Archive of SID

زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتو باسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بعنوان باکتری های پروبیوتیک شاخص در مدل شبیه‌سازی شده معده ای و روده ای

محبوبه سرابی جماب [۱]، پریا رهنما وثوق [۲]، مرضیه کته شمشیری [۳]، رضا کاراژیان [۴*]

۱- استادیار، گروه زیست فناوری مواد غذایی. پژوهشکده علوم و صنایع غذایی
۲- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، گرایش میکروبیولوژی مواد غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد
۳- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی
٤- مربی پژوهش. عضو گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی. پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی. جهاددانشگاهی مشهد

(تاریخ دریافت: ٩٤/٠٦/٢٤ تاریخ پذیرش: ٩٤/٠٨/٢٣)

چکیده

در این مطالعه زنده‌مانی باکتری‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و بیفیدوباکتریوم *بیفیدوم* در مدل شبیه‌سازی معده و روده بررسی شد. شمارش تعداد باکتری‌ها در معده با دو pH مختلف ۱/۵و۲/۵ در زمان‌های گرمخانه‌گذاری ۳۰، ٦٠، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. تعداد اولیه باکتری های مورد نظر ۳×۱۰^{۹} باکتری زنده در هر میلی‌لیتر بود پس از گذشت ۱ ساعت ازگرمخانه‌گذاری در محیط شبیه‌سازی شده معده، محتویات آن به محیط شبیه‌سازی شده روده با pH معادل ۷/۲۵ منتقل شد و در مدت زمان‌های ذکر شده،گرمخانه‌گذاری گردید و سپس تعداد باکتری‌ها شمارش شد. آنالیز آماری نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین زنده‌مانی پروبیوتیک‌های مورد آزمون وجود داشت، به‌طوری‌که *ب. باکتریوم بیفیدوم* قابلیت زیستی بالاتری در محیط معده ای و روده ای در مقایسه با دو گونه دیگر نشان داد. تعداد باکتری‌ها با گذشت هر نیم ساعت از زمان گرمخانه‌گذاری در محیط معده ای کاهش یافت. تفاوت معنی‌داری در سرعت کاهش پروبیوتیک‌ها در زمان‌های مختلف در محیط روده ای مشاهده نشد، به جز در زمان ۳۰ دقیقه که تعداد باکتری‌ها بالاتر بود. در بین پروبیوتیک‌های مورد آزمون *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* زنده‌مانی بالاتری در هر دو pH معده نشان داد. پس از گذشت ۲ ساعت از حضور باکتری در محیط روده ای، لگاریتم تعداد باکتری‌های زنده به ۲/۳۳ برای بیفیدوباکتریوم بیفیدوم ، ۱ برای *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و ۰/٦٥ برای *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* رسید.

کلید واژگان: *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، مدل شبیه سازی شده معده ای و روده ای.

* مسئول مکاتبات: reza_karazhyan2002@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

فلور میکروبی دستگاه گوارش انسان طی سالیان در اثر عواملی چون عادات غذایی نامنظم، استفاده زیاد از آنتی‌بیوتیک‌ها، استرس‌های شدید، عمل جراحی و توکسین‌های محیطی، دستخوش تغییرات اساسی می‌شود که می‌تواند اثر منفی بر سلامت بگذارد. برای جلوگیری از چنین رخدادی، اکوسیستم روده‌ای باید به‌وسیله مواد غذایی عملگرا مثل پروبیوتیک‌ها در یک حالت سالم حفظ شود [۱و۲]. فراورده‌های پروبیوتیک، فراورده‌های حاوی تعداد کافی از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک زنده می‌باشند که این میکروارگانیسم‌ها قادرند فلور میکروبی دستگاه گوارش را به‌وسیله سکنی‌گزیدن در بدن میزبان تغییر دهند و باعث بهبود سلامتی شوند. از میان پروبیوتیک‌های مختلف، پرکاربردترین آن‌ها برخی از باکتری-های خانواده اسید لاکتیک به‌ویژه گونه‌های جنس لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم می‌باشند، هرچند ساکارومایسس و انتروباکتریاسه هم به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳- ۵]. از جمله فواید پروبیوتیک‌ها می-توان به از بین بردن عدم تحمل لاکتوز، کاهش کلسترول و فشار خون، جلوگیری از التهاب، جلوگیری از ورم روده، از بین بردن عفونت روتاویروسی در کودکان، جلوگیری از زخم و سرطان روده، فعالیت ضد ویروسی و ضد آلرژی، کاهش نفخ، ممانعت از یبوست، ممانعت از عفونت دستگاه تناسلی، بهبود جذب کلسیم، بهبود بیماری‌های قلبی و بهبود بینایی اشاره کرد [٤، ٦- ١٣]. از جمله شرایطی که یک باکتری اسید لاکتیک می‌تواند به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرد، حضور به تعداد کافی در ماده غذایی و در هنگام مصرف، مقاومت در طی عبور از دستگاه گوارش، توانایی اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده در رقابت با پاتوژن‌ها، تثبیت فلور میکروبی روده و در نهایت ایجاد اثرات سلامتی بخش در میزبان می‌باشد [۱۳ و ١٤]. فعالیت و زنده‌ماندن پروبیوتیک‌ها به هنگام رسیدن به روده شرط لازم برای بروز اثرات دارویی است. به همین دلیل فدراسیون بین‌المللی لبنیات وجود حداقل $۱۰^{۷}$ باکتری پروبیوتیک زنده در هر گرم از فراورده‌های لبنی به هنگام مصرف را ضروری دانسته است. این درحالی‌است که در مطالعات مختلف حداقل دوز مورد نیاز برای بروز اثرات درمانی پروبیوتیک‌ها را $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$ cfu/ml بیان کرده‌اند [۱۵- ۱۷]. همه تعاریف انجام شده از پروبیوتیک ها بر زنده مانی این باکتری ها تأکید می کند. باکتری های پروبیوتیک نه تنها بایستی در طول مدت زمان ماندگاری غذا زنده بمانند بلکه باید در طول عبور از اسید معده، آنزیم ها و نمک های قلیایی صفرا زنده مانده و به محل فعالیت خود (روده) برسند [۱۸]. گونه های باکتریایی که به عنوان پروبیوتیک انتخاب می شوند بایستی قادر به حفظ حیات خود در مقابل اسید معده (pH=۱-٤)، نمک های صفراوی، آنزیم های لوله گوارش (نظیر لیزوزیم) متابولیت های سمی (مثل فنول ها که طی هضم غذا تولید می شوند)، باکتریوفاژها، آنتی بادی ها و شرایط بی هوازی روده باشند. پروبیوتیک ها نه تنها بایستی شرایط مذکور را تحمل کنند بلکه در صورت فراهم آمدن شرایط مطلوب باید قادر به تشکیل پرگنه در روده باشند. اثرات منفی pH بر فعالیت های میکروبی شامل اثر بر فعالیت های ویژه آنزیمی و انتقال ترکیبات مغذی به داخل سلول می باشد. نشان داده شده که اسید معده بر تعداد بیفیدوباکتری های روده بی تأثیر است ولی موجب افزایش تعداد Lactobacillus ها در رقابت با خانواده باکتریودس می شود [۱۹]. pH خیلی پایین معده همچنین حضور نمک‌های صفراوی در روده، دلیل اصلی کاهش ناگهانی در قابلیت زیستی سلول‌های انتقال یافته است، زیرا باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با گرم منفی‌ها حساسیت بیشتری به نمک‌های صفراوی روده دارند، از این رو بررسی زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در مسیر دستگاه گوارش از اهمیت زیادی برخوردار است [۱۹].

در تحقیق حاضر زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در مدل شبیه سازی شده معده و روده مورد بررسی قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱-کشت‌های باکتریایی، شرایط رشد و محیط کشت

کشت‌های پروبیوتیک لیوفلیزه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (la_5) از شرکت کریستین هانسن و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس GG* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش کلکسیون میکروبی خریداری شد. مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

۰/۵ گرم از پودر باکتریایی در ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت MRS براث (مرک آلمان) تلقیح و تا رسیدن به فاز لگاریتمی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. به منظور افزایش میزان رشد گونه *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* محیط کشت MRS براث توسط L-سیستئین هیدروکلراید (۰/۵ گرم در لیتر)، کلرید کلسیم و سدیم تیوگلیکولات غنی شد. پس از آن که کشت‌های مذکور به فاز لگاریتمی رشد خود رسید، ۲ بار با دور ۳٤۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفوژ گردید. در نهایت شستشوی سوسپانسیون باکتریایی با بافر فسفات انجام شد. شمارش تعداد باکتری‌ها توسط دو روش اندازه‌گیری جذب سوسپانسیون باکتریایی حاصل با محلول ۱۰ مک فارلند توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۰۰ نانومتر و روش شمارش مستقیم با کشت آن‌ها در محیط کشت MRS آگار و گرمخانه‌گذاری به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به صورت هوازی و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* در جار بی‌هوازی کشت داده شدند [۲۰، ۲۱، ۲۲، ۲۳ و ۲٤].

۲-۲-ارزیابی زنده‌مانی باکتری‌ها در محیط شبیه‌سازی معده

سه موقعیت مختلف در معده انسان در رابطه با pH شامل زمانی‌که غذایی وارد معده نشده (pH= ۱/۸)، غذا در حد نیاز وارد معده شده (pH=۲/۵) و غذا بیش از حد مورد نیاز وارد معده شده، تعریف گردیده است (pH=۳) [۲۲] . در این پژوهش ارزیابی قابلیت زیستی باکتری‌ها در دو موقعیت اول محیط معده (با دو pH ۱/۵ و ۲/۵) مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی که دارای ۳×۱۰^{۹} باکتری زنده در هر میلی‌لیتر بود به ۱۰ میلی‌لیتر محیط معده (کلرید سدیم ۰/۲ درصد و اسیدکلریدریک ۰/۰۸ مولار که با سود ۱ نرمال به pH مربوطه رسانده شد) بدون حضور آنزیم اضافه گردید و به مدت ۰، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس از گذشت زمان لازم ۱ میلی‌لیتر از محیط معده محتوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در محیط MRS آگار به صورت آمیخته کشت شد و۱ میلی‌لیتر از محیط معده محتوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* پس از کشت خطی در محیط MRS آگار در جار بی‌هوازی قرار داده شد و نهایتا تعداد باکتری‌ها با سه تکرار شمارش گردید [۱۸ و ۲۱].

۲-۳-ارزیابی زنده‌مانی باکتری‌ها پس از عبور از محیط شبیه‌سازی معده و روده

به منظور بررسی زنده‌مانی باکتری‌ها پس از عبور از محیط - شبیه‌سازی شده معده و روده، ۱ میلی‌لیتر از محیط معده حاوی هریک از باکتری‌های مورد آزمون پس از گذشت ٦۰ دقیقه از گرمخانه‌گذاری به ۹ میلی‌لیتر محیط روده حاوی KH_2PO_4 ۰/۰۵ مولار و ۰/٦ درصد نمک‌های صفراوی گاوی (Oxgall;70168 sigma) که با میکروفیلتر ۰/۲میکرومتر استریل شده و pH آن ۷/۲۵ بود، اضافه شد و در مدت زمان-های ۰، ۳۰، ٦۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شد. پس ازگذشت زمان‌های مورد نظر ۱ میلی لیتر از محیط روده محتوی سوسپانسیون باکتریایی مورد نظر به روش گفته شده در بند ۲-۲ با سه تکرار مورد شمارش قرار گرفت [۱۸ و ۲۱].

۳- آنالیز آماری

به منظور آنالیز داده‌ها از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱٦ استفاده شد. نتایج این تحقیق بر پایه طرح آماری کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل آنالیز شد. فاکتورهای لحاظ شده شامل نوع باکتری (سه سطح)، pH محیط معده (دو سطح) و زمان (پنج سطح) بود. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel-2007 استفاده گردید.

٤- نتایج و بحث

٤-۱- قابلیت زنده‌مانی نوع باکتری در محیط شبیه‌سازی شده معده

لگاریتم تعداد باکتری‌ها در هر میلی لیتر محیط معده برای *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به ترتیب برابر ٤/۵۵۷، ۳/۳۳٦ و۲/۷۳ و اختلاف آن‌ها ($p<۰/۰۵$) معنی‌دار بود (شکل۱). می-توان بیان کرد که به‌طورکلی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* نسبت به سایر پروبیوتیک‌های مورد آزمون در محیط معده مقاوم‌تر بوده است. در تحقیقی که روی گونه‌های *لاکتوباسیلوس*

www.SID.ir

Archive of SID

اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس هلوتیکوس، بیفیدوباکتریوم لانگوم و بیفیدوباکتریوم لاکتیس انجام شد، نتایج بر خلاف یافته‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر بود، به‌طوری‌که گونه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در مقایسه با سایر پروبیوتیک‌های مورد آزمون مقاومت بیشتری در محیط معده نشان داد [۲۱].

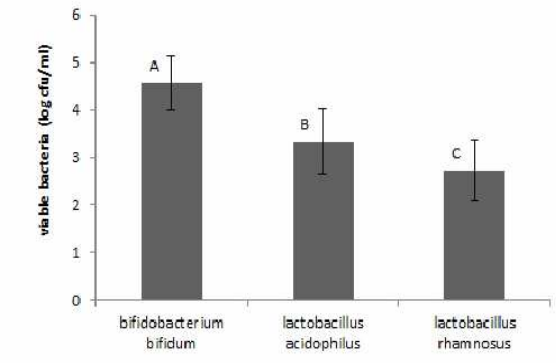

Fig 1A survival rate of probiotic bacteria in simulated gastric environment

٤-٢-اثر pH محیط معده بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در معده

با توجه به نتایج حاصل می‌توان دریافت که pH ۱/۵ محیط معده در سه نوع پروبیوتیک به‌کار رفته باعث کاهش عمده‌ای در جمعیت باکتریایی شد. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود در این pH لگاریتم تعداد باکتری‌های زنده از ۸ باکتری در هر میلی‌لیتر محیط معده به ۱/۸٤۸ باکتری زنده در هر میلی-لیتر تنزل یافت. Gbassi و همکاران (۲۰۱۱) در آزمایشی بر روی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، نشان دادند که باکتری مذکور در pH ۱/۸ محیط معده حتی در فرم کپسوله هم مقاومت نکرده و پس از ۲ ساعت غیرفعال می‌شود [۲۲]. این در حالی‌است که بر طبق مقالات موجود، در حضور مواد غذایی زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها نسبت به حالتی که پروبیوتیک به تنهایی در محیط شبیه‌سازی معده استفاده می‌شود، بالاتر است [۲۵].

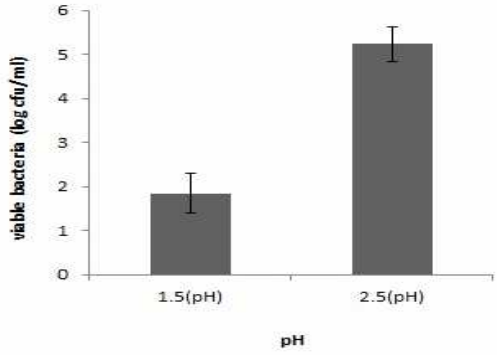

Fig 2 The effect of gastric pH environment on the survival of probiotic bacteria

٤-٣-اثر زمان بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک در معده

از آن‌جایی‌که اثر زمان ماندگاری باکتری در معده در مقایسه با زمان عبور آن از معده فاکتور مهمی در بررسی زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در معده می‌باشد، زمان‌های مختلف حضور باکتری در معده مورد بررسی قرار گرفتند [۲٦]. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها نشان داد که با افزایش مدت زمان حضور باکتری در معده تعداد باکتری‌های زنده کاهش یافت و این کاهش جمعیت باکتریایی در زمان‌های مختلف معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). پس از گذشت ۲ ساعت از حضور باکتری‌ها در معده جمعیت آن‌ها به مقدار ۱/۵۰۲ لگاریتم باکتری زنده در هر میلی‌لیتر محیط معده رسید که این کاهش نسبت به جمعیت اولیه آن‌ها بسیار چشمگیر بود (شکل۳). در تحقیقی که روی گونه‌های مختلف پروبیوتیک از جمله *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* توسط Jayalalitha و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد مشخص گردید که با افزایش زمان حضور باکتری در معده، قابلیت زنده مانی باکتری‌ها کاهش یافت. تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از ۱۱ سیکل لگاریتمی به حدود ٤ Log cfu/ml رسید [۲۱].

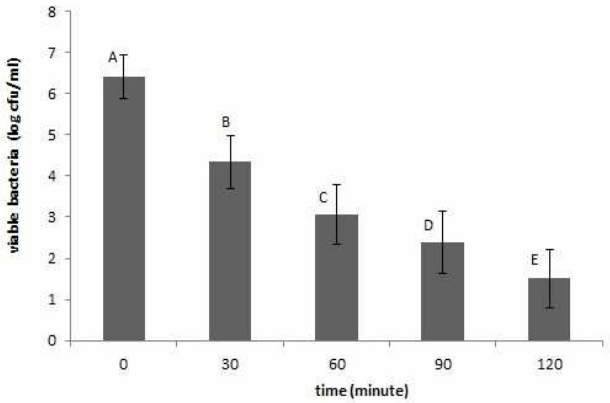

Fig 3 The effect time on the survival of probiotic bacteria

٤-٤-اثر متقابل نوع باکتری و pH محیط بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در معده

همانطور که در شکل ٤ مشاهده می شود در سه باکتری پروبیوتیک مورد آزمایش pH=۱/۵ باعث کاهش عمده‌ای در جمعیت باکتریایی شد که به‌ویژه این کاهش در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* آشکارتر بود. باکتری‌ها در pH=۲/۵ نسبت به

www.SID.ir

Archive of SID

زمانی‌که pH محیط معده ۱/۵ بود مقاومت بیشتری نشان دادند، به‌طوری‌که جمعیت آن‌ها در *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و رامنوسوس* به ترتیب به ٦/٣٨٤، ٤/٤٦٣ و ٤/٨٥٥ کاهش یافت (p<۰/۰۵). Favaro-Trinidale و Grasso (۲۰۰۳) گزارش دادند که در pH=۱ جمعیت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به صفر رسید [۲۷]. نتایج تحقیقات El-shafei و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که در pH=۳ باکتری *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* بالاترین زنده‌مانی را داشت و کمترین زنده‌مانی مربوط به باکتری *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* بود [۲۵].

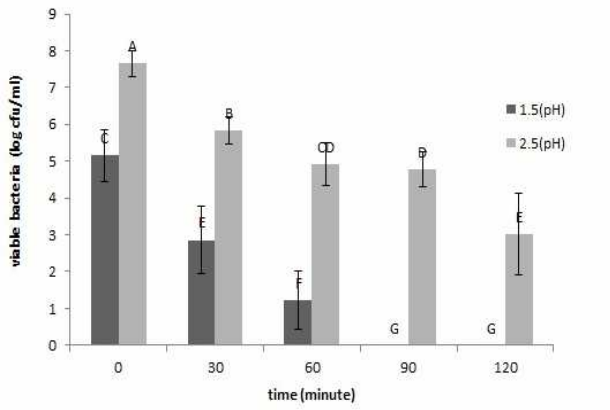

Fig 4 The effect bacteria and pH on the survival of probiotic bacteria

٤-٥-اثر متقابل نوع باکتری و زمان بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در معده

آنالیز داده‌ها نشان داد که جمعیت باکتریایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به محض ورود به معده در مقایسه با دو باکتری دیگر کاهش کمتری داشت، به‌طوری‌که جمعیت آن‌ها به ۷/۳۵۹ لگاریتم باکتری در هر میلی‌لیتر رسید (p<۰/۰۵). این در حالی‌است که دو گونه دیگر پس از ۲ ساعت حضور در معده نتوانستند زنده باقی بمانند (شکل۵). طبق نتایج Jayalalitha و همکاران (۲۰۱۲) پس از گذشت ۲ ساعت از حضور *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* در معده، جمعیت آن حدود ٤ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. آن‌ها همچنین بیان نمودند که شمار باکتری‌های *بیفیدوباکتریوم لانگوم و لاکتیس* پس از ۲ ساعت به ۱ تا ۳ واحد لگاریتمی رسید [۲۱].

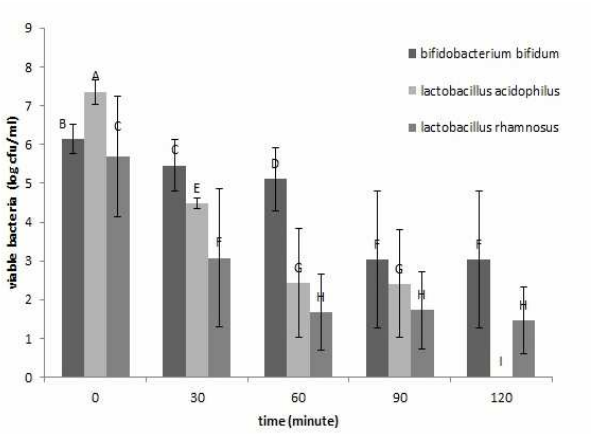

Fig 5 The effect bacteria and time on the survival of probiotic bacteria

٤-٦-اثر متقابل pH محیط و زمان بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها در معده

بر طبق یافته‌های موجود در شکل ٦، در pH ۱/۵ محیط معده پروبیوتیک‌ها تنها ۱ ساعت پس از ورود به معده، زنده باقی ماندند، به‌طوری‌که در این زمان جمعیت باکتریایی به ۱/۲۲۷ پایه لگاریتمی رسید. ولی در pH ۲/۵ معده پروبیوتیک‌ها قادر بودند به مدت ۲ ساعت زنده باقی بمانند و جمعیت آن‌ها پس از ۲ ساعت با جمعیت باکتریایی در pH ۱/۵ محیط معده پس از گذشت ۳۰ دقیقه، در سطح $P\leq$ ۰/۰۵ اختلاف معنی داری نداشت. یافته‌های El-shafei و همکاران (۲۰۱۰) نشان داد که در pH ۲ در مقایسه با pH ٤، با افزایش مدت زمان حضور باکتری در معده، زنده‌مانی باکتری کاهش بیشتری می‌یابد [٢٤].

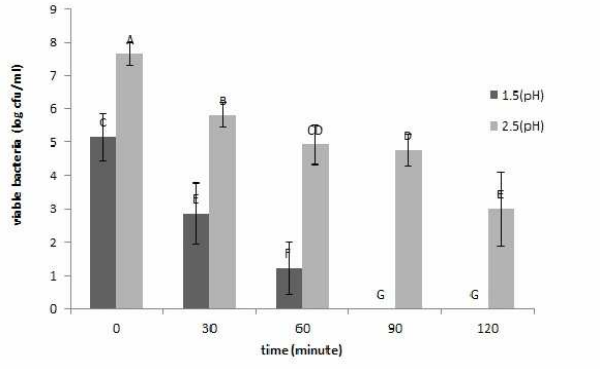

Fig 6 The effect pH and time on the survival of probiotic bacteria

٤-٧-قابلیت زنده‌مانی نوع باکتری پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، در روده نیز همانند معده بالاترین زنده‌مانی مربوط به باکتری *بیفیدوباکتریوم*

www.SID.ir

Archive of SID

بیفیدوم بود ($p<۰/۰۵$). تعداد باکتری مذکور از Log ۵/۱۱cfu/ml در زمان ۶۰ در معده به ۲/۱۸ Log cfu/ml در روده رسید. یعنی حدود ۳ سیکل لگاریتمی کاهش یافت، در حالی‌که سایر باکتری‌ها پس از ورود به روده ۱ سیکل لگاریتمی کاهش یافتند. البته باید توجه داشت که مقاومت باکتری‌ها درشرایط آزمایشگاهی در برابر صفرا گویای رفتار واقعی آن‌ها در دستگاه گوارش نیست، زیرا همانند سایر شوک‌های فیزیولوژیکی، شبیه‌سازی واقعی آن‌ها مشکل است. گزارش شده است که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* فعال‌ترین گونه باکتریایی در روده کوچک و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* فعالترین باکتری در روده بزرگ انسان می‌باشد [۱۹]. پژوهش Mokarram و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* قدرت بیشتری در تحمل صفرا در مقایسه با *رامنوسوس* داشت [۱۹]. نتایج مطالعه Sahadeva و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که زمانیکه محیط شبیه سازی فاقد نمک صفراوی بود، در مقایسه با زمانیکه میزان ۰/۳٪ و ۲٪ نمک صفراوی استفاده شده بود، رشد بیشتری از گونه های لاکتوباسیلوس مشاهده شد ولی باید توجه داشت که نمک صفراوی حتی در غلظت ۲٪ به طور کامل از رشد باکتری جلوگیری نکرد [۲۷].

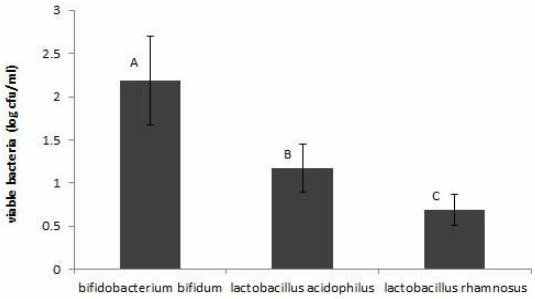

Fig 7 viability of probiotic bacteria after intestinal media

٤-٨-اثر pH محیط معده بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

آنالیز نتایج نشان داد باکتری‌هایی که از محیط معده با pH=۱/۵ وارد روده شدند، تعدادشان به صفر رسید. این در حالی‌است که باکتری‌هایی که از محیط معده با pH=۲/۵ وارد روده شدند، تعدادشان به ۲/۵ سیکل لگاریتمی رسید (شکل۸).

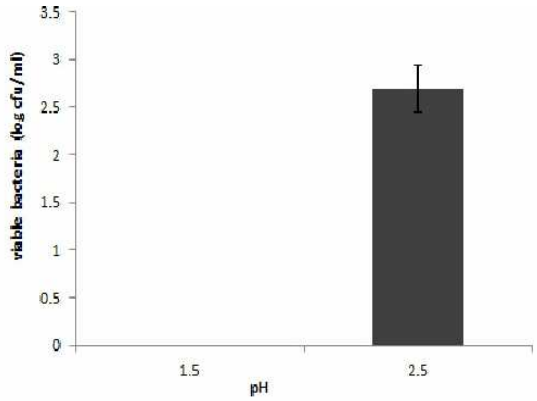

Fig 8 The effect pH on the survival of probiotic bacteria after intestinal media

٤-٩-اثر زمان بر قابلیت زنده‌مانی باکتری‌های پروبیوتیک پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

بیشترین تعداد باکتری‌های زنده در روده پس از ۳۰ دقیقه از ورود باکتری به آن بود و در سایر زمان‌ها تعداد باکتری‌ها اختلاف معنی‌داری باهم نداشت ($P \leq ۰/۰۵$). نتایج در شکل ۹ موجود است. این مطلب می‌تواند بدین صورت توجیه شود که تعدادی از باکتری‌های غیرفعال وارد شده به روده، پس از گذشت ۳۰ دقیقه دوباره اندکی فعال می‌شوند، ولی از آنجایی-که این میکروارگانیسم‌ها قادر به تحمل صفرا نمی‌باشند، تعدادشان مجدداً کاهش می‌یابد. همانطور که در مقالات بیان شده است، باکتری‌های گرم مثبت به اثرات زیان آور نمک‌های صفراوی حساس تر از باکتری‌های گرم منفی می‌باشند [۱۹]. همچنین ماتریکس غذایی برروی باکتریها نسبت به نمکهای صفراوی اثر حفاظتی داشته و به همین دلیل اگر باکتری همراه غذا در محیط روده بررسی شود مقاومت بیشتری به نمک صفراوی نشان می دهد [۱۹].

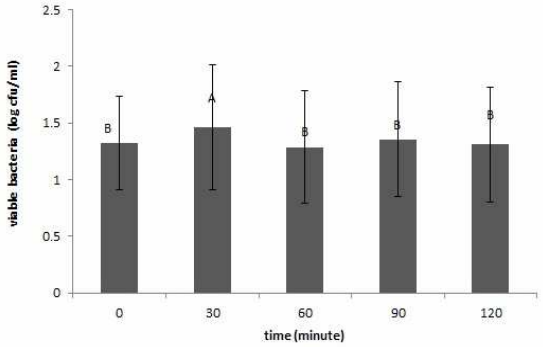

Fig 9 The effect time on the survival of probiotic bacteria after intestinal media

www.SID.ir

Archive of SID

٤-١٠-اثر متقابل نوع باکتری و pH محیط بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

باتوجه به نتایج می‌توان بیان کرد که تعداد هر سه نوع باکتری مورد آزمون که از معده‌ی با pH=١/٥ وارد روده شدند، به صفر رسید و بالاترین زنده‌مانی باکتری ورودی از معده با٢/٥ pH=مربوط به *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بود (شکل١٠). نتایج Jayalalitha و همکاران (٢٠١٢) نشان داد *بیفیدوباکتریوم لانگوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* درمقایسه با سایر گونه‌ها زنده‌مانی تقریبا یکسانی در روده داشتند و تعداد آن‌ها از Log ١١cfu/ml به ٧/٥ و ٦/٥ رسید [٢١].

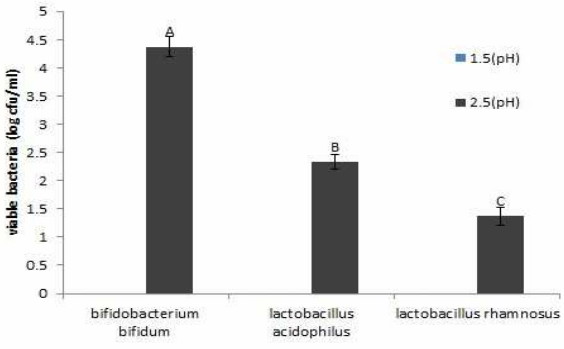

Fig 10 The effect pH and bacteria on the survival of probiotic bacteria after intestinal media

٤-١١-اثر متقابل نوع باکتری و زمان بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

همان‌طور که در شکل ١١، مشاهده می‌شود تعداد باکتری *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به محض ورود به روده در مقایسه با سایر زمان‌های حضور در روده کمترین مقدار بود ($P \leq$ ٠/٠٥). بیشترین تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* پس از ٣٠ دقیقه حضور در روده مشاهده شد و در مورد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بیش‌ترین تعداد باکتری به محض ورود باکتری به معده مشاهده گردید و در سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بین تعداد باکتری‌ها مشاهده نشد. بر طبق نتایج Mokarram و همکاران (٢٠٠٩) پس از گذشت ٢ ساعت از ورود باکتری در روده تعداد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به ترتیب به ٢/٣و Log cfu/ml ٢ رسید که از مقدار شمارش شده در این پژوهش بیش‌تر بود [١٨].

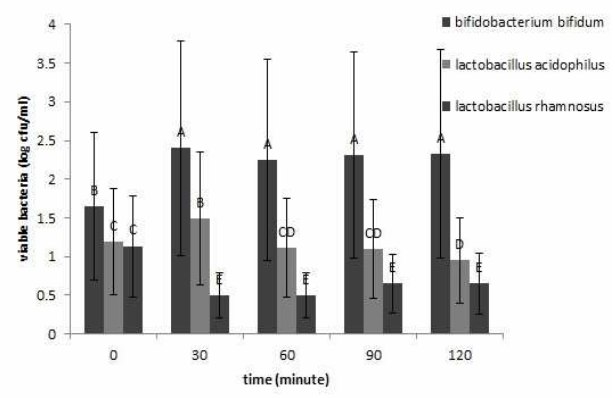

Fig 11 The effect bacteria and time on the survival of probiotic bacteria after intestinal media

٤-١٢-اثر متقابل pH محیط و زمان بر قابلیت زنده‌مانی پروبیوتیک‌ها پس از عبور از محیط شبیه‌سازی شده معده و روده

آن چه از نتایج موجود در شکل ١٢ حاصل می شود نشان دهنده این مطلب است که لگاریتم تعداد باکتری‌های ورودی به روده از معده‌ی با pH=١/٥ در کلیه زمان‌ها صفر بود ولی تعداد باکتری‌های ورودی به روده از معده‌ی با pH=٢/٥ در زمان ٣٠ دقیقه بیش‌ترین مقدار بود و در سایر زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بین تعداد باکتری‌ها مشاهده نشد ($P \leq$ ٠/٠٥).

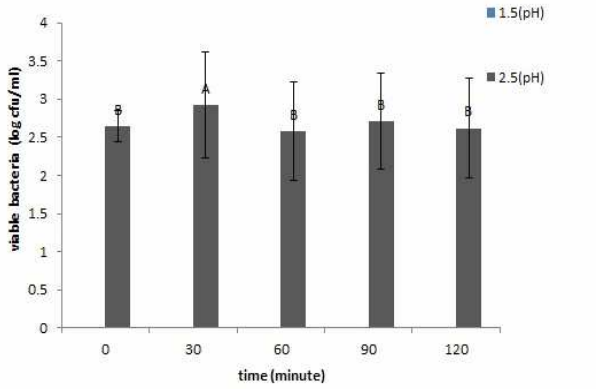

Fig 11 The effect pH and time on the survival of probiotic bacteria after intestinal media

٥-نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که در pH پایین تر معده (١/٥) در مقایسه با pH بالاتر (٢/٥)، زنده مانی باکتری‌های پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*،

www.SID.ir

Archive of SID

لاکتوباسیلوس رامنوسوس و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بسیار کمتر می‌باشد. همچنین جمعیت اولیه بالای میکروارگانیسم‌های به‌کاررفته در محصولات پروبیوتیک (حداقل 10^9 باکتری زنده در هر میلی‌لیتر) مورد نیاز می باشد، چرا که باکتری‌ها به شرایط اسیدی معده و نمک‌های صفراوی روده (شرایطی که در این پژوهش شاهد آن بودیم) حساس بوده و با عبور از دستگاه گوارش قابلیت زیستی خود را از دست می‌دهند. همانطور که نتایج نشان داد تعداد باکتری‌های ورودی به روده کاهش چشمگیری داشت و اگر قرار است این باکتریها در محصولات پروبیوتیک مورد استفاده قرار گیرند، با این تعداد کم باکتری نمی‌توان انتظار بروز اثرات مطلوب توسط آن ها را داشت. داده‌های حاصل از این آزمایش بر کپسولاسیون باکتری‌های پروبیوتیک مورد استفاده در مواد غذایی پیشنهاد می کند. ضمنا برای تایید نتایج آزمایش‌های انجام شده، انجام آزمایشات در شرایط بدن موجود زنده توصیه می‌شود.

٦- منابع

[1] Agarwal, R.K, 2008. Probiotics– the health friendly gut bacteria, Indian Pediatrics, 45 (12): 953-954.

[2] FAO/WHO Experts' Report. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria, Cordoba, Argentina, 1-4 October 2001. Available online: http://www.who.int/foodsafety/publications-/fs_management/ en/probiotics, accessedon 15 May 2012.

[3] Ishibashi, N., & Yamazaki, S, 2001. Probiotics and safety, American Journal of Clinical Nutrition, 73 (2): 465-470.

[4] Burns, A. J., & Rowland, I. R, 2000. Anti-Carcinogenicity of probiotics and prebiotics, Current Issues in Intestinal Microbiology, 1 (1): 13-24.

[5] Tannock, G.W, 2003. Probiotics: time for a dose of realism. Current Issues in Intestinal Microbiology, 4 (2): 33-42.

[6] Harish K., & Varghese T, 2006 . Probiotics based review, Calicut Medical Journal, 4: 211-223.

[7] Rijkers, G.T., Bengmark, S., Enck P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M., Kudo, S., Lenoir-Winkoop, I., Mercenier, A., Myllyuoma, E., Rabot, S., Rafter, J., Szajewska, H., Watze, B., Wells, J., Wolves, D., & Antoine, J.M, 2010, Guidelines for substantiation the evidence for beneficial effects of probiotics: Current status and recommendations for future research, Journal of Nutrition, 140:617-676.

[8] Thomas, D.W., & Greer, F.R, 2010. Probiotics and prebiotics in pediatrics, Pediatrics, 126 (6): 1217-1231.

[9] Saraf, K., Shashikanth, M.C., Priy, T., Sultana, N., & Chaitanya, N.C, 2010, Probiotics-do they have a role in medicine and dentistry, Journal of the Association of Physicians India, 90: 495-496.

[10] Masood, M.I., Qadir, M.I., Shirazi, J.H, & Khan, I.U, 2010, Beneficial effects of lactic acid bacteria on human beings, Critical Reviews of Microbiology, 37(1): 91-98.

[11] Barrett, J.S., Canale, K.E., Gearry, R.B., Irving, P.M., & Gibson, P.R, 2008. Probiotic effects on intestinal fermentation patterns in patients with irritable bowel syndrome, World Journal of Gastroenterology, 14(32): 5020-5024.

[12] Zubillaga, M., Weil, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro R, & Boccio, J, 2001, Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases, Nutrition Research, 21 (3): 569–579.

[13] Parvez, S., Malik, K.A., Kang, S.A., & Kim, H.Y, 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. Journal of Applied Microbiology, 100 (6): 1171-1185.

[14] Suokko, A. 2008, The stress responses of probiotic lactobacilli and a Bifidobacterium with special emphasis on CLP familiy proteins, Academic dissertation, Veterinary Medicine of the University of Helsinki, Finland.

[15] Corcoran, B.M., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Dockery, P., & Stanton C, 2006, Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei NFBC 338* under stressful conditions induced by drying. Applied and Environmental Microbiology, 72 (7): 5104-5107.

[16] Nazzaro, F., Fratianni, F., Orlando, P. and Coppola R, 2012, Biochemical Traits, Survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source, Pharmaceuticals, 5 (5): 481-492.

www.SID.ir

Archive of SID

[17] Ouwehand, A.C., & Salminen, S.J. 1998, The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria, International Dairy Journal, 8 (9):749-758.

[18] Mokarram, R.R., Mortazavi, S.A., Habibi Najafi, M.B., & Shahidi, F. 2009, The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice, Food Research International, 42: 1040-1045.

[19] Begley, M., Gahan, C.G.M., & Hill, C. 2005, The interaction between bacteria and bile, FEMS Microbiology Reviews, 29 (4): 625-651.

[20] Jayalalitha, V., Balasundaram, B., & Palanidorai, R, 2012, *In Vitro* assessment of microencapsulated probiotic beads, International Journal of Agriculture: Research and Review, 2 (1): 1-6.

[21] Gbassi, G.K., Vandamme,T., Yolou, F.S., & Marchioni, E, 2011, *In vitro* effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model, International Dairy Journal, 21: 97-102.

[22] Kailasapathy, K., & Chin, J.C, 2000, Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidibacerium* spp. Immunology and Cell Biology,78 (1): 80-88.

[23] Ding, W.K., & Shah, N.P, 2008, Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices, International Food Research Journal, 15 (2): 219-232.

[24] El-shafei, K., Tawfik, N.F., Nadia, Dabiza, M.A., Sharaf, O.M., & Effat, B.A, 2010, In vitro assessment of gastrointestinal viability of potentially probiotic Lactobacilli, Journal of American Science, 6 (11): 430-435.

[25] Rodes, L., Paul, A., Coussa-Charley, M., Al-Salami, H., Tomaro-Duchesneau, C., Fakhoury, M., & Prakash, S, 2011, Transit time affects the community stability of Lactobacillus and Bifidobacterium Species in an in vitro model of human colonic microbiotia, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology, 39 (6): 351–356.

[26] Favaro-Trindale, C.S., & Grosso, C.R.F, 2002, Microencapsulation of *L. acidophilus (La-05)* and *B. lactis (Bb-12)* and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile, Journal of Microencapsulation, 19 (4): 485-494.

[27] Sahadeva, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K. H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong. S.Y.W., & Chan, H.K, 2011, Survival of commercial probiotic strains to pH and bile. International Food Research Journal 18 (4): 1515-1522.

www.SID.ir

Archive of SID

Survivability of Probiotic Bacteria in Simulated Gastric and Intestinal model

Sarabi jamab, M. [1], Rahnama vosough, P. [2], kate shamdhiri, M. [3], Karazhyan, R. [4*]

1. Assistant Professor, Research Institute of Food Science and Technology (RIFST), Mashhad , Iran
2. Phd student. Ferdowsi University of Mashhad Faculty of Agriculture. Department of Food Science & Technology
3. Msc. Food science and technology
4. Phd. Member of scientific staff. Food quality and safety research department. Food science and technology research institute. Mashhad, Iran

((Received: 2015/09/14 Accepted: 2015/11/14)

In this study survivability of probiotics, *Lactobacilus acidophilus*, *Lactobacilus rhamnosus* and *Bifidobacterium bifidum* was assessed in simulated gastrointestinal tract. The count of probiotic bacteria was done in simulated gastric conditions (pH 1.5 and 2.5) at different incubation times (30, 60, 90 and 120 min) at 37°C. Initial number of live bacteria was 3×10^9 per ml. After incubation in the simulated gastric model (60 min), stomach contents were transferred to simulated intestinal model (pH 7.25) and incubated for mentioned times and the number of viable bacteria was enumerated. Statistical analysis revealed a highly significant difference between the probiotic bacteria, and *B. bifidum* showed higher survivability compared to *L. acidophilus* and *L. rhamnosus* in simulated gastric and intestinal model. The count of probiotic bacteria was decreased during every half an hour of incubation times in simulated gastric media. No difference was noticed in declining rate of probiotics in simulated intestinal media except in the first 30 minute which number of bacteria was higher in this period. *B. bifidum* showed better survivability in both pH of simulated gastric environments. After incubation in simulated intestinal model (pH 7.25, 2hrs) number of survived cells were 2.33 log cfu mL^{-1} for *B. bifidum*, 1 log cfu mL^{-1} for *L.acidophilus* and 0.65 for *L. rhamnosus* respectively.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium bifidum,* Simulated gastric and intestinal model**.**

* Corresponding Author E-Mail Address: reza_karazhyan2002@yahoo.com

www.SID.ir