Archive of SID

فصلنامه علوم زیستی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان
شماره پیاپی ۱۱، جلد ۴، شماره ۴، پاییز ۸۹، صفحه ۱۱ تا صفحه ۱۶

بررسی توانایی اتصال لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی تخمیری سنتی به لاین سلولی CaCO۲ با دو روش کشت و رنگ‌آمیزی

مریم تاج‌آبادی‌ابراهیمی[۱]، میترا حیدری‌نصرآبادی[۲]، پروانه جعفری[۳]، مهسا دمشقیان[۴]

۱- استادیار گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی. Ebrahimi_mt@yahoo.com
۲- استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند.
۳- استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک.
۴- کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی.

تاریخ دریافت:۸۹/۶/۶ تاریخ پذیرش:۸۹/۹/۲

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی توانایی اتصال لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران به سلول‌های اپی تلیال روده انسانی در شرایط *in vitro* و مقایسه آن با سویه تجاری La-۵ است. پتانسیل پروبیوتیکی این باکتری‌ها از نظر تحمل شرایط فیزیولوژیکی سیستم گوارش مثل مقاومت به اسید معده و املاح صفراوی، در شرایط آزمایشگاه به اثبات رسیده است. در این بررسی توانایی اتصال به سلول‌های کشت CaCO۲ در شرایط *in vitro* با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت سنجیده شد. نتایج نشان داد اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول‌های CaCO۲در هر دو روش رنگ آمیزی و کشت بسیار متغیر بود. در روش رنگ‌آمیزی سویه‌های Aa۱, Y۲l٦ و در روش کشت سویه‌های Y۲l٦, C٦l۲, A۱a۱, C٦c٤ اتصال مشابه سویه تجاری La-۵ را نشان دادند. این نتایج نشان داد که در بررسی توانایی اتصال باکتری‌ها به سلول‌های کشت CaCO۲ روش کشت از اطمینان بالاتری نسبت به روش رنگ آمیزی برخوردار است. از سوی دیگر احتمالا سویه‌های Y۲l٦ C٦l۲, A۱a۱, C٦c٤ جدا شده از پنیر و ماست سنتی توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند و بررسی‌ها تکمیلی *in vivo* و *in vivo* روی این سویه‌ها می‌تواند منجر به معرفی باکتری‌های پروبیوتیک بومی ایران که از نظر عملکرد قابل رقابت با سویه‌های تجاری هستند گردد.

کلید واژه: کلونیزاسیون، لاکتوباسیلوس، اتصال، لاین سلولی CaCO۲.

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها به تعداد معین ایجاد تاثیرات مفیدی مانند کاهش عفونت‌های گوارشی و اسهال‌های مزمن مسافرتی در مصرف کننده می‌نماید(۲،۵،۱۲). امروزه صاحبان صنایع غذایی توجه خاصی به تولید محصولات پروبیوتیک و ارائه آن در بازارهای جهانی نشان می‌دهند. مشتریان نیز به افزایش سطح سلامت خود توسط این محصولات توجه خاصی دارند. یکی از مهم‌ترین این محصولات شیر و فرآورده‌های پروبیوتیک لبنی می‌باشد. اگرچه به‌کارگیری این میکروارگانیسم‌ها در محصولات لبنی با مشکلاتی مثل ایجاد عطر و طعم نامطلوب، عدم تحمل شرایط اکولوژیکی محصول لبنی و کاهش تعداد باکتری پروبیوتیک در هنگام مصرف همراه است(۱،۷،۱۳). با توجه به روش عمل آوری محصولات لبنی در ایران انتظار می‌رود باکتری‌های پروبیوتیک در این محصولات وجود داشته باشند. در صورت جداسازی و شناسایی این

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری‌ها می‌توان با انجام تست‌های لازمه ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه‌های جداسازی شده را بررسی و اثبات و از آن‌ها در تولید محصولات غذایی پروبیوتیک استفاده نمود. از آن جا که این باکتری‌ها از منابع لبنی جدا شده‌اند، به‌کارگیری آن‌ها در محصولات لبنی صنعتی با مشکلات کمتری مواجه است(۱،۶). از این‌رو جداسازی، شناسایی و کاربرد باکتری‌های پروبیوتیک از محصولات لبنی سنتی می تواند راه‌کار مناسب در جهت ارائه محصولات پروبیوتیک سنتی ایران و سویه‌های پروبیوتیک بومی با ویژگی‌های عملکردی ویژه 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 این‌رو مقاومت در برابر شرایط اسیدی و املاح صفراوی از ویژگی‌های اساسی جهت انتخاب باکتری پروبیوتیک هست. اگرچه شرط لازم کلونیزاسیون باکتری پروبیوتیک در روده توانایی اتصال این باکتری‌ها به سلول‌های پوشش لوله گوارش است(۶،۷،۱۱). هدف از این بررسی ارزیابی توانایی اتصال ۲۲ باکتری پروبیوتیک بومی ایران به سلول‌های پوششی لوله گوارش انسانی با استفاده از کشت سلولِ CaCO۲ و مقایسه آن با سویه تجاری La-۵ است. این باکتری‌ها از محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران جدا شده‌اند و در بررسی‌های قبلی ویژگی‌های پروبیوتیکی آن‌ها اعم مقاومت به اسید معده و املاح صفراوی، توانایی تولید ترکیبات ضد باکتری‌های بیماری‌زا و هم‌چنین کاهش کلسترول در شرایط آزمایشگاه به اثبات رسیده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و شرایط رشد

در این تحقیق از ۲۲ سویه لاکتوباسیل جدا شده از انواع محصولات لبنی تخمیری سنتی ایران مانند ماست، دوغ، پنیر و کشک استفاده شد. این باکتری‌ها توسط تاج‌آبادی و همکاران (۱۳۸۷، ۱۳۸۸) جداسازی و در کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی تهران واحد مرکزی در دمای ۸۰- سانتی‌گراد و زیر ۲۵٪ گلیسرول نگهداری شدند(۱۴،۱۵). سویه‌ها بر اساس نوع محصول لبنی، منطقه تهیه نمونه و مورفولوژی کلنی کد گذاری شدند (جدول۱). سویه تجاری La-۵ با همکاری آقای دکتر مفید و آقای دکتر جودکی (صنایع شیر ایران) تهیه گردید. قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط MRS broth در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند.

کشت سلول‌های روده

محیط CaCO۲ از موسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت Dulbeco`s modified eagle`s, minimal essential medium که شامل ۲۵میلی مولار گلوکز، ۲۰V/V٪ سرم گوساله غیر فعال با حرارت و ۱٪ اسیدهای آمینه غیر ضروری است در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۵٪ CO_2 اتمسفر کشت داده شدند. جهت بررسی اتصال ۱×۱۰^{۵} سلول CaCO۲ 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(۸).

اتصال باکتری‌های پروبیوتیک

به هر چاهک ۳۰۰میکرو لیتر بافر فسفات و لاکتوباسیل به غلظت $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$CFU/ml اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه گرم خانه گذاری همراه با تکان آرام سلول‌ها سه بار با بافر فسفات (pH=۷/۲) شستشو و باکتری‌های متصل نشده حذف شدند. در این بررسی شاهد مثبت سویه تجاری La-۵ و شاهد منفی چاهک بدون اضافه کردن لاکتوباسیل در نظر گرفته شد(۸،۹).

شمارش سلول‌های متصل به کشت سلول CaCO2

روش رنگ‌آمیزی

بعد از ۱۵ دقیقه تثبیت کردن در استون، لام‌ها (اسلاید چمبرها) با روش گرم رنگ آمیزی شدند. باکتری‌های پروبیوتیک با رنگ بنفش متصل به سلول‌های کشت در

www.SID.ir

Archive of SID

با بزرگنمایی ۱۰ زمینه میکروسکوپی به صورت تصادفی روئیت و شمارش شد(۸).

روش کشت در محیط اختصاصی

به هر چاهک ۳۰۰ میکرو لیتر تریپسین اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه به هر چاهک ۳۰ میکرو لیتر سرم گوساله ۱۰٪ جهت خنثی شدن تریپسین اضافه شد. در نهایت سلول‌های کنده شده در هر چاهک به ۹/۷ میلی لیتر بافر فسفات اضافه شد. بعد از تهیه سریال رقت تعداد سلول‌های باکتری زنده روی محیط اختصاصی MRS agar (محیط اختصاصی لاکتوباسیل‌ها) شمارش شد.

نتایج

اتصال باکتری‌های پروبیوتیک

اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول‌های کشت CaCO۲ بسیار متغیر بود. لاکتوباسیلوس‌های متصل به سلول‌های کشت با رنگ‌آمیزی گرم به صورت باسیل‌های میله‌ای بنفش مشاهده (شکل۱) و با بزرگنمایی ۱۰ زمینه میکروسکوپی شمارش شدند. سویه‌های,C۴i۲ K۱l۴, y۱m۴, Y۱l۴, Y۲n۲, Y۲f۳, Y۲b۱۰, Y۲c۴, C۵i۴ اتصال بسیار کمی به سلول‌های CaCO۲ (تعداد لاکتوباسیلوس‌های متصل در ۱۰ زمینه میکروسکوپی کمتر از ۲۰۰) را نشان دادند. سویه‌های ,D۳b۱ C۶l۲, Da۱ اتصال متوسطی به سلول‌های CaCO۲ (تعداد لاکتوباسیلوس‌های متصل در ۱۰ زمینه میکروسکوپی بین ۵۰۰-۲۰۰) نشان دادند.در حالی که سویه‌های C۶m۳, C۱d۲, C۲h۱, K۲l۳, C۶m۱, Y۲p۳, Y۲l۶, Aa۱, C۶c۴ بالاترین توانایی اتصال به سلول‌های CaCO۲ (تعداد لاکتوباسیلوس‌های متصل در ۱۰ زمینه میکروسکوپی بیشتر از ۵۰۰) را نشان دادند. اگرچه سویه‌های Aa۱, Y۲l۶ نتایج اتصال مشابه سویه تجاری La-۵ (تعداد لاکتوباسیلوس‌های متصل در ۱۰ زمینه میکروسکوپی بیشتر از ۱۰۰۰) را نشان دادند(جدول ۱).

روش کشت در محیط اختصاصی

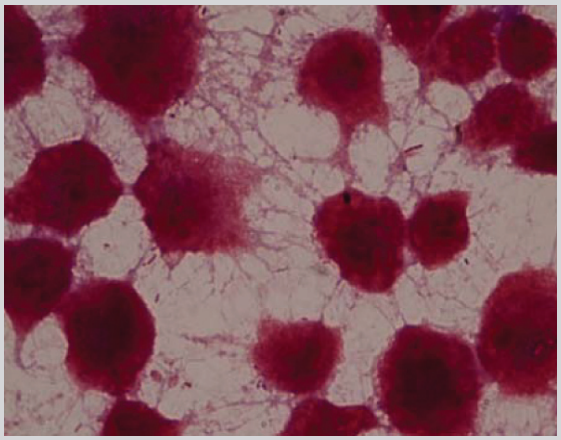
نتایج اتصال سویه‌های لاکتوباسیل به سلول‌های کشت CaCO۲ با روش کشت متفاوت از نتایج بدست آمده ار روش رنگ‌آمیزی بود. لاکتوباسیلوس‌های متصل به سلول‌های کشت با بعد از تهیه رقت روی محیط MRS agar شمارش شدند. سویه‌های C۴i۲, K۱l۴, D۱a۱ اتصال بسیار کمی به سلول‌های CaCO۲ (تعداد کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar کمتر از ۱۰۳ × ۲) را نشان دادند. سویه‌های Y۲b۱۰ C۵i۴, C۶m۳, C۱d۲, K۲l۳, C۶m۱, Y۲p۳, D۳b۱ اتصال متوسطی به سلول‌های CaCO۲ (تعداد کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar بین ۲×۱۰^{۳} تا ۵×۱۰^{۳} (نشان دادند. در حالی که سویه‌های C۲h۱, Y۱m۴, Y۱l۴, Y۲n۲, Y۲f۳, Y۲b۹, Y۲c۴, توانایی اتصال قوی به سلول‌های CaCO۲(تعداد کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar بین۱۰×۱۰^{۳} تا ۵×۱۰^{۳}) را نشان دادند. اگرچه سویه‌های Y۲l۶, C۶l۲, A۱a۱, C۶c۴نتایج اتصال مشابه سویه تجاری La-۵(تعداد کلنی‌های رشد کرده روی محیط MRS agar مساوی یا بالاتر از ۱×۱۰^{۴}) را نشان دادند(جدول۱).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- مقایسه میانگین و انحراف از معیار(SEM ± SD) لاکتوباسیلوس‌های شمارش شده با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت در محیط اختصاصی

ردیف	کد سویه	محیط کشتMRS agar	روش رنگ آمیزی
۱	C4i2	۵۰۰±۳۳	۸±۲
۲	C6m3	۴۵۰۰±۷۸	۷۵۳±۳۴
۳	C1d2	۵۰۰۰±۵۶	۶۰۴±۳۲
۴	C2h1	۷۰۰۰±۶۱	۵۰۶±۵۴
۵	K2l3	۷۵۰۰±۴۱	۹۷۴±۶۴
۶	K1l4	۵۰۰±۲۱	۲۰±۵
۷	Y1m4	۵۵۰۰±۳۹	۱۸۰±۳۶
۸	Y1l4	۷۵۰۰±۶۸	۱۲±۵
۹	Y2n2	۷۰۰۰±۸۷	۱۴±۷
۱۰	Y2f3	۶۰۰۰±۶۷	۲۱±۸
۱۱	Y2b9	۶۵۰۰±۴۸	۲۰۵±۵۴
۱۲	Y2b10	۵۰۰۰±۶۷	۱۸۹±۱۴
۱۳	Y2c4	۶۰۰۰±۵۶	۵±۲
۱۴	C5i4	۵۰۰۰±۴۵	۱۰±۶
۱۵	C6m1	۴۶۰۰±۳۸	۸۱۰±۴۷
۱۶	Y2p3	۳۵۰۰±۳۳	۷۵۳±۳۴
۱۷	Y2l6	۱۰۰۰۰±۶۲	۱۰۱۴±۶۲
۱۸	D3b1	۵۰۰۰±۴۵	۲۰۶±۵۴
۱۹	C6l2	۱۵۰۰۰±۴۵	۳۷۴±۴۴
۲۰	D1a1	۱۵۰۰±۶۷	۳۰۳±۵۷
۲۱	A1a1	۱۰۰۰۰±۳۵	۱۲۰۰±۹۶
۲۲	C6c4	۲۰۰۰۰±۸۱	۶۳۲±۵۹
۲۳	La-5	۲۲۰۰۰±۶۵	۱۲۰۴±۷۳



شکل ۱-لاکتوباسیل‌های متصل به سلول‌های $CaCO_3$

www.SID.ir

Archive of SID

بحث و نتیجه‌گیری

بررسی کلونیزاسیون باکتری‌ها در روده انسان و حیوان با محدودیت‌هایی مختلفی مواجه است. از این رو جهت بررسی توانایی کلونیزاسیون باکتری‌های پروبیوتیک در روده از سلول‌های کشت بافت و موکوس جدا شده از روده به عنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می‌شود. در این بررسی‌ها معمولا از لاین کشت سلولی CaCO۲ و HT-۲۹ و لاین سلولی تولید کننده موکوس HT-۲۰MTX استفاده می‌شود(۳). در مطالعه مشابه روی اتصال ۲۵ سویه لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از مدفوع انسان و حیوانات به سلول‌های کشت CaCO۲ مشخص گردید که ۷ سویه به خوبی به سلول‌های کشت متصل شده که اغلب از مدفوع انسان جدا شده بودند. در این بررسی از روش رنگ‌آمیزی گرم به‌منظور شمارش باکتری‌های متصل استفاده شد. و باکتری‌های متصل در ۲۰ زمینه میکروسکوپی شمارش و به صورت باکتری‌های متصل به ۱۰۰ سلول CaCO۲ گزارش شدند(۴). Matija و همکاران در سال (۲۰۰۳) توانایی اتصال دو سویه لاکتوباسیل گازری (Kv, LF۲۲۱) به سلول‌های کشت CaCO۲ را مورد ارزیابی قرار دادند. اگرچه در بررسی‌های قبلی توانایی بقاء در سیستم گوارشی این سویه‌ها به اثبات رسیده بود. نتایج نشان داده افزایش سلول‌های اضافه شده به هر چاهک تنها تا 10^9 باکتری سبب افزایش اتصال می‌گردد، چرا که سایت‌های اتصالی سلول‌های کشت اشباع یافته و میزان اتصال در pH اسیدی به طور چشمگیری افزایش می‌یابد(۱۰). نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد توانایی اتصال حتی در یک گونه از جنس لاکتوباسیلوس متغییر و وابسته به سویه است. این نتایج اهمیت بررسی توانایی اتصال به سلول‌های پوششی لوله گوارش در شرایط invitro به منظور انتخاب سویه‌های پروبیوتیک را تائید می‌کند. بررسی توانایی اتصال به سلول‌های کشت در شرایط in vitroپیش بینی مناسبی برای امکان اتصال در روده انسان در شرایط in vivo است (۱۲). اگرچه جهت حصول اطمینان بررسی‌های تکمیلی در شرایط in vitro و in vivo لازم است. درمقایسه ارزیابی نتایج بدست آمده در آزمون اتصال لاکتوباسیلوس‌های بومی ایران با دو روش رنگ‌آمیزی و کشت مشخص گردید که روش کشت از اطمینان بیشتری نسبت به روش رنگ‌آمیزی برخوردار است. هم چنین ارزیابی توانایی اتصال به سلول‌های کشت CaCO۲ در شرایط in vitro نشان داد احتمالا سویه‌های C۶l۲, A۱a۱, C۶c۴, Y۲l۶ جدا شده از پنیر و ماست سنتی توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند. این سویه‌ها گزینه‌های مناسبی جهت بررسی‌های تکمیلی *in vivo* هستند. بدیهی است در صورت تایید این نتایج در شرایط *in vivo* و ارزیابی‌های ایمنی این سویه‌ها به عنوان پروبیوتیک‌های بومی ایران معرفی خواهند شد.

منابع

1.Ambadoyiannis, G. (2005). Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. Food Biotechnology, 18(3); 307-325.

2.Araya, M. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, London (Ontario, Canada), 30; 1–11.

3.Bezkorovainy, A. (2001). Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. American Journal of Clinical Nutrition, 73(2); 399S.

4.Chauviere, G. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like CaCo۲ cells. Microbiology, 138(8); 1689.

5.Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. Journal of applied bacteriology, Oxford, 66(5); 365-378.

6.Gilliland, S.E., Walker, D.K. (1990).

www.SID.ir

Archive of SID

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(4); 905-911.

7.Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. American Journal of Clinical Nutrition, 73(2); 374-379.

8.Lee, Y.K. (2000). Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 66(9); 3692-3697.

9.Lee, Y.K. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and CaCo۲ cell surface by lactobacilli. Journal of medical microbiology, 52(10); 925-930.

10. Matija, B.B., Narat, M., Zori, M. (2003). Adhesion of Two *Lactobacillus gasseri* probiotic strains on CaCo۲ Cells. Food Technology Biotechnology, 41; 83-88.

11. Morelli, L. (2000). In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. Current Issues in Intestinal Microbiology, 1(2); 59-67.

12. Ouwehand, A.C., Salminen, S., Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek, 82(1); 279-289.

13. Saxelin, M. (1999). The technology of probiotics. Trends in Food Science & Technology, 10(12); 387-392.

14. Tajabady, E.M., Hejazi, M.A., Noohi, A. (2008). Study on probiotic properties of *Lactobacilluse* isolated from traditional dairy products of Lighvan. Quarterly Journal of Science, Tarbiat Moallem University, 7;941-952.

15. Tajabady, E.M. (2009). Study on antagonistic activity of acid and bile tolerance *Lactobacillus* isolated from traditional dairy products. Journal of Arak University of Medical Sciences, 12; 17-27.

www.SID.ir