثیر مثبتی در میزبان ایجاد می‌کنند. ازآثار پروبیوتیک‌ها بر سلامتی انسان عبارت است از: بهبود در قابلیت هضم شیر در افراد مبتلا به عدم تحمل لاکتوز[7] تنظیم سیستم ایمنی بدن، تولید ویتامین‌های گروه B، تولید پپتیدهای ضد میکروبی، افزایش ایمنی بدن و جلوگیری از سرطانی شدن سلول‌ها (۳, ۴).

لاکتوباسیلوس‌ها از انواع باکتری‌های اسید لاکتیک هستند که به عنوان باکتری‌های ایمن در نظر گرفته می‌شوند (۵). این باکتری‌ها گرم مثبت، غیراسپورزا، کاتالاز منفی بوده ومعمولا غیرمتحرک هستند. بیشتر به شکل میله‌ای دیده می‌شوند ولی اشکال دیگری مانند کوکوباسیل، کرینه و رشته‌ای نیز در آن‌ها قابل مشاهده است. دمای بهینه رشد این جنس ۳۰°C تا ۴۰°C بوده و درصد بازهای آلی سیتوزین و گوانین کمی دارند (۶). این جنس عموما درغذاهای سنتی تخمیری وجود داشته، همچنین در دستگاه گوارش یافت شده و بیشترین فلور روده باریک را تشکیل می‌دهند (۱, ۷, ۸). از گونه‌های مهم این جنس می‌توان به *لاکتوباسیلوس کازئی*[8]، *برویس*[9]، *پنتوسوس*[10]، *فرمنتوم*[11]، *پلانتاروم*[12] و... اشاره کرد (۹).

ترخینه محصول تخمیری بر پایه غلات بوده که به عنوان میان وعده در برخی کشورها مانند ترکیه، عراق، یونان و... با نام‌های مختلف وجود دارد. در ایران محصول اصلی استان های غربی کشور ازجمله کرمانشاه بوده که سویه مورد استفاده در این پژوهش نیز از ترخینه این استان جداسازی و شناسایی شده است. ترخینه منبع بسیار خوبی از پروتئین، اسیدهای آمینه، اسیدهای چرب، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد. به همین دلیل ترکیب غذایی مناسبی برای کودکان و بیماران می‌باشد. این محصول از ترکیب آرد گندم و سبزیجات معطر و ادویه و شلغم به دست می‌آید. سپس به این مواد اولیه دوغ اضافه شده و فلور میکروبی موجود در دوغ شرایط تخمیر را فراهم می‌کند. تخمیر در دمای ۲۰°C به مدت ۳ روز انجام می‌شود. محتوای رطوبتی و pH پایین محصول باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی شده و از فساد ماده غذایی جلوگیری می‌کند (۹).

در این پژوهش خصوصیات پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس برویس*سویه PML1 مورد مطالعه قرار گرفته‌است. میزان زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده روده و معده و تحمل نمک صفرا از جمله ویژگی‌های اولیه و ضروری در بررسی پتانسیل پروبیوتیکی می‌باشد که در این پژوهش نیز مورد بررسی قرار گرفته‌است. حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌های مهم بالینی و فعالیت ضدمیکروبی این سویه علیه پاتوژن‌های شناخته شده غذایی نیز مورد ارزیابی قرار گرفته‌است.

[1] Joseph Lister
[2] *Bacterium lactis*
[3] *Streptococcus lactis*
[4] Prolife
[5] Food and Agriculture Organization
[6] World Health Organization
[7] Lactose Intolerance
[8] *Lactobacillus casei*
[9] *Lactobacillus brevis*
[10] *Lactobacillus pentosus*
[11] *Lactobacillus fermentum*
[12] *Lactobacillus plantarum*

www.SID.ir

Archive of SID

خاصیت آب‌گریزی[1] توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده نیز بررسی شده‌است.

مواد و روش‌ها

زنده مانی سلول در شرایط شبیه سازی شده شیره معده و روده

شیره شبیه سازی شده معده با محلول سازی پپسین در بافر فسفات ۳g/L و رساندن pH به ۲ با هیدروکلریک اسید تهیه شد. همچنین با افزودن پانکراتین[2] (سیگما، آمریکا-P) 1500به بافر فسفات ۱g/L حاوی ۴/۵ درصد اگزال[3](سیگما، آمریکا) و رساندن به pH ۸ با سود ۰/۱mol/L، شرایط روده شبیه سازی شد. هر دو محلول با فیلتر ۰/۲۲µ فیلتر شده و ایزوله *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 به آن تلقیح و در انکوباتور ۳۷°C به مدت ۲h نگهداری شد. در زمان های ۳۰min، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ از نمونه‌ها کشت داده شد و میزان زنده مانی سلول به نسبت زمان صفر بررسی شد. در هریک از زمان‌ها از پلیت MRS Agar برای رشد سویه به عنوان نمونه کنترل استفاده شد.

مقاومت به نمک‌های صفراوی

نمک‌های صفراوی با غشای سلول زنده واکنش داده و به همین دلیل مولکول‌هایی با خاصیت ضدمیکروبی محسوب می‌شوند. در نتیجه بررسی مقاومت سویه به نمک‌های صفراوی، به عنوان شاخصی برای زنده‌مانی میکروارگانیسم ضروری می‌باشد (۱۳, ۱۴).

ابتدا باکتری مورد نظر در ۲ml-۵ بافر فسفات استریل به صورت سوسپانسیون حل شد تا غلظت آن به ۱ مک‌فارلند[4] برسد. مقاومت سویه مورد نظر با کشت ۱۰µl از ان بر روی محیط MRS Agar حاوی ۰/۲، ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۳ درصد از نمک صفراوی بررسی شد. از پلیت فاقد نمک صفراوی به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

در این پژوهش از آنتی‌بیوتیک‌های ونکومایسین[5] ۳۰µg/mL، فسفومایسین[6] ۲۰۰µg/mL، کاناماسین[7] ۳۰µg/mL، جنتامایسین[8] ۱۰µg/mL، نئومایسین[9] ۳۰µg/mL، سفکسیم[10] ۵µg/mL، سیپروفلوکساسین[11] ۵µg/mL، آمپیسیلین[12] ۱۰µg/mL و اریترومایسین[13] ۱۵µg/mL استفاده شد. به منظور بررسی مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌های ذکر شده، ابتدا سویه مورد نظر با غلظت نیم مک‌فارلند در پلیت‌های حاوی محیط MRS Agar کشت داده و سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیک با غلظت مشخص را در فاصله ۲cm-۴ روی سطح پلیت قرار داده و بعد از تثبیت آن (۱۵min قرارگیری در دمای محیط) در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ h گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از این مدت قطر هاله اطراف دیسک را اندازه‌گیری کرده و با توجه به معیار استاندارد، مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک بررسی شد(۳،۱۱). از محیط MRS Agar برای رشد سویه کنترل مثبت استفاده شد.

خاصیت ضد میکروبی

جهت آماده‌سازی عصاره باکتری برای بررسی خاصیت ضد میکروبی، ابتدا باکتری مورد نظر در محیط MRS Broth به مدت ۱۸h در دمای ۳۷°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس عصاره به منظور حذف سلول‌های باکتریایی در شرایط ۵۰۰۰rpm به مدت ۲۰ min در دمای ۵°C سانتریفیوژ و ۲۰ml از سوپرناتانت با کاغذ صافی ۰/۲۲ µ فیلتر شده و با سود ۱N به pH ۷ رسانده شد، در آخر با دستگاه خشک کن انجمادی BETA LCS plus 2-8 تحت انجماد با دمای ۴۵°C- و حرارت دهی در دمای ۳۲°C تحت خلا ۰/۳۸mbar به مدت ۴۰h لیوفیلیزه گردید. نمونه خشک شده با ۴ml آب

[1] Hydrophobicity
[2] Pancreatin
[3] Oxall
[4] Mc Farland
[5] Vancomycin
[6] Fosfomycin
[7] Kanamycin
[8] Gentamycin
[9] Neomycin
[10] Cefixime
[11] Ciprofloxacin
[12] Ampicillin
[13] Erythromycin

www.SID.ir

Archive of SID

مقطر استریل مجدد حل شده و خاصیت ضد میکروبی آن با روش انتشار در آگار به کمک چاهک و دیسک بررسی شد. سوش‌های پاتوژنی که در این تست از آن‌ها استفاده شد در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

جدول ۱. سویه‌های پاتوژن مورد استفاده قرار گرفته جهت بررسی خاصیت ضد میکروبی سویه *لاکتوباسیلوس برویس* PML1

جنس	گونه	سویه
Escherichia	*coli*	*ATCC 25922*
Staphylococcus	*aureus*	*ATCC 259*
Pseudomonas	*aeruginosa*	*PTCC 1707*
Salmonella	*typhimurium*	*PTCC 1609*
Listeria	*innocua*	*ATCC 33090*

در روش چاهک اساس کار نفوذ ماده ضد میکروبی از طریق حفره ایجاد شده در آگار به اطراف می‌باشد. از سوش‌های پاتوژن که غلظت آن‌ها روی نیم مک فارلند تنظیم شده، به میزان ۱۰µl بر روی محیط مولر هینتون اگار[1] (مرک، آلمان) کشت داده و سپس در پلیت‌ها چاهک‌هایی با قطر ۶/۸mm به وسیله انتهای پیپت استریل ایجاد شد و ۱۱۰µl از عصاره باکتری به چاهک‌ها اضافه گردید. بعد از گرمخانه‌گذاری به مدت ۴۸h در دمای ۳۷°C، قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک اندازه‌گیری شد. در روش انتشار در آگار به کمک دیسک، دیسک‌های کاغذی با قطر ۶/۸mm را به مدت ۱۵min در عصاره باکتری غوطه‌ور کرده و روی پلیت‌های MRS Agar کشت داده شده با پاتوژن‌ها قرار داده شد و بعد از گرمخانه‌گذاری هاله عدم رشد اندازه‌گیری گردید. در هر دو روش از پلیت‌های MRS Agar برای رشد سویه لیوفیلیزه شده به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

خاصیت هیدروفوبیسیتی

توانایی اتصال ارگانیسم به هیدروکربن‌ها تحت عنوان هیدروفوبیسیتی خوانده می‌شود(۱۱). به منظور بررسی این خاصیت ابتدا سوسپانسیون میکروبی را سانتریفیوژ کرده (۵۰۰۰rpm به مدت ۵min، ۴°C)، سوپرناتانت را خارج کرده و باقی مانده با بافر فسفات شست و شو داده، پلت در۱ml بافر فسفات استریل حل و در جذب ۰/۶ تنظیم شد. سپس ۱/۵ml از این سوسپانسیون را با ۷۵۰µl هگزادکان (مرک، آلمان) ترکیب و به مدت ۲min با شیکر مخلوط شد. سوسپانسیون را ۳۰min در دمای اتاق نگه داشته و بعد از آن فاز روغنی رویی را خارج کرده و جذب محلول زیری با دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی شد. کاهش جذب نشان دهنده خاصیت هیدروفوبی بوده که با رابطه زیر محاسبه شد. نمونه کنترل مثبت سویه گرمخانه‌گذاری شده در دمای ۳۷°C به مدت ۱۸h بوده است.

$$H\% = \left[\frac{A_1 - A_2}{A_1}\right] \times 100$$

H: هیدروفوبیسیتی

A_2 و A_1: جذب قبل و بعد از تیمار با هگزادکان(۱۵).

آزمون چسبندگی

کشت سلول

ارگانیسم‌ها با اتصال به اپیتلیوم روده و رقابت با پاتوژن‌ها در جایگاه‌های اتصال و تحریک‌کردن سیستم ایمنی میزبان با عث تحریک سیستم ایمنی و همچنین جلوگیری از رشد باکتری‌های پاتوژن می شوند(۱۶). سلول‌های Caco-2 با کد F-1021013a از کلکسیون سلولی پژوهشکده فناوری زیستی مشهد خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت DMEM (High Glucose)[2] (ویواسل، ایران) به همراه ۱۰ درصد v/v از سرم جنینی گوساله (ویواسل، ایران)، پنی سیلین/استرپتومایسین ۱X (ویواسل، ایران) و در دمای ۳۷°C و شرایط محیطی ۵ به ۹۵ در صد از CO_2 و رطوبت ثابت، نگه‌داری شدند. برای انجام آزمون چسبندگی، سلول‌های Caco-2 در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند، به طوری که دانسیته سلول به ۲۵۰۰۰Cells/cm^2 رسید. رشد سلول‌ها به مدت ۱۵ روز ادامه پیدا کرد و محیط کشت هر ۲ روز یکبار تعویض شد. در نهایت یک لایه نازک و پوشیده شده از سلول کف پلیت تشکیل شد(۱۷).

[1] Mueller Hinton Agar

[2] Dulbecco's modified Eagle's medium

www.SID.ir

Archive of SID

چسبندگی باکتری

سویه فعال شده را سانترفیوژ کرده (۶۰۰۰rpm، به مدت ۱۰min در دمای ۴°C) و با استفاده ازمحیط کشت DMEM شست وشو داده و با بافر فسفات استریل به OD=۱ (10^8CFU/ml) ر ساندیم. تعداد باکتری نیز در محیط کشت MRS Agar شمارش شد. سپس ۱ml از این سوسپانسیون را به سلول Caco-2 که از قبل با بافر فسفات شست و شو شده و از حذف آنتی‌بیوتیک مطمئن شدیم، اضافه نموده، به طوری که نسبت Caco-2 به باکتری بیش از ۱ به ۱۰۰ شد. پس از ۱h گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷°C با ۵ درصد CO_2، به منظور حذف سلول‌های اتصال نیافته، ۳ مرتبه شست و شو با بافر فسفات انجام شد. برای جداسازی باکتری‌ها از سلول، ۱ml تریتون X100 به چاهک اضافه، و به مدت ۲۰min در دمای ۳۷°C قرار داده شدند. به منظور شمارش باکتری *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 از محیط MRS Agar استفاده شد. توانایی چسبندگی باکتری براساس تعداد باکتری های چسبیده نسبت به تعداد کل باکتری اولیه گزارش شد(۱۷).

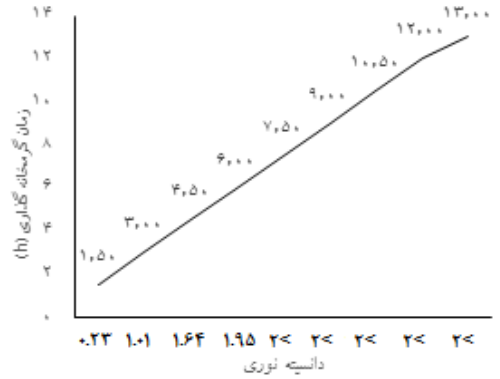
میکروسکوپ الکترونی روبشی[1]

ابتدا سلول‌های Caco-2 بر روی لامل و داخل پلیت ۶ خانه ای رشد داده شده و پس از ۱۵ روز که سلول‌های تمایز یافته ایجاد شد، چسبندگی باکتری طبق روش فوق انجام پذیرفت. به منظور مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ الکترونی، سلول‌ها با ۲/۵ درصد W/V گلوتارآلدهید[2] (سیگما، آمریکا) در ۰/۱ M بافر فسفات (pH ۷/۴) به مدت ۱h در دمای اتاق تثبیت شدند. بعد از دوبار شست‌وشو با بافر فسفات، مجدد سلول‌ها با ۲ درصد اسمیم تتراکسید[3] (پروسی تک، استرالیا) در همان بافر و دما به مدت ۳۰min، تثبیت ثانویه انجام شد. پس از سه مرتبه شست‌وشو با بافر، نمونه با غلظت‌های ۳۰، ۵۰، ۷۰، ۸۰، ۱۰۰ درصد V/V اتانول، خشک شده و تحت پوششی از طلا قرار گرفته و با میکروسکوپ الکترونی مشاهده شدند(۱۸).

نتایج و بحث

منحنی استاندارد رشد

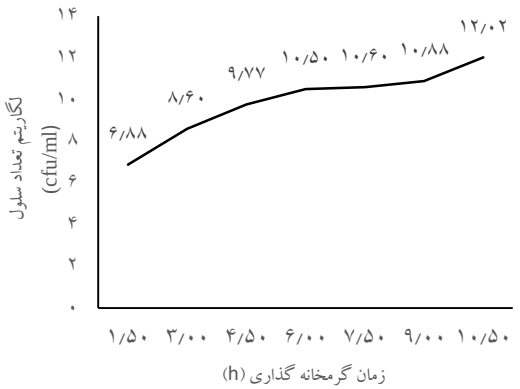
منحنی استاندارد باکتری بر اساس جذب نوری و تعداد سلول بر حسب زمان رسم شد. تولید باکتریوسین‌ها و ترکیبات ضدمیکروبی در انتهای فاز رشد و ابتدای فاز سکون صورت می گیرد (۲۰).



شکل ۱. منحنی جذب نوری بر حسب زمان گرمخانه‌گذاری.

بررسی زنده‌مانی سلول در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده

در این طرح با استفاده از ۰/۳ درصد پپسین و ۴/۵ درصد اگزال شرایط معده و روده شبیه‌سازی شد و نتایج نشان

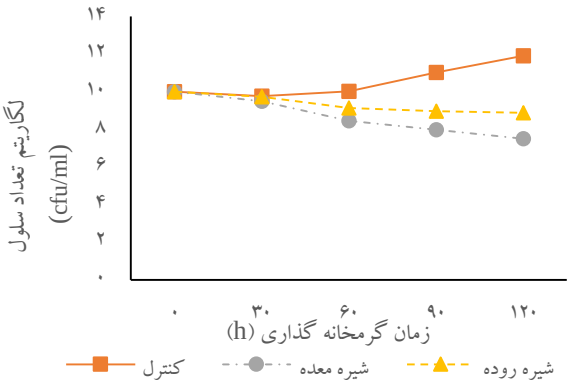


شکل ۲. منحنی لگاریتم تعداد سلول بر حسب زمان گرمخانه‌گذاری.

[1] Scanning Electron Microscopy
[2] Glutaraldehyde
[3] Osmium tetroxide

www.SID.ir

Archive of SID

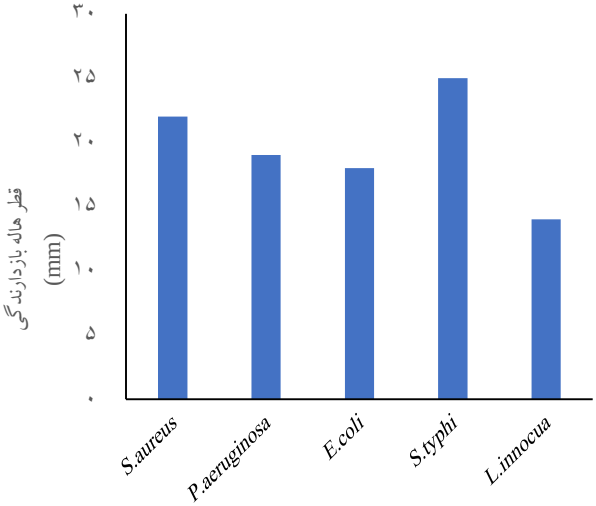


شکل۳. منحنی لگاریتم تعداد سلول زنده بعد از قرار گیری در شرایط شبیه سازی شده معده و روده.

داد پس از قرارگیری باکتری در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده به مدت ۲۴h حدود یک سیکل لگاریتمی از تعداد باکتری‌ها کاسته شد، همچنین درصد زنده‌مانی سویه در شرایط مشابه معده و با ۰/۳ درصد پپسین حدود ۷۵ درصد و در شرایط مشابه روده با ۴/۵ درصد اگزال حدود ۸۹ درصد بدست آمد(شکل۳). بنابراین این سویه توانایی تحمل شرایط معده و روده را دارد.

مقاومت به نمک‌های صفراوی

در این پژوهش غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ w/v نمک صفراوی برای بررسی مقاومت سویه مورد نظر مورد آزمون قرار گرفت. نتایج نشان داد که در هیچ یک از این غلظت‌ها



شکل ۴. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در برابر پاتوژن‌های غذایی به روش انتشار در آگار (دیسک).

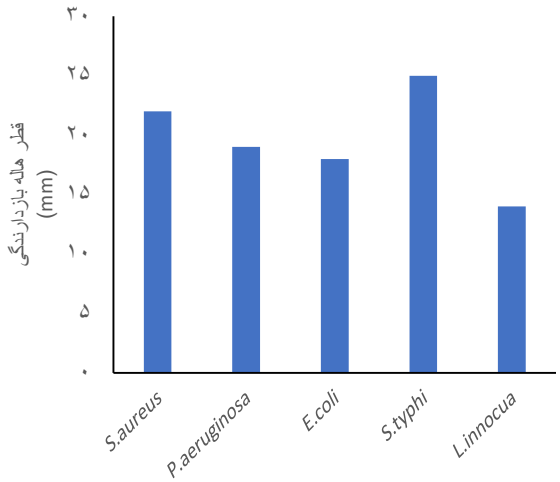
توانایی رشد و تکثیر سلول از بین نرفت بطوری که تفاوت معنی داری در سطح ۵ درصد بین درصد رشد سویه در شرایط کنترل و حضور نمک‌های صفراوی وجود نداشت.

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

نتایج مربوط به تست مقاومت به آنتی‌بیوتیک در جدول ۲ آورده شده است. سویه PML1 *لاکتوباسیلوس برویس* در برابر جنتامایسین و ونکومایسین مقاوم بوده و می‌توان در آزمون‌های مبتنی بر کشت از این آنتی بیوتیک‌ها در محیط کشت اختصاصی *لاکتوباسیلوس برویس* استفاده کرد. همچنین این سویه در برابر سیپروفلوکساسین و آمپیسیلین حساسیت متوسطی داشت و در مورد باقی آنتی‌بیوتیک‌های به کار گرفته شده (اریترومایسین، سفکسیم، نئومایسین، کاناماسین و فسفومایسین) حساسیت کامل وجود داشت.

خاصیت ضدمیکروبی

نتایج مربوط به بررسی خاصیت ضدمیکروبی به روش انتشار در آگار به کمک دیسک و چاهک در شکل ۴ و ۵ نشان داده شده است. در هر دو روش بیشترین اثر بازدارندگی روی پاتوژن *سالمونلا تافیموریوم* بوده که باکتری باسیل گرم منفی بوده و عامل مسمومیت‌های غذایی می‌باشد و کمترین خاصیت بازدارندگی روی *لیستریا اینوکوا*[1] بوده که باکتری گرم مثبت بی هوازی اختیاری می‌باشد.



شکل ۵. اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در برابر پاتوژن‌های غذایی به روش انتشار در آگار (چاهک).

[1] Listeria innocua

www.SID.ir

Archive of SID

خاصیت هیدروفوبیسیتی

کاهش جذب سوسپانسیون بعد از قرارگرفتن سلول در معرض هیدروکربن، نشان دهنده‌ی خاصیت هیدروفوبی باکتری می‌باشد که در مورد *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 میزان ۱۸/۳۳ درصد می‌باشد.

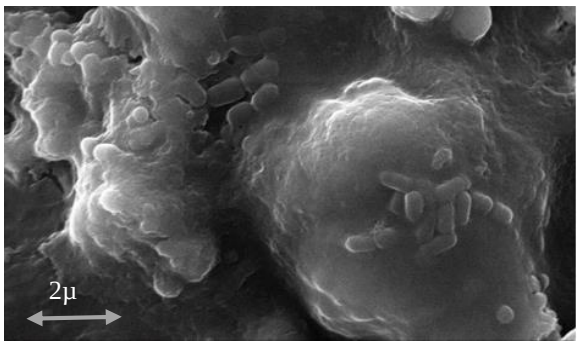
آزمون چسبندگی

در این پژوهش میزان چسبندگی *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 به Caco-2، ۱۳/۸ درصد گزارش شد (شکل ۶).

بحث و نتیجه گیری

بررسی زنده‌مانی سلول در شرایط شبیه‌سازی شده شیره معده و روده

بررسی بقای باکتری در دستگاه گوارش از الزامات بررسی پتانسیل پروبیوتیکی است(۱۰). روزانه حدود ۲/۵L اسید معده و ۱ L صفرا به منظور هضم غذا وارد دستگاه گوارش می‌شود. بنابراین باکتری بایستی به این شرایط مقاوم



شکل ۶. چسبندگی *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 به سلول‌های Caco-2 توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی با بزرگنمایی ۲۰۰۰۰.

بوده تا بتواند زنده مانده و اثرگذار باشد. برای شبیه‌سازی شرایط معده از pH ۲ و آنزیم تریپسین[1] استفاده شد و در مورد شرایط شبیه سازی شده روده اثر همزمان پانکراتین در pH ۸ مورد بررسی قرار گرفت(۲۲, ۳۲). pH پایین معده و وجود تریپسین موجب جلوگیری از رشد ارگانیسم‌ها در دستگاه گوارش می‌شود. بنا به گزارش وسیعی و همکاران مقاومت باکتری‌های پروبیوتیک به شرایط اسیدی می‌تواند به دلیل تولید برخی از ترکیبات پلی‌ساکاریدی توسط باکتری باشد که از تاثیر اسید بر غشای سلول ممانعت به عمل می‌آورد. وجود پانکراتین در روده کوچک موجب تجزیه پروتئین‌ها کربوهیدرات‌ها و چربی می‌شود. بنابراین توانایی تحمل این شرایط برای اثبات پتانسیل پروبیوتیکی ضروری است(۱۳). در صورت حضور آنزیم‌های هیدرولیز کننده نمک صفرا این مقاومت از بین رفته و حضور برخی ترکیبات این مقاومت را افزایش می‌دهند. برخی معتقدند کاهش کلسترول غشای سلول باکتری با هیدرولیز نمک‌های صفرا ارتباط مستقیم دارد. مقداری از کلسترول سلول باکتری در حین رشد از غشا خارج شده و با نمک‌های صفرا تماس پیدا کرده و آن را تجزیه می‌کند. این نمک‌ها غیر مزدوج بوده و برای سلامت انسان ضرر دارد. اکثر پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیل‌ها توانایی دهیدروکسیله کردن نمک های صفرای تجزه شده و غیر مزدوج را ندارند، بنابراین در برابر آن مقاومت نمی‌کنند(۷, ۳۳). در سال ۲۰۱۷ سان و همکاران درصد زنده مانی *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از کیمچی را در شرایط مشابه معده با ۰/۳ درصد پپسین ۹۹ درصد و در شرایط مشابه روده با ۰/۳ درصد اگزال ۱۰۵ درصد گزارش کردند(۲۱).

مقاومت به نمک‌های صفراوی

نمک‌های کیسه صفرا با از بین بردن میکروارگانیسم‌ها، نقش مهم و اساسی در دفاع اختصاصی روده ایفا می‌کنند، بنابراین بررسی زنده‌مانی سویه در غلظت های مختلف نمک‌های صفراوی برای اثبات پتانسیل پروبیوتیکی ضروری است(۲۲). غلظت ۰/۳ درصد از نمک های غیر مزدوج صفراوی به عنوان غلظت بحرانی برای میکروارگانیسم‌ها محسوب می‌شود. با قرار گرفتن سلول در معرض این غلظت از نمک‌ها غشای سلولی تجزیه شده و خروج محتویات داخلی منجر به مرگ سلول می‌شود. در صورت مقاوم بودن در این غلظت می‌توان به مقاوم بودن ارگانیسم در تمام غلظت‌ها استناد کرد(۲۳). نمک‌های صفراوی باعث تسهیل

[1] Trypsin

www.SID.ir

Archive of SID

در هضم ترکیبات چربی‌دوست می‌شوند ولی گاها نوعی خاصیت آنتی‌بیوتیکی از خود نشان داده و مانع از رشد میکروبیوتای د ستگاه گوارش می شوند. غلظت این نمک‌ها در بدن انسان بین ۰/۳ تا ۰/۵ می‌باشد. اگزال یک ترکیب طبیعی حاوی مخلوطی از نمک‌های صفراوی مزدوج و غیر مزدوج می‌باشد(۱۳). بنا به گزارش هیرونیموس و همکاران ماتریکس ماده غذایی بر میکروارگانیسم حالت محافظتی داشته و باعث ایجاد مقاومت باکتری بر نمک‌های صفرا می‌شود(۲۲). در صورت وجود آنزیم‌های هیدرولیز کننده نمک صفرا[1] سویه در برابر این نمک‌ها مقاومت نشان خواهد داد. همچنین وجود دو آنزیم تورودئوکسیکولیک اسید هیدرولاز[2] و توروکولیک اسید هیدرولاز[3] در *لاکتوباسیلوس*ها باعث تجزیه ترکیبات موجود در نمک صفرا و افزایش زنده‌مانی سویه می‌شوند(۲۴).

مقاومت به آنتی‌بیوتیک

ویژگی دیگری که درمورد پروبیوتیک‌ها در نظر گرفته می شود مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک است که بررسی این مقاومت و یا حساسیت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، ایمنی پروبیوتیک‌ها را برای مصرف غذایی مشخص می‌کند(۲۵). مکانیسم اثر آنتی‌بیوتیک‌ها بر نابودی میکروارگانیسم‌ها متفاوت است. برخی آنتی‌بیوتیک‌ها مثل استرپتومایسین[4]، کلرامفنیکول[5]، تترا سایکلین[6]، اریترومایسین از سنتز پروتئین و برخی دیگر مثل ریفامپیسین[7]، کو تری ماکسازول[8]، مترونیدازول[9] از ساخت mRNA جلوگیری می‌کنند و برخی مانند آمپیسیلین، ونکومایسین و پنیسیلین جی[10] دیواره سلولی باکتری را تخریب می‌کنند. آنتی بیوتیک‌های گروه بتا لاکتام مانند پنیسیلین و سفالوسپورین[11] نفوذپذیری سلول را تحت تاثیر قرار داده و منجر به تخریب دیواره می‌شوند(۲۶). در رابطه با پروبیوتیک‌ها مقاومت به ونکومایسین حائز اهمیت است زیرا این آنتی بیوتیک در برابر عفونت‌های حاد ناشی از پاتوژن‌های مقاوم به داروهای ترکیبی، عملکرد ویژه‌ای دارد(۱۰). بنابر مطالعه چارتری و همکاران *لاکتوباسیلوس*ها با سنتز پپتیدوگلیکان تغییر یافته نوعی مقاومت به ونکومایسین پیدا می‌کنند(۲۷). ماتور و سینک نشان دادند *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از سبزیجات تخمیری به اریترومایسین و تترا سایکلین مقاومت داشتند(۲۸). جروجیوا و همکاران مقاومت *لاکتوباسیلوس برویس* را در برابر کاناماسین و کلیندامایسین[12] بررسی کرده و نشان دادند *لاکتوباسیلوس*ها به طور کلی نسبت به ترکیبات آمینوگلوکوزیدی مقاومت دارند که علت آن تجزیه آنزیمی و موتاسیون و تغییرات ریبوزومی می‌باشد که موجب تغییر در نفوذپذیری غشای سلول می‌شود(۲۵, ۲۹).

خاصیت ضد میکروبی

یکی از مهمترین ویژگی‌های پروبیوتیک‌ها تولید ترکیباتی مانند اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و باکتریوسین‌ها می‌باشد که منجر به ایجاد خاصیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌ها می شود. همچنین با تولید اسیدهای آلی (لاکتیک و استیک اسید) خاصیت ضدمیکروبی افزایش می‌یابد. وجود باکتریوسین‌ها معمولا از رشد پاتوژن‌های گرم مثبت جلوگیری می‌کند و در مورد انواع گرم منفی دلیل اصلی خاصیت ضدمیکروبی مربوط به حضور اسیدهای چرب هیدروکسی، اسیدهای آلی و هیدروژن پراکسید می‌باشد. بنابراین در مورد *لاکتوباسیلوس*ها دلیل عمده وجود خاصیت ضدمیکروبی تولید باکتریوسین می‌باشد ولی وجود ترکیباتی مثل هیدروژن پراکسید و اسیدهای آلی، اتانول و رقابت بر سر مواد مغذی نیز بی تاثیر نیست (۲۵, ۳۰). مطالعه میرک و همکاران نشان داد *لاکتوباسیلوس*ها در تنها شرایط فعال که توانایی تولید اسید و آب اکسیژنه را دارند، می‌توانند خاصیت ضدمیکروبی داشته باشند (۵). وسیعی و همکاران نشان دادند انتروسین‌های تولید شده توسط انتروکوکوس‌ها

[1] Bile Salt Hydrolase (BSH)
[2] Taurodeoxycholic acid hydrolase
[3] Taurocholic acid hydrolase
[4] Streptomycin
[5] Chloramphenicol
[6] Tetracycline
[7] Rifampicin
[8] Co-Trimoxazole
[9] Metronidazole
[10] Penicillin G
[11] Cephalosporin
[12] Clindamycin

www.SID.ir

Archive of SID

نوعی پپتید با بیشترین خاصیت ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های غذایی خصوصا *لیستریا مونوسایتوژنز*[1] بوده‌اند(۱۱). در سال ۲۰۰۰ توسط سوخه و همکاران اثر ضدمیکروبی باکتری‌های لاکتیک اسید جدا شده از حفره دهان علیه پاتوژن‌های مختلف بررسی شد و بیشترین خاصیت ضد میکروبی مربوط به *لاکتوباسیلوس*ها بود (۳۱). *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از کیمچی در پژوهش سان و همکاران علیه *اشریشیاکلی*[2]، *لیستریا مونوسایتوژنز* و *سالمونلا تافیموریوم* خاصیت ضدمیکروبی داشت (۲۱).

خاصیت هیدروفوبیسیتی

خاصیت آب‌گریزی در سلول های باکتریایی با چسبندگی سلول به سطح اپیتلیال روده رابطه مستقیم دارد. این ویژگی در میکروارگانیسم به دلیل وجود برخی ترکیبات در سطح سلول مانند پروتئین، پلی‌ساکارید و اسیدهای چرب می‌باشد. به این ترتیب اتصال میکروارگانیسم به سلول روده امکان پذیر می‌شود. خاصیت آب‌گریزی در ارگانیسم به خصوصیات فیزیکی و شیمیایی غشای سلول بستگی دارد. وجود ترکیبات پروتئینی، پلی‌ساکاریدی، تئیکوئیک اسیدها[3] و برخی از اسیدهای چرب باعث اتصال کووالانسی سلول به موکوز روده می‌شوند. تئیکوئیک اسید در سطح دیواره سلولی باکتری های اسید لاکتیک به شکل لیپوتئیکوئیک اسید وجود دارد که خاصیت پلی‌الکترولیتی دارد، همچنین وجود پیوند غیرکووالانسی لایه S پروتئینی[4] در *لاکتوباسیلوس*ها باعث ایجاد خاصیت آب‌گریزی در سلول می‌شود. در سال ۲۰۰۳ ویندرولا و رنهیمر متوسط درصد هیدروفوبیسیتی پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *رامنوسوس*[5] و *اسیدوفیلوس*[6] را به ترتیب ۱۵، ۱۷ و ۲۵ درصد گزارش کردند. در سال ۲۰۱۷ آرتی و همکاران درصد هیدروفوبیسیتی *لاکتوباسیلوس برویس* جدا شده از نوعی خوراک دریایی تخمیری را ۲۸ درصد اعلام کردند (۲۱, ۲۳, ۳۰).

آزمون چسبندگی

توانایی اتصال سلول باکتری به موکوز روده تحت عنوان چسبندگی نامیده می شود. در صورت آسیب دیدن به بافت اپیتلیال، احتمال چسبندگی سلول باکتری کمتر می‌شود. از باکتری‌های پروبیوتیک برای درمان آسیب‌های دستگاه گوارش استفاده شده و جایگزین فلور از دست رفته آن می‌شود و با اصلاح تعادل میکروبی داخل روده بافت آسیب دیده آن بهبود یافته و توانایی اتصال میکروارگانیسم‌ها به سطح سلول‌های روده افزایش می‌یابد. باکتری‌های پروبیوتیک با پاتوژن‌ها بر سر محل اتصال سلول‌های اپیتلیال رقابت می‌کنند، بنابراین بایستی درصد چسبندگی باکتری در حد استانداردی بالا باشد(۱۲, ۲۴, ۳۴). مشکلات مربوط به بررسی‌های بالینی (*in vivo*) آزمون چسبندگی موجب شد تا استفاده از مدل‌های شبیه سازی شده در مقیاس آزمایشگاهی (*in vitro*) رواج پیدا کند. به خصوص استفاده از توالی سلولی Caco-2 به منظور ارزیابی چسبندگی سویه‌های پروبیوتیکی به دستگاه گوارش، بسیار مورد توجه قرار گرفته است، زیرا در این شرایط خواص مورفولوژیکی و عملکردی سلول‌های روی سطح پرزهای روده کوچک به خوبی مشخص می‌شود. طبق گزارش پن و همکاران چنانچه میکروارگانیسم توانایی چسبندگی به موکوز دستگاه گوارش را داشته باشد و مانع از اتصال پاتوژن‌ها به دستگاه گوارش شود، می‌توان ادعا کرد که خاصیت پروبیوتیکی دارد(۷). اووهاند و همکاران درصد چسبندگی سه پاتوژن معروف غذایی *اشریشیاکلی*، *سالمونلا تافیموریوم* و *سالمونلا انتریتیدیس*[7] را به ترتیب ۱۳ و ۱/۴ و ۰/۵ درصد اعلام کردند و خاطر نشان کردند سویه‌هایی با بیش از این درصد چسبندگی پتانسیل پروبیوتیکی بالایی دارند(۱۲). هاندا و شمارما دو سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را به عنوان دو پروبیوتیک با بیشترین خاصیت چسبندگی معرفی کردند(۳۶). وجود پروتئازها بر میزان چسبندگی تاثیرگذار است و استفاده از

[1] *Listeria monocytogenes*
[2] *Escherichia coli*
[3] Teichoic acid
[4] S-Layer Protein
[5] *Lactobacillus rhamnosus*
[6] *Lactobacillus acidophilus*
[7] *Salmonella enteritidis*

www.SID.ir

Archive of SID

پروبیوتیک‌ها به شکل ترکیبی میزان چسبندگی را افزایش می‌دهد. بنابراین علت تاثیرگذاری بیشتر آن‌ها به این ترتیب مشخص می‌شود(۲۶). در مطالعه کلادو و همکاران میزان چسبندگی باکتری‌های اسید لاکتیک به Caco-2 بین ۹ تا ۲۰ درصد و در پژوهش ویدهیا ساگار و جیوارانتوم بیشترین میزان چسبندگی مربوط به *پدیوکوکوس پنتوسئوس*(۱۶در صد) گزارش شده است(۱۹, ۳۵). امروزه در سراسر جهان گرایش به تولید و مصرف مواد غذایی فراسودمند، افزایش چشمگیر یافته است، پیشرفت در درک ارتباط بین تغذیه و سلامتی برای دستیابی به سلامت مطلوب و کاهش خطر بیماری‌ها منجر به گسترش غذاهای فراسودمند شده است. *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 به دلیل دارا بودن پتانسیل پروبیوتیکی بالا نظیر مقاومت به اسید معده و نمک های صفراوی پس از ساکن شدن در روده کوچک می تواند با فلور میکروبی ترشح ترکیبات ضدمیکروبی و pH روده رقابت نماید و به تعادل میکروبی روده کمک کند. تولید اسید های آلی و کاهش مواد بازدارنده همچون باکتریوسین‌ها، پراکسیدهیدروژن و رقابت با پاتوژن‌ها در چسبیدن به دیواره روده از جمله ویژگی‌های مثبت *لاکتوباسیلوس برویس* سویه PML1 بوده که پتانسیل پروبیوتیکی آن را اثبات می کند و می توان از آن به عنوان نگهدارنده طبیعی و یا با بهینه سازی شرایط کشت در تولید ترکیبات زیست فعال در محصولات فراسودمند استفاده کرد.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر مستخرج از پایان نامه مصوب با کد ۳/۴۶۳۸۲ در دانشگاه فردوسی مشهد می‌باشد. نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد به دلیل مساعدت‌های مالی جهت اجرای این طرح پژوهشی صمیمانه تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

1. Axelsson L, Ahrné S. Lactic acid bacteria. InApplied microbial systematics 2000 (pp. 367-388). Springer, Dordrecht

2. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KA, Tsakalidou E, Nychas GJ, Panagou EZ, Tassou CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. Food microbiology. 2013 Apr 1;33(2):282-91.

3. Pan DD, Zeng XQ, Yan YT. Characterisation of Lactobacillus fermentum SM-7 isolated from koumiss, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2011 Feb;91(3):512-8.

4. D'souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. Bmj. 2002 Jun 8;324(7350):1361.

۵. سلطان دلال م.م, مبیه ه, میرک س. فعالیت ضد میکروبی سویه های لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس روتری بر اسینتوباکتر بومانی جدا شده از عفونت های بیمارستانی. مجله علوم پزشکی شهرکرد، ۱۳۹۵.

6. LiPuma J, Spilker T, inventors; University of Michigan, assignee. Method for Bacterial Species Identification and Typing. United States patent application US 14/752,391. 2015 Dec 31.

7. Bao Y, Zhang Y, Zhang Y, Liu Y, Wang S, Dong X, Wang Y, Zhang H. Screening of potential probiotic properties of Lactobacillus fermentum isolated from traditional dairy products. Food Control. 2010 May 1;21(5):695-701.

8. Naidu AS, Bidlack WR, Clemens RA. Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). Critical reviews in food science and nutrition. 1999 Jan 1;39(1):13-26.

۹. وسیعی ع، طباطبایی ف، مرتضوی ع. جداسازی و شناسائی باکتری‌های اسید لاکتیک "ترخینه" با روش‌های مبتنی بر کشت و مولکولی و افتراق آنها با کمک تکنیکrep-PCR پایان نامه کارشناسی ارشد. ۱۳۹۲

۱۰. طباطبایی یزدی ف, وسیعی ع, علیزاده بهبهانی ب, مرتضوی س.ع. بررسی پتانسیل پروبیوتیکی باکتری های اسید لاکتیک جداشده از کیمچی تولید شده در ایران. مجله دانشگاه علوم پزشکی قم مرداد۱۳۹۴.

11. Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi SA, Noorbakhsh H. Diversity and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from horreh, a traditional Iranian

[1] *Pediococcus pentosaceus*

www.SID.ir

Archive of SID

23. Aarti C, Khusro A, Varghese R, Arasu MV, Agastian P, Al-Dhabi NA, Ilavenil S, Choi KC. In vitro studies on probiotic and antioxidant properties of Lactobacillus brevis سویه LAP2 isolated from Hentak, a fermented fish product of North-East India. LWT. 2017 Dec 1;86:438-46.

24. Manenzhe NJ, Potgieter N, van Ree T. Composition and antimicrobial activities of volatile components of Lippia javanica. Phytochemistry. 2004 Aug 1;65(16):2333-6.

25. Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, Danguleva A, Ivanova G, Karapetkov N, Rumyan N, Karaivanova E. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of Lactobacillus and Bifidobacterium spp. intended for use as starter and probiotic cultures. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2015 Jan 2;29(1):84-91.

26. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Grönlund MM, Isolauri E, Salminen SJ. Adhesion of probiotic micro-organisms to intestinal mucus. International Dairy Journal. 1999 Sep 1;9(9):623-30.

27. Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Gradient diffusion antibiotic susceptibility testing of potentially probiotic lactobacilli. Journal of Food Protection. 2001 Dec;64(12):2007-14.

28. Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. International journal of food microbiology. 2005 Dec 15;105(3):281-95.

29. Zahari, W.I.Y.W., 2015, November. Antimicrobial activities and antibiotic sensitivity of lactic acid bacteria (LAB) from fermented durian flesh. In *2015 Innovation & Commercialization of Medical Electronic Technology Conference (ICMET)* (pp. 105-110). IEEE.

30. Vinderola CG, Reinheimer JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research International. 2003 Jan 1;36(9-10):895-904.

31. Sookkhee S, Chulasiri M, Prachyabrued W. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. Journal of Applied Microbiology. 2001 Feb 5;90(2):172-9.

32. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Munoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. British journal of nutrition. 2013 Jan;109(S2):S35-50.

33. Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis. International journal of food microbiology. 2003 May 25;83(1):63-74.

34. Rönkä E, Malinen E, Saarela M, Rinta-Koski M, Aarnikunnas J, Palva A. Probiotic and milk technological properties of Lactobacillus brevis. International journal of food microbiology. 2003 May 25;83(1):63-74.

fermented food. Probiotics and antimicrobial proteins. 2018 Jun 1;10(2):258-68.

12. Yakabe T, Moore EL, Yokota S, Sui H, Nobuta Y, Fukao M, Palmer H, Yajima N. Safety assessment of Lactobacillus brevis KB290 as a probiotic strain. Food and chemical toxicology. 2009 Oct 1;47(10):2450-3.

13. Takeda S, Yamasaki K, Takeshita M, Kikuchi Y, TSEND-AYUSH C, Dashnyam B, Ahhmed AM, Kawahara S, Muguruma M. The investigation of probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from traditional Mongolian dairy products. Animal Science Journal. 2011 Aug 1;82(4):571-9.

14. Prasad J, Gill H, Smart J, Gopal PK. Selection and characterisation of Lactobacillus and Bifidobacterium strains for use as probiotics. International Dairy Journal. 1998 Dec 1;8(12):993-1002.

15. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. FEMS Microbiology Letters. 1998 Oct 1;167(2):185-9.

16. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. The American journal of clinical nutrition. 2001 Feb 1;73(2):365s-73s.

17. García-Ruiz A, de Llano DG, Esteban-Fernández A, Requena T, Bartolomé B, Moreno-Arribas MV. Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. Food microbiology. 2014 Dec 1;44:220-5.

18. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 سویهs and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. International journal of food microbiology. 2001 Aug 5;67(3):207-16.

19. Collado MC, Jalonen L, Meriluoto J, Salminen S. Protection mechanism of probiotic combination against human pathogens: in vitro adhesion to human intestinal mucus. Asia Pacific journal of clinical nutrition. 2006 Dec 1;15(4).

20. Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science & Technology. 2004 Feb 1;15(2):67-78.

21. Son SH, Jeon HL, Yang SJ, Lee NK, Paik HD. In vitro characterization of Lactobacillus brevis KU15006, an isolate from kimchi, reveals anti-adhesion activity against foodborne pathogens and antidiabetic properties. Microbial pathogenesis. 2017 Nov 1;112:135-41.

22. Hyronimus B, Le Marrec C, Sassi AH, Deschamps A. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. International journal of food microbiology. 2000 Nov 1;61(2-3):193-7.

www.SID.ir

Archive of SID

35. Vidhyasagar V, Jeevaratnam K. Evaluation of Pediococcus pentosaceus strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. Journal of Functional Foods. 2013 Jan 1;5(1):235-43.

36. Handa S, Sharma N. In vitro study of probiotic properties of Lactobacillus plantarum F22 isolated from chhang–A traditional fermented beverage of Himachal Pradesh, India. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. 2016 Jun 1;14(1):91-7.

37. Li XJ, Yue LY, Guan XF, Qiao SY. The adhesion of putative probiotic lactobacilli to cultured epithelial cells and porcine intestinal mucus. Journal of Applied microbiology. 2008 Apr;104(4):1082-91.

38. Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. Getting better with bifidobacteria. Journal of applied microbiology. 2005 Jun;98(6):1303-15.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus brevis* strain PML1 Based on the ability to adhesion to the epithelial cells of intestine

Fereshteh Falah, **Seyed Ali Mortazavi***, Farideh Tabatabaei Yazdi

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Abstract

Nowadays, the increase in diseases and the appearance of antibiotic-resistant bacteria has urged researchers to increase the nutritional health of society by applying new methods and benefiting from useful microorganisms, including probiotics. Therefore, the isolation and identification of beneficial microorganisms with probiotic properties has been important for increasing health among people. The most important probiotic bacteria are the genus *Lactobacillus*. In this study, *Lactobacillus brevis* strain PML1's probiotic properties have been evaluated. The tolerance of bile salts, antibiotic resistance, the ability to control pathogens, and the hydrophobicity properties of the strain have been studied. Then, in the complementary assay, the adhesion ability to Caco-2 cells, the survival in gastrointestinal simulated conditions are evaluated. The results show that the strain has a high potential for survival in bile salts of the intestine. The percentage of hydrophobicity of strain was 18/33%. Adhesion rates for Caco-2 cells were 13.8%, also *L. brevis* strain PML1 showed a high ability to prevent the pathogenicity of adhesion (35.5%). According to the results of the *L. brevis* strain PML1 has a relatively suitable probiotic potential. Therefore, it is recommended to use this strain as a probiotic supplement in fermentative cultivations or as a co-cultivation in the fermentation process of various foods.

Keywords: Adhesion, Caco-2, *Lactobacillus brevis*, Probiotic potential, Tarkhineh.

* morteza@um.ac.ir

www.SID.ir