JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره اول، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۰: ۳۱-۲۱

مقاله پژوهشی

اندازه گیری میزان آبگریزی، چسبندگی و کلونیزاسیون لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی

نرگس واسجی[۱] ، مهدیه ایرانمنش[۲]، ملیحه حاج قاسمی[۳]، محمد امیر کریمی ترشیزی[۴]، ناهید مژگانی*[۵]

۱- مربی پژوهشی، بخش پژوهش‌های بیوتکنولوژی، مؤسسه تحقیقات علوم دامی کشور - سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران

۲- دکترا علوم و صنایع غذایی-دانشگاه آزاد اسلامی-واحد علوم و تحقیقات تهران-ایران

۳- محقق بخش تولید و توسعه، شرکت فن آوری زیستی طبیعت گرا –کرج- ایران

۴- دانشیار گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس- تهران- ایران

۵- دانشیار بخش بیوتکنولوژی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۱۱/۱۶

چکیده

در این تحقیق توانایی و میزان چسبندگی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. جهت اجرای پروژه، از باکتری‌های اسید لاکتیک که قبلاً از منابع مختلف (لبنیات، شیر مادر و روده طیور) جدا شده بودند و بر اساس روش‌های فنوتیپی و توالی یابی 16SrRNA در حد جنس و خواص پروبیوتیکی آنها نیز تایید و در کلکسیون میکروبی موسسه رازی ثبت شده بودند، استفاده گردید. تمامی سویه‌ها از نظر تجمع باکتریایی بین میکروارگانیسم‌های همان سویه (اگریگشن)، تجمع باکتریایی بین سویه‌های متفاوت (کو اگریگشن) و فعالیت هیدروفوبیسیتی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس توانایی و میزان چسبندگی سویه‌ها به سلول‌های سرطانی Caco-2 مورد بررسی قرار گرفت. در کل ده سویه لاکتوباسیلوس ها شامل ۸ جدایه بومی (*لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۲)* ، *لاکتوباسیلوس کازئی (۱)*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۱)*، لاکتوباسیلوس سالیواریوس (۱)، لاکتوباسیلوس روتری (۱)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۱) و یک جدایه لاکتوباسیلوس رامنوسوس) و دو سویه استاندارد (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ATCC۴۳۵۵۶ و لاکتوباسیلوس رامنوسوس ۷۴۶۹ ATCC) برای این ازمایشات انتخاب شدند. فعالیت اگریگشن و کو اگریگشن، بعد از گذشت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت به طوری که *لاکتوباسیلوس کازئی* *RTCC*1296-3 بالاترین فعالیت اگریگشن و کو اگریگشن را به ترتیب به میزان ۸۴٪ و ۲۸٪ از خود نشان داد. تفاوتی چشمگیری در مقادیر هیدروفوبیسیته نیز مشاهده شد. این مقادیر بین ۴۳٪ و ۸۰٪ بودند که بیشترین مقدار هیدروفوبیسیتی برای *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* RTCC 1304 و کمترین مقدار برای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۲۹۰ RTCC* بدست آمد. تمام جدایه ها قابلیت اتصال به سلول های Caco-2 را داشته ، سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* *RTCC*1296-3 با ۳۵٪ و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم ۱۲۹۰ RTCC* با ۱۰٪ به ترتیب بیشترین و کمترین میزان اتصال را از خود نشان دادند. نتایج نشان دادند که بعضی از سویه‌های مورد بررسی در این مطالعه توانایی کلونیزاسیون در شرایط روده را دارند و پس از بررسی های بیشتر به ویژه در شرایط درون تنی ، می‌توانند بعنوان باکتری‌های پروبیوتیک مناسب معرفی شوند.

کلمات کلیدی: کلونیزاسیون، باکتری های اسید لاکتیک،آبگریزی، کو اگرگیشن، CaCo-2

* نویسنده مسئول: ناهید مژگانی

آدرس: دانشیار بخش بیوتکنولوژی ، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج-ایران. تلفن:۰۲۶-۳۴۵۷۰۰۳۸

پست الکترونیک: dnmoj@yahoo.com

مقدمه

پروبیوتیک‌ها، گروهی از میکروارگانیسم‌های زنده ای هستند که در صورت افزوده شدن به مواد غذایی و یا مصرف آنها به شکل مکمل، می‌توانند با ایجاد یک تعادل بیولوژیک در بدن، موجب بهبود سلامت میزبان(۱، ۱۲) و ایجاد تاثیرات مفیدی همچون کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی(۲)، داشتن فعالیت تخمیری، رشد و ماندگاری مناسب در محصولات غذایی، مقاومت در برابر فاژها، تنظیم فلور نرمال حفره‌های دهانی و روده و مهار باکتری‌های بیماری‌زا و مضر شوند(۱۹). باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه لاکتوباسیلوس‌ها (*Lactobacillus*) از متداول‌ترین باکتری‌های مورد استفاده به عنوان پروبیوتیک می‌باشند. گونه‌های مختلف پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس ها دارای خواص و ویژگی‌های ایمنی و بهداشتی قابل توجه و گسترده هستند(۲۰). از عوامل موثر برای تشخیص یک باکتری پروبیوتیک می توان به غیر بیماریزایی، عدم ارتباط با باکتری های مولد اسهال، توانایی در حفظ پایداری ژنتیکی و عدم توانایی در انتقال ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی و قابلیت چسبندگی (که اولین مرحله استقرار است) اشاره نمود(۱۷). یکی از مهترین اقدام جهت انتخاب یک سویه به عنوان پروبیوتیک تعیین قابلیت چسبندگی آن سویه به مخاط میزبان می باشد، تا علاوه بر پیشگیری از چسبندگی باکتری‌های بیماری زا، با ترشح برخی مواد بتواند محیط را برای رشد آن‌ها نامساعد سازد و بتواند با اتصال به سلول‌های اپیتلیال، مکان‌های هدف باکتری‌های پاتوژن را اشغال کرده و مانع از اتصال و تهاجم آن‌ها به دستگاه گوارش شوند(۱۱). همچنین باکتری های پروبیوتیک برای دستیابی و کلونیزاسیون در روده ملزم به عبور از pH اسیدی معده و املاح صفراوی روده می‌باشند. از این رو مقاومت در برابر اسید و املاح صفراوی خصوصیات اساسی جهت انتخاب باکتری پروبیوتیک هستند. ویژگی‌های کلونیزاسیون اکثرجدایه‌های پروبیوتیک نشان دهنده خاصیت سویه است(۱۵). قابلیت چسبندگی باکتری‌ها به جلوگیری از چسبیدن عامل بیماری‌زا، ترمیم موکوس صدمه دیده و طولانی کردن استقرار توسط باکتری کمک می کند(۴،۱۸). مشکلات موجود در مطالعه اتصال باکتری ها دربدن موجود زنده منجر به توسعه ی مدل های آزمایشگاهی مختلف برای بررسی چسبندگی در محیط آزمایشگاهی شده است که می توان از موکوس یا لایه سلولی متناسب با اندام هدف استفاده نمود(۱). به نظر می رسد اتواگریگشن (auto aggregation) گونه‌های پروبیوتیکی برای اتصال به سلول‌های اپیتلیال ضروری است و همچنین توانایی آن‌ها برای ایجاد کو اگریگشن (co- aggregation) با دیگر باکتری‌ها مثل پاتوژن‌ها، مانع از کلونیزاسیون آن‌ها می‌شود. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی سطح سلول مانند هیدروفوبیسیتی ممکن است بر اگریگشن و اتصال باکتری‌ها به سطوح مختلف تاثیر بگذارد. آزمایشات اگریگشن، اتو اگریگشن، کواگریگشن و آبگریزی سطحی می‌تواند به عنوان راه‌های ابتدایی شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک با خصوصیات چسبندگی و با ویژگی‌های مناسب برای اهداف تجاری استفاده شوند. در آزمایشات مربوط به چسبندگی، بررسی اتصال باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال همواره به عنوان یک مرحله‌ی مهم در انتخاب گونه پروبیوتیک مناسب در نظر گرفته شده است(۵). در بسیاری از این مطالعات از سلول‌های Caco-2 به منظور شبیه سازی شرایط داخلی بدن استفاده شده است. این سلول‌ها اولین بار از آدنوکارسینوم کولون در انسان

بدست آمده و آنزیم‌ها و حاشیه‌ی مسواکی آن مشابه سلول‌های گوارشی در بدن موجود زنده است. در مطالعات مختلف نشان داده شده است که میزان اتصال و پایداری لاکتوباسیل‌ها متفاوت است. انتخاب گونه‌ای از لاکتوباسیل‌ها یا بیفیدو باکتری‌ها که بیشترین اثر را بر روی سلامت انسان و حیوانات داشته باشد همیشه حائز اهمیت بوده است(۱۶). هدف از این بررسی ارزیابی ویژگی‌های کلونیزاسیون گونه‌های لاکتوباسیلوس با پتانسیل پروبیوتیکی در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های اسید لاکتیک پروبیوتیک و شرایط رشد

در این تحقیق باکتری‌های اسید لاکتیک (LAB) از مواد غذایی، روده طیور، مدفوع انسانی جداسازی و سویه‌های استاندارد ATCC به عنوان کنترل استفاده شدند (جدول ۱). دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، یک جدایه *لاکتوباسیلوس روتری* و *لاکتوباسیلووس فرمنتوم* از روده طیور، یک جدایه *لاکتوباسیلوس کازیی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از محصولات لبنی، یک جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* از مدفوع انسانی و دو نمونه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۴۳۵۵۶ ATCC و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* ۷۴۶۹ ATCC به عنوان کنترل مورد استفاده قرار گرفتند. تمامی جدایه‌ها مورد استفاده در مطالعات قبلی شناسایی و بعنوان پروبیوتیک در کلکسیون میکروبی موسسه رازی ثبت گردیده اند (مژگانی و همکاران ۱۳۹۶)

نمونه‌های لاکتوباسیلوس در محیط کشت MRS (De Man Rogosa Sharpe) مایع (Merck)کشت و در شرایط هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. باکتری پاتوژن (سالمونلا تیفی موریوم) مورد استفاده در این مطالعه نیز در محیط کشت BHI (Brain heart infusion) (Merck) تحت شرایط هوازی، در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد.

اندازه گیری میزان آبگریزی(Hydrophobicity assay)

بررسی میزان آبگریزی باکتری‌های مورد نظر با استفاده از زایلن(xylene) انجام شد. رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه بدست آمد. سپس رسوب بدست آمده به وسیله‌ی بافر فسفات پتاسیم با pH ۶/۵ شستشو داده شد و پس از انحلال مجدد در ۵ میلی لیتر از همین بافر، جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.(A_0). پس از اضافه کردن ۱ میلی لیتر زایلن به محلول و مخلوط کردن آن به مدت ۲ دقیقه، اجازه داده شد تا فازها از هم جدا شود. سپس فاز آبی رویی را جدا کرده جذب آن در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گیری شد.(A). در نهایت درصد هیدروفوبیسیتی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد(۲۱).

$$H\% = [(A_0 - A)/A0] \times 100$$

H: درصد آبگریزی

A0: جذب نوری قبل از مخلوط کردن

A1: جذب نوری بعد از مخلوط کردن

آزمون اگریگشن و کو اگریگشن (Auto-aggregation, Co-aggregation)

ابتدا باکتری‌های کشت داده شده، توسط سانتریفیوژ در دور ۵۰۰۰ و به مدت ۱۵ دقیقه رسوب داده شدند. سپس رسوب حاصل دو بار باPBS (phosphate buffered saline) شستشو داده شد و در نهایت رقت $CFU\ ml^{-1}$ $۱۰^{۸}$ از رسوب درPBS تهیه گردید. سوسپانسیون سلولی (۴ میلی لیتر) به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط و در نهایت تجمع خودکارپس از ۵ ساعت انکوبه کردن در

دمای ۲۵ درجه مورد بررسی قرار گرفت. در هر ساعت ۰/۱ میلی لیتر از مایع رویی برداشت شده و با ۳/۹ میلی لیتر از PBS مخلوط و جذب آن درطول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان درصد اتواگریگشن با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

Auto-aggregation (%)=1- (A1/A0)× ۱۰۰

A0: جذب به دست آمده در زمان t=0

A1: جذب به دست آمده از زمان های ۱،۲،۳،۴،۵ ساعت

اتصال باکتری‌ها با استفاده از رنگ آمیزی گرم و به وسیله ی میکروسکوپ نوری بررسی شد.

کو اگریگشن نمونه‌های ذکر شده، توسط پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم مورد بررسی قرار گرفت. بالا بودن سرعت و میزان تجمع بخصوص با باکتری‌های بیماری‌زا به عنوان مزیت پروبیوتیک تلقی می‌شود. رسوب باکتری‌ها با استفاده از سانتریفیوژ در ۵۰۰۰ دور به مدت ۱۵ دقیقه به دست آمد. پس از دوبار شستشوی رسوب با PBS، رقت 10^{8} CFU ml^{-1} از باکتری‌ها تهیه شد. سپس حجم‌های مساوی از باکتری پروبیوتیک و پاتوژن (ازهریک به میزان ۲ میلی لیتر) تهیه شد و به مدت ۱۵ ثانیه مخلوط و در دمای ۲۵ درجه قرار داده شدند. همانند مراحل قبل، جذب آن درطول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. در نهایت درصد کو اگریگشن با استفاده از معادله ی زیر محاسبه شد:

$$\text{Co-aggregation (\%)}=\frac{((Ax+Ay)/2)-A(x+y)}{Ax+Ay/2}\times 100$$

x و y: نشان دهنده ی جذب هریک از دو نمونه در لوله‌های کنترل

(x+y): جذب ترکیب دو باکتری با هم

همچنین اتصال دو باکتری پروبیوتیک و پاتوژن به یکدیگر از طریق رنگ آمیزی گرم نیز بررسی شد.

لوله‌های کنترل حاوی ۴ میلی لیتر از هریک از باکتری‌ها به تنهایی است(۲۱).

بررسی اتصال باکتری‌ها به سلول Caco-2

کشت سلول

سلول‌های سرطانی Caco-2 (Human colonic adenocarcinoma cell) از شرکت GIBCO آمریکا تهیه شد. مقدار یک میکروتیوب از سلول فریز شده Caco-2، داخل فلاسک حاوی محیط کشت سلولی DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) کشت داده شد. این محیط کشت با ۱۰ درصد FBS (Fetal bovine serum)، ۲میلی مول گلوتامین، ۱۰۰ واحد/ میلی لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میلی گرم / میلی لیتراستربتومایسین، غنی شده بود. فلاسک حاوی سلول در داخل انکوباتور ۳۷ درجه با ۵ درصد CO_2 به مدت ۷۲ ساعت گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از ۷۲ ساعت، سلول ها برای ادامه رشد، پاساژ (subculture) داده شدند(۳).

اتصال باکتری‌ها به سلول و محاسبه درصد جذب

پس از گذشت ۱۵ روز از زمان کشت اولیه سلول‌ها، محیط کشت درون چاهک‌ها دور ریخته شد و سلول‌ها دو بار با PBS شسته شدند. همچنین به هر چاهک، ۵۰۰ میکرولیترمحیط DMEM بدون آنتی بیوتیک اضافه شد. سپس ۱۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاوی 10^{8} باکتری (که با استفاده از تست مک فارلند و خواندن ODبدست آمده بود)، به هر چاهک منتقل گردید و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه و ۵ درصد CO2 ، گرمخانه‌گذاری شدند. پس از ۲ ساعت، محیط رویی

حاوی باکتری‌های اتصال نیافته توسط میکروپیپت برداشته شد.سلول‌ها ۴ بار و هر بار با ۱ میلی لیتر تریپسین- EDTA (۰/۰۲۵ درصد)، به ترتیب مربوط به شرکت‌های Fluka, Difco ، شسته شدند. سپس سلول ها به آرامی و به وسیله‌ی میکروپیپت از ته پلیت جدا شده و بلافاصله تریپسین آن سانتریفیوژ و جدا گردید و به جای آن ۱ میلی لیتر محیط کشت MRS مایع اضافه شد. در نهایت به وسیله ی PBS استریل رقت‌های سریالی از آن‌ها تهیه و بر روی پلیت آگار MRS کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شده سپس تعداد کلنی‌ها شمارش شدند(B1 cfu/ml). همچنین از رقت اولیه ی(10^8) باکتری‌های انتقال داده شده بر روی سلول نیز رقت‌هایی تهیه شد و بر روی پلیت MRS آگار برده شد (cfu/ml B0). درصد باکتری‌های متصل شده توسط این فرمول محاسبه شد(۳،۱۰).

Adhesion= (B1 /B0)*100%

B0:تعداد کلنی ها پس از کشت رقت اولیه‌ی باکتری‌های انتقال داده شده

B1: تعداد کلنی‌ها پس از۴۸-۲۴ ساعت کشت در پلیت آگارMRS

تحلیل آماری

نتایج آزمون با سه بار تکرار مورد بررسی قرار گرفت. جهت آنالیز آماری از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) استفاده شد. از روش دانکن نیز به منظور مقایسه نتایج و تعیین اختلاف معنی دار ($P > ۰/۰۵$) استفاده شد و نتایج به صورت میانگین±انحراف معیار گزارش شد. همچنین جهت ترسیم نمودار از Excel استفاده گردید.

نتایج

میزان آبدوستی، کو اگریگشن، اتواگریگیشن، اتصال به سلول Caco-2 و درصد جذب اتصال به سلول در ۱۰ باکتری جداشده از منابع مختلف مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- باکتری های اسید لاکتیک مورد استفاده در این تحقیق

ردیف	کد های انتخابی	باکتری های اسید لاکتیک	منبع	شماره ثبت
۱	TA0028	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	روده طیور	RTCC 1290
۲	TA0031	*لاکتوباسیلوس پلانتاروم*	روده طیور	RTCC 1290-1
۳	TA0014	*لاکتوباسیلوس روتری*	شیر مادر	RTCC 1306
۴	TA0179	*لاکتوباسیلوس فرمنتوم*	روده طیور	RTCC 1303
۵	TA0200	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	محصولات لبنی	RTCC 1299
۶	TA0021	*لاکتوباسیلوس کازئی*	محصولات لبنی	RTCC 1296-3
۷	TA0180	*لاکتوباسیلوس سالیواریوس*	شیر مادر	RTCC 1304
۸	TA0026	*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*	شیر مادر	RTCC 1293-1
۹	۱ATCC	*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*	ATCC	ATCC 43556
۱۰	۲ATCC	*لاکتوباسیلوس رامنوسوس*	ATCC	ATCC 7469

RTCC: Razi Type Culture Collection; ATCC: American Type Culture Collection

میزان آبدوستی در جدایه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (RTCC 1293-1) بیشترین میزان را داشت و البته با دو جدایه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* RTCC 1290 و RTCC 1290-1 تفاوت معنی دار نداشت (نمودار ۱). همچنین میزان آبدوستی در جدایه های *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* RTCC 1303 و *لاکتوباسیلوس کازیی* RTCC 1296-3 کمترین میزان و با سایر جدایه ها تفاوت معنی دار داشتند ($P> ۰/۰۵$). از طرف دیگر میزان هیدروفوبیستی بین جدایه لاکتوباسیلوس رامنوسس ATCC 7469، *لاکتوباسیلوس*

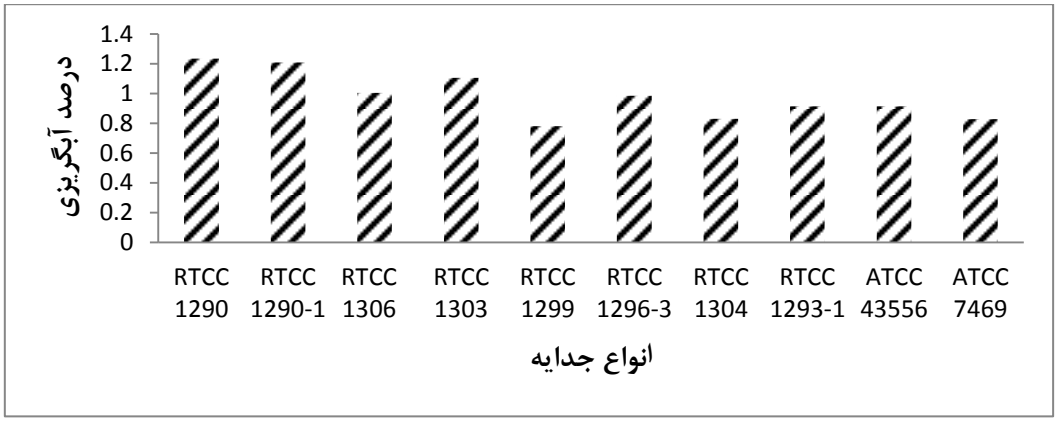
*روتری*1306 RTCC و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* 1299 RTCC تفاوت معنی داری وجود نداشت.

سایر ویژگی های جدایه های منتخب در نمودار ۲ نشان داده شده است. طبق نمودار تمامی جدایه ها دارای خاصیت کواگریگیشن با پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم را داشتند. فعالیت کو اگریگشن در بین اکثر جدایه ها تفاوت معنی داری نداشت و در *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1290 RTCC بیشترین و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* 1299 RTCC کمترین فعالیت را داشت.

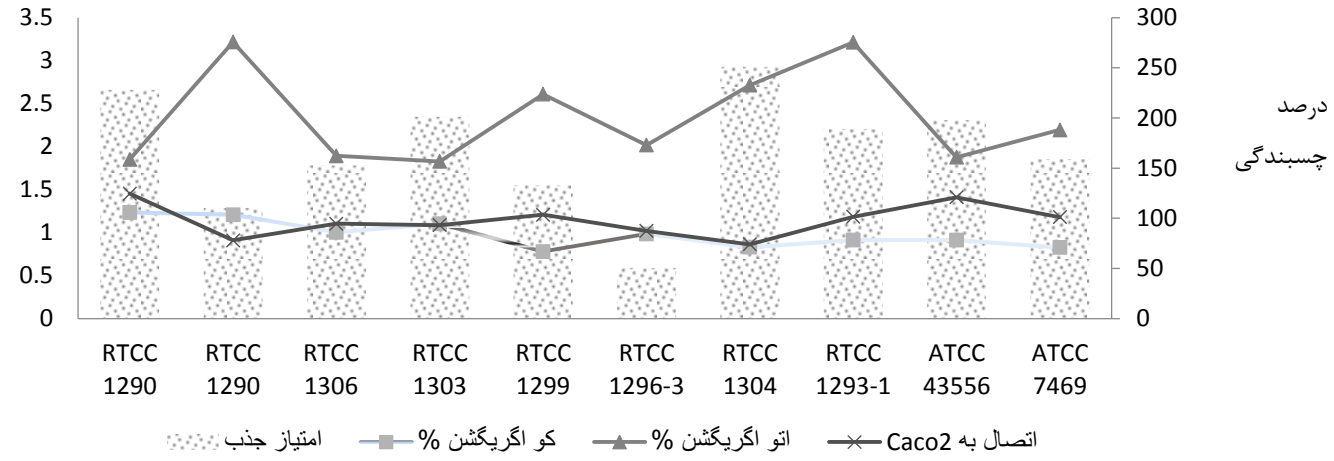
فعالیت اتواگریگیشن در *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* 1293-1 RTCC و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* RTCC 1290-1 بیشترین بود و با سایر جدایه ها تفاوت معنی داری داشتند (P> ۰/۰۵). همچنین کمترین فعالیت در *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* 1303 RTCC مشاهده شد که البته میزان فعالیت در این جدایه با جدایه های دیگر مانند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1290 RTCC، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* 43556 ATCC، *لاکتوباسیلوس روتری* 1306 RTCC و *لاکتوباسیلوس کازیی* 1296-3 RTCC تفاوت معنی داری نداشت (P< ۰/۰۵).

میزان اتصال به سلول Caco-2 در *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1290 RTCC بیشترین بود که البته بیشترین فعالیت کواگریگشن را نیز داشت و میزان اتصال در این جدایه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*43556 ATCC، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* 1299 RTCC، *لاکتوباسیلوس رامنوسس* 1293-1 RTCC و *لاکتوباسیلوس رامنوسس* 7469 ATCC تفاوت معنی داری نداشت و کمترین میزان اتصال در *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* 1304 RTCC مشاهده شد.

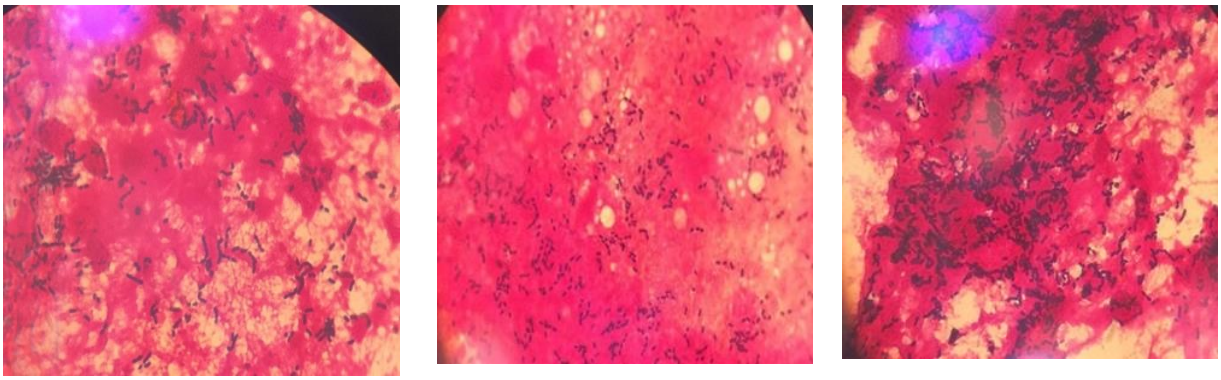
در شکل ۱ چسبندگی جدایه ها به سطح سلول نمایش داده شده است. درصد جذب باکتری های منتخب به سلول در دو جدایه *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* RTCC 1304 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 1290 RTCC بیشترین بود که البته جدایه اخیر دارای بیشترین میزان اتصال به سلولCaco-2 و فعالیت کو اگریگیشن بود، در مقابل *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* 1304 RTCC کمترین میزان اتصال به سلول Caco-2 را داشت. در *لاکتوباسیلوس کازئی* 1296-3 RTCC کمترین میزان جذب مشاهده شد که با سایر جدایه ها تفاوت معنی داری داشت، همچنین این جدایه دارای میزان کم اتصال به سلولCaco-2 را نیز داشت.(P>۰/۰۵).



نمودار ۱: درصد آبگریزی جدایه های اسید لاکتیک



نمودار ۲: درصد چسبندگی سویه های اسید لاکتیک با روش های اتو اگریگشن، کو اگریگشن،و اتصال به سلول‌هایCaco2



شکل ۱- میزان چسبندگی سویه‌های اسید لاکتیک به سلول‌های سرطانی Caco-2

بحث و نتیجه‌گیری

چسبندگی سلولی یک پروسه پیچیده بوده و شامل تماس بین غشای سلول باکتری و سطوح قابل دسترس می‌باشد. توانایی چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال و سطوح موکوس یا اتصال به باکتری‌های پاتوژن، مانع از اتصال پاتوژن‌ها به سطح روده شده و به مرور باعث حذف پاتوژن‌ها از دستگاه گوارش می گردد. این خاصیت به عنوان یک ویژگی مهم در بسیاری از باکتری‌های پروبیوتیک مطرح شده است(۷).

درگزارشات مختلف بر روی ترکیبات، ساختار و فاکتورهای مرتبط با چسبندگی باکتری‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده (۹ ، ۱۴). و موکوس(۱۳، ۷). ارائه شده است. در اکثر مواقع، توانایی تجمع باکتری‌ها مربوط به ویژگی‌های سلول‌های چسبنده می باشد. تجمع باکتریایی بین میکروارگانیسم‌های همان گونه (اتو اگریگشن) یا بین سویه های متفاوت (کو اگریگشن) در چندین نیچ اکولوژیکی بخصوص در روده انسان، که پروبیوتیک ها در آن‌جا فعال می باشند به میزان قابل

توجهی مهم است(۸). نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، که نمونه‌هایی با اتو اگریگشن بالا توانایی چسبندگی به سلول را نیز دارند. اما فقط در برخی نمونه‌ها افزایش اتو اگریگشن باعث افزایش در میزان چسبندگی به سلول‌های Caco-2 شد. گزارش شده که اتو اگریگشن و چسبندگی به هم وابسته اند(۸). در این مطالعه نیز تمامی نمونه‌ها که توانایی اتو اگریگشن را داشتند، توانایی کواگریگشن را نیز نشان دادند. میزان چسبندگی بیشتر وابسته به نوع سویه می‌باشد. همیشه نمونه‌های با بیشترین اتو اگریگشن تمایل به کو اگریگشن را نشان نمی دهند. اما نمونه‌های با کو اگریگشن بالا، اتو اگریگشن بالا هم نشان داده‌اند. در مطالعه بر روی بیفیدوباکترهای جدا شده از شیره ی معده و روده ی انسانی مشخص شد، باکتری‌هایی با درصد بالای اتو اگریگشن وهیدروفوبیسیتی، توانایی اتصال به سلول‌های caco-2 را دارند(۹). در مطالعاتی که Pérez و همکارانش انجام دادند، بیفیدوباکتریوم ها به دو دسته تقسیم شدند. باکتری‌هایی که توانایی اتصال به سلول را داشتند، که این باکتری ها اتو اگریگشن وهم اگریگشن را نشان دادند و باکتری هایی با عدم توانایی اتصال به سلول فاقد توانائی اتو اگریگشن وهم اگریگشن بودند. همچنین نشان دادند، وجود هیدروفوبیسیتی برای اتصال باکتری به سلول‌های شبیه انتروسیت،اتو اگریگشن ضروری است. باکتری‌های چسبنده بسیار هیدروفوبیسیتی خوبی داشتند و همچنین چسبندگی اندکی به پتانسیل سطحی داشتند. کاهش pH از ۷ به ۲ باعث افزایش بار منفی سطح سلول و در نهایت افزایش اتو اگریگشن می شود(۱۴،۶). همچنین دریافتند که با غیرفعال سازی حرارتی(heat-inactivated)هیدروفوبیسیتی افزایش می‌یابد. تمام سویه‌های پروبیوتیکی کو اگریگشن خوبی با پاتوژن‌ها نشان دادند، اما این نتایج کاملا به زمان و شرایط انکوباسیون و همچنین به نوع سویه وابسته بود(۸). در طی مطالعاتی نیز مشخص شد، سویه‌هایی که بالاترین سطح هیدروفوبیسیتی را دارند، مقدار چسبندگی به سلول‌های انتروسیت خوکی بیشتری را از خود نشان دادند(۲۲). نتایج حاصل از مطالعات تحقیق حاضرنشان داد، با افزایش میزان اتو اگریگشن ، هیدروفوبیسیتی نیز افزایش می‌یابد. نمونه‌هایی با هیدروفوبیسیتی بالا چسبندگی خوبی را نشان دادند. اما ارتباط آماری منطقی ببین مقدار اتو اگریگشن و چسبندگی یافت نشد. با این همه در نمونه‌های با اتو اگریگشن بالا معمولاً چسبندگی خوبی مشاهده شد. در مجموع چسبندگی نمونه‌های جدا شده از طیور و مدفوع انسانی نسبت به سایر نمونه‌ها بیشتر بود. برخی نمونه‌ها با اتو اگریگشن بالا و هیدروفوبیسیته مناسب نسبت به سایر باکتری‌ها، جذب چندانی به سلول‌های caco-2 نداشتند. بنابراین نتیجه می‌شود که تنها از طریق چسبندگی نمی‌توان باکتری پروبویتیک با ویژگی‌های مناسب را برگزید و باید سایر معیارها نیز سنجیده شود. Vlkova و همکاران نشان دادند، هیچ ارتباطی بین هیدروفوبیسیتی و توانایی اتو اگریگشن وجود ندارد. اما بیفیدوباکتریوم‌هایی با بیشترین میزان کواگریگشن بیشترین میزان اتو اگریگشن را نیز نشان دادند. همچنین اتصال بیفیدوباکتریوم‌ها به سلول‌های روده‌ای و توانایی کو اگریگشن در آن‌ها بسیار وابسته به نوع سویه است(۲۱و۲۲).

منابع

۱.تکلو، ز. گودرزونـد، م. خـدایی، ز. (۱۳۹۵). بررسـی قابلیـت چسبندگی باکتری پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی به لایه سـلولی Hep2 cell.. فصـلنامه علمـی پژوهشـی دنیـای میکروب هـا. مقالـه ۳۰، دوره ۹، شـماره ۱ (پیـاپی ۲۶)، ۷۱-۷۵.

۲. حیدری نصرآبادی، م . تـاج آبـادی ابراهیمـی، م. بهرامـی، ه. (۱۳۸۸). بررسی توانـایی کلونیزاسـیون لاکتوباسـیلهای جـدا شـده از پنیـر محلـی و اتصـال بـه سـلول هـای پوششـی لولـه گـوارش انسـان، لایـن سـلولی Caco-2. زیسـت شناسـی جانوری ، دوره ۱، شماره ۴ ،۳۱-۲۷.

3-Bahrami, B., Child MW, Macfarlane S, Macfarlane GT.(2011). Adherence and cytokine induction in Caco-2 cells by bacterial populations from a three-stage continuous-culture model of the large intestine. *Applied and Environmental Microbiology*.**77:**2934-42.

4- Campana,R ., van Hemert,S and Baffone,W.(2017). Strain-specific probiotic properties of lactic acid bacteria and their interference with human intestinal pathogens invasion. *Gut Pathogens*,**9:**12.

5- Celebioglu ,H.U and Svensson,B.(2018). Dietary Nutrients, Proteomes, and Adhesion of Probiotic Lactobacilli to Mucin and Host Epithelial Cells. *Microorganisms*. **6:** 90.

6-Chauvière G, Coconnier M-H ,Kerneis S, Darfeuille-Michaud A, Joly B, Servin AL. (1992). Competitive exclusion of diarrheagenic Escherichia coli (ETEC) from human enterocyte-like Caco-2 cells by heat-killed Lactobacillus. *FEMS Microbiology Letters*. **91:**213-217.

7-Collado., MC., Gueimonde, M., Sanz, Y., Salminen, S.(2005). Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*. **68:**2672-2678.

8-Collado, MC., Meriluoto, J., Salminen, S.(2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*. **226:**1065-73.

9-Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona,D.(2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. *Letters in Applied Microbiology*. **31:**438-42.

10-Duary, RK., Rajput ,YS., Batish, VK., Grover, S.(2011). Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. *The Indian journal of Medical Research*. **134:** 664-671.

11- Gabriela, K., Ivana, H., iveta, H. (2019). In vitro evaluation of adhesion capacity, hydrophobicity, and auto-aggregation of newly isolated potential probiotic strains. *Fermentation*. **54:**1-11.

12-Meurman, J., Stamatova, I.(2007). Probiotics: contributions to oral health. *Oral Diseases*. **13:** 443-451

13-Ouwehand ,AC., Salminen, S., Isolauri, E.(2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **82:**279-89.

14-Pérez, PF., Minnaard, Y., Disalvo, EA., De Antoni, GL.(1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. **64:**21-26.

15-Rohani, M., Papizadeh,M., Pourshafie,M.R. (2018). Correlation of Biofilm Formation and Caco-2 Cell Attachment Properties in Colonization Ability of Acid-Bile Resistant Fecal Lactobacillus Plantarum Isolates. *Journal of Medical Microbiology and Infectious Diseases*. **6:** 13-19.

16-Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D., Klaenhammer, T.R. (2018). Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Current Opinion in Biotechnology*. **49:** 207-216.

17-Shetty, Mamatha S.; Shetty, Yashaswini S. (2015). Probiotics and oral health: myth or reality? *Nitte University Journal of Health Science*. **5:** 40-42.

18-Twetman S, Stecksen-Blicks C.(2008). Probiotics and oral health effects in children. *International journal of Paediatric Dentistry*. **18**:3-10.

19-Vanderpool C, Yan F, Polk DB.(2008). Mechanisms of probiotic action:

implications for therapeutic applications in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases*. **14:**1585-1596.

20- Vlasova AN, Kandasamy S, Chattha KS, Rajashekara G, Saif LJ. (2016). Comparison of probiotic lactobacilli and bifidobacteria effects, immune responses and rotavirus vaccines and infection in different host species.. *Veterinary Immunology and Immunopathology***. 172:**72-84.

21-Vlková E, Rada V, Šmehilová M, Killer J.(2008). Auto-aggregation and co-aggregation ability in bifidobacteria and clostridia. *Folia Microbiologica* . **53:** 263-269.

22-Wadstroum T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. (1987). Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *Journal of Applied Bacteriology*. **62:**513-520.