بررسی توانایی کلونیزاسیون لاکتوباسیلهای جدا شده از پنیر محلی و اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش انسان ،لاین سلولی Caco2

میترا حیدری نصر آبادی *[1]، مریم تاج آبادی ابراهیمی [2]، هدی بهرامی [3]

چکیده

هدف این مطالعه ارزیابی توانایی کلونیزاسیون ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی در دستگاه گوارش است.از این رودر این بررسی مقاومت در برابرpH اسیدی، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های کشت Caco-2 در شرایط *in vitro* سنجیده شده است. نتایج نشان داد تیمار ۲ ساعته اسیدی منجر به کاهش ۰-٤ لگاریتمی جمعیت این سویه ها گردیدو ایزوله B1D2 کاملا به تیمار اسیدی مقاوم و هیچ کاهش جمعیتی نشان نداد. زمان تاخیر رشد سویه ها در حضور املاح صفراوی بین ۲۵ تا ۱۸۰ دقیقه متغیر بود و سویهی BH1 با زمان تاخیر رشد ٤/۸۰±۲۵ مقاومترین سویه لاکتوباسیل نسبت به املاح صفراوی بود. اتصال سویه های لاکتوباسیل به سلول های کشت Caco-2 بسیار متغیر بود. سویه GI2 کمترین اتصال و SL2 بالاترین اتصال را نشان دادند. ارزیابی مجموع این سه عامل در شرایط *in vitro* نشان داد احتمالا سویه های SM3, BD2, SM1, SL2 جدا شده از پنیر سنتی سمنان و بابل توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند.

کلمات کلیدی: کلونیزاسیون، لاکتوباسیلوس، اتصال، لاین سلولی Caco-2

مقدمه

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها به تعداد معین ایجاد تاثیرات مفیدی در مصرف کننده می‌کند. از خصوصیات عملکردی این میکروارگانیسم‌ها می‌توان به کاهش عفونت‌های گوارشی، کاهش اسهال‌های مزمن و مسافرتی اشاره کرد. بیشتر مطالعات در این زمینه روی لاکتوباسیل‌ها[1] و بیفیدوباکتریوم‌ها[2] صورت گرفته است [۱۵،۱۷].

سالهاست که اهمیت مصرف محصولات لبنی در سلامت انسان به اثبات رسیده است. اما امروزه مطالعات زیادی جهت افزودن باکتری های پروبیوتیک به محصولات لبنی و بررسی تاثیر این باکتری ها روی سلامت مصرف کننده صورت می گیرد. یکی از مشکلات بکار گیری باکتری های پروبیوتیک در محصولات لبنی عدم تحمل شرایط اکولوژیکی محصول و از بین رفتن باکتری پروبیوتیک در این محصولات می باشد. همچنین ایجاد طعم و عطر نامطلوب توسط باکتری پروبیوتیک در این محصولات مشکل دیگری است که تولید کنندگان محصولات لبنی با آن روبرو هستند [۱،۷].

ازاین‌رو جدا سازی باکتری پروبیوتیک از محصول لبنی نه تنها می‌تواند منجر به جداسازی باکتری پروبیوتیکی با خصوصیات ویژه شود، بلکه می‌تواند دیدگاه مناسبی جهت تولید انبوه محصولات لبنی سنتی که بطور طبیعی حاوی باکتری پروبیوتیک هستند به ما عرضه دارد. از سوی دیگر انتخاب محصول لبنی صنعتی مشابه منشاء جدا سازی پروبیوتیک می

*- نویسنده مسئول مکاتبات(heydari_nasr@yahoo.com)
۱- استادیار دانشکده زیست شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند
۲- استادیار دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی
۳- کارشناس دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران مرکزی

1- Lactobacilli
2-Bifidobacteria

تواند گامی مناسب برای کاهش مشکلات افزودن باکتری پروبیوتیک به محصول لبنی باشد.

مطالعه بقاء باکتری ها 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 اسید و املاح صفراوی خصوصیات اساسی جهت انتخاب باکتری پروبیوتیک هستند.از سوی دیگر شرط لازم کلونیزاسیون باکتری پروبیوتیک در روده توانایی اتصال این باکتری ها به سلول‌های پوشش لوله گوارش است [۱۳،٦].

هدف این بررسی ارزیابی توانایی کلونیزاسیون لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی در شرایط *in vitro* است. ازاین‌رو میزان تحمل به اسید، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های کشت Caco-2 ۷ سویه لاکتوباسیل بومی ایران مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

در این تحقیق از ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر سنتی سمنان، بابل و قم استفاده شد. این سویه ها بر اساس منطقه تهیه نمونه و مورفولوژی کلنی کد گذاری شدند (جدول۱). قبل از انجام هر آزمون این باکتری‌ها در محیط MRS broth در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ٢٤ ساعت کشت داده شدند.

بررسی میزان تحمل به اسید در سویه های ایزوله شده:

از کشت ٢٤ ساعته هر یک از سویه ها بعد از تهیه سریال رقت و تعیین جمعیت ۱ میلی لیتر به ۲۰ میلی لیتر بافر نمک فسفات اسیدی (pH=۲/۵) تلقیح شد بعد از ۲ ساعت گرمخانه گذاری، از هر نمونه سریال رقت تهیه گردید و برای بار دوم تعیین جمعیت صورت گرفت. نتایج جهت تعیین تاثیر محیط اسیدی در کاهش جمعیت سویه های جداسازی شده مقایسه شدند [٤].

بررسی میزان تحمل به نمک های صفراوی در سویه‌های ایزوله شده :

از کشت ٢٤ ساعته هر یک از سویه ها به میزان ۱٪ به محیط MRS broth حاوی ۰/۳٪ نمک‌های صفراوی (Oxgall) تلقیح شد. همچنین تلقیح مشابهی به محیط MRS broth فاقد نمک های صفراوی بعنوان شاهد صورت گرفت. بعد از تلقیح تا ۸ ساعت هر ۳۰ دقیقه و بعد از ٢٤ ساعت، میزان جذب نوری نمونه ها در طول موج ٦۰۰ نانومتر تعیین شد. تفاوت زمانی بر اساس دقیقه بین افزایش کدورت ۰/۳ واحدی در دو محیط مذکور بعنوان زمان تاخیر رشد تعیین شد [۵،٦].

کشت سلول‌های روده:

محیط Caco-2 از موسسه تحقیقاتی پاستور خریداری شد. این سلول‌ها در محیط کشت Dulbeco`s modified eagle`s, minimal essential medium که شامل ۲۵ mM گلوکز V/V ۲۰ ٪ سرم گوساله غیر فعال با حرارت و ۱٪ اسیدهای آمینه غیر ضروری است در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد و ۵٪ CO_2 اتمسفر کشت داده شدند. جهت بررسی اتصال ۱×۱۰^{۵} سلول Caco-2 در یک میلی لیتر محیط کشت سلول به هر چاهک اسلاید چمبر تلقیح شد. بعد از ٢٤ ساعت و تک لایه سلول‌ها با بافر فسفات (pH ۷/۲) شسته شدند [۱۰].

اتصال باکتری‌های پروبیوتیک:

به هر چاهک ۳۰۰ µl بافر فسفات و لاکتوباسیل به غلظت $۱۰^{۸}$-$۱۰^{۹}$CFU/ml اضافه شد. بعد از ۹۰ دقیقه گرمخانه گذاری همراه با تکان آرام سلول‌ها سه بار با بافر فسفات (۷/۲ pH) شستشو و باکتری‌های. متصل نشده حذف شدند.

شمارش سلول‌های متصل به کشت سلول Caco-2

بعد از ۱۵ دقیقه فیکس کردن در استون، لام‌ها (اسلاید چمبرها) با روش گرم رنگ آمیزی شدند. باکتری‌های پروبیوتیک با رنگ بنفش متصل به سلول های کشت در ۱۰ زمینه میکروسکوپی بصورت تصادفی روئیت و شمارش شدند [۹].

نتایج

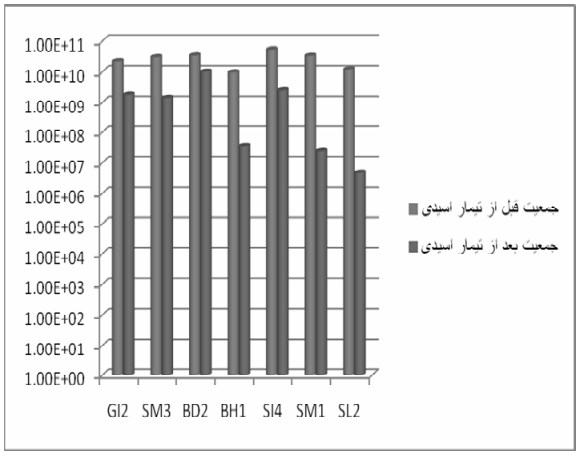
ارزیابی مجموع سه عامل مقاومت به شرایط اسیدی، املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های کشت Caco-2 در شرایط *in vitro* نشان داد احتمالا سویه های SM3, BD2, SM1, SL2 جدا شده از پنیر سنتی سمنان و بابل توانایی کلونیزاسیون در روده را دارند. این سویه ها گزینه های مناسبی جهت بررسی های تکمیلی *in vivo* هستند. بدیهی است در صورت تایید این نتایج در شرایط *in vivo* و ارزیابی های ایمنی این سویه ها به عنوان پروبیوتیک های بومی ایران معرفی خواهند شد.

جدول۱- مقایسه زمان تاخیر رشد و توانایی اتصال لاکتوباسیل های جدا شده از پنیر محلی

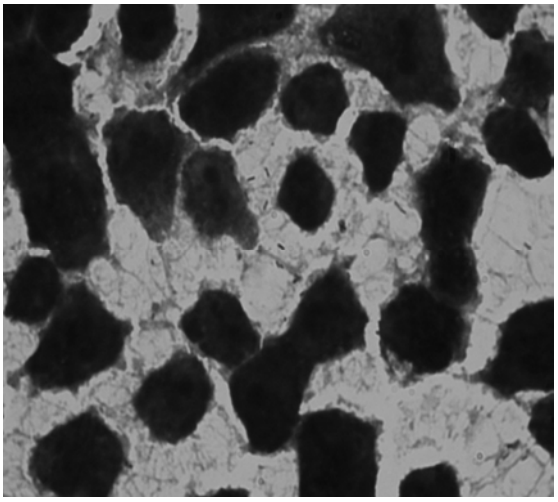
کد سویه	محل جداسازی	زمان تاخیر رشد[1] (D) دقیقه[2]	تعداد لاکتوباسیل متصل به ۱۰۰سلول کشت Caco-2
GI2	قم	۹۰±۵/۷۲	۵٤±۱۲
SM3	سمنان	۲۵±٤/۸۰	٤۵۳±۳٤
BD2	بابل	٦۰±٦/۸۰	۵۰٤±۳۲
BH1	بابل	۱۸۰±٦/۹۰	۷۱۳±۵٤
SI4	سمنان	۹۰±٤/۰۸	۵۰٤±٦٤
SM1	سمنان	٤۰±٤/۰۹	٤٦۰±٤۵
SL2	سمنان	٦۰±۱/٦۹	۱۵٤۰±۷٦

۱- زمان تاخیر رشد در حضور ۰/۳٪ املاح صفراوی

۲- نتایج بر اساس SD ± SEM گزارش و تمام آزمون ها سه بار تکرار شده است.



نمودار۱- میزان مقاومت به اسید در ۷ ایزوله لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی



شکل۱-لاکتوباسیل های متصل به سلول های Caco-2

بحث

بررسی مقاومت به اسید بر روی ۷ سویه لاکتوباسیل جدا شده از پنیر محلی نشان داد تیمار ۲ ساعته اسیدی منجر به کاهش ۰-٤ لگاریتمی جمعیت این ایزوله ها گردید(نمودار۱). سویه‌های GI2,SM3, BD2,SI4 تنها یک لگاریتم کاهش جمعیت نشان دادند. سویه BD2 کاملا به تیمار اسیدی مقاوم و هیچ کاهش جمعیتی نشان نداد.

زمان تاخیر رشد سویه ها در حضور املاح صفراوی بین ۲۵ تا ۱۸۰ دقیقه متغیر بود سویه های SM3 و BH1 با زمان تاخیر رشد ۴/۸۰±۲۵ و ۶/۹۰±۱۸۰به ترتیب مقاومترین و حساس ترین سویه لاکتوباسیل نسبت به املاح صفراوی بودند. نتایج این آزمون در (جدول۱) قید شده است. این بررسی نشان داد، توانایی مقاومت و تحمل املاح صفراوی، وابسته به گونه نیست و در بین سویه‌های یگ گونه متفاوت است. دامنه وسیع میزان مقاومت به املاح صفراوی و گوناگونی در میزان مقاومت سویه‌های مختلف که در این مطالعه مشاهده می شود دربسیاری از گزارشات ارائه شده توسط دیگر محققین، Succi (۲۰۰۵)، Liong (۲۰۰۵)، pennacchia (۲۰۰۴) و Jacobsen (۱۹۹۹) نیز قید گردیده است [۸، ۱۱، ۱۷، ۱۸].

این نتایج با نتایجی که Ortu در سال ۲۰۰۷ ازبررسی لاکتوباسیل های جداشده از شیر تخمیری ساردینا بدست آورد منطبق است. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات این پژوهشگر، سویه‌های جدا شده از فرآورده‌های لبنی سنتی نسبت به پروبیوتیک تجاری از مقاومت بالاتری برخوردار هستند [۱۴].

اتصال سویه های لاکتوباسیل به سلول های کشت Caco-2 بسیار متغیر بود. سویه GI2 کمترین اتصال و SL2 بالاترین اتصال را نشان دادند(شکل۱). نتایج متوسط شمارش لاکتوباسیل های متصل به سلول های Caco-2 در ۱۰ زمینه میکروسکوپی در جدول۱ قید شده است.

از آنجا که بررسی کلونیزاسیون باکتری های پروبیوتیک در روده انسان و حیوان با محدودیت هایی مواجه است. از این رو جهت بررسی توانایی کلونیزاسیون باکتری های پروبیوتیک در روده از سلول های کشت بافت و موکوس جدا شده از روده بعنوان مدل آزمایشگاهی استفاده می شود. در این بررسی ها معمولا از لاین کشت سلولی Caco-2 و HT-29 و لاین سلولی تولید کننده موکوس HT-20MTX استفاده می شود [۱۶].

مطالعات نشان داده است بررسی توانایی اتصال به سلول های کشت در شرایط *in vitro* پیش بینی مناسبی برای امکان اتصال در روده انسان در شرایط *in vivo* است (۲). اگرچه جهت حصول اطمینان مطالعات تکمیلی در شرایط *in vitro* و *in vivo* لازم است.

Matija و همکاران (۲۰۰۳) اتصال دو سویه لاکتوباسیلوس گازری به سلول های Caco-2 در دو pH ۷,۵ و ۴/۵ را بررسی ونشان دادند سویه LF221 از توانایی اتصال بیشتری نسبت به سویه تجاری لاکتوباسیلوس رامنوسوس برخوردار است [۱۲]. Chauviere و همکاران (۱۹۹۲) توانایی اتصال ۲۵ سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را بررسی و نشان دادند توانایی اتصال حتی در یک گونه از جنس لاکتوباسیلوس متغییر و وابسته یه سویه است. این نتایج اهمیت بررسی مقاومت در برابر شرایط اسیدی و املاح صفراوی و توانایی اتصال به سلول های پوششی لوله گوارش در شرایط *invitro* به منظور انتخاب سویه های پروبیوتیک را تائید می‌کند [۳].

منابع

1. Ambadoyiannis G, Hatzikamari M, Litopoulou-Tzanetaki E, and Tzanetakis N. Probiotic and technological properties of enterococci isolates from infants and cheese. Food Biotechnology 18: 307-325, 2005.

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

3. Chauviere G, Coconnier MH, Kerneis S, Fourniat J, and Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Microbiology* 138: 1689, 1992.

4. Erkkilä S and Petäjä E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science* 55: 297-300, 2000.

5. Gilliland SE, Staley TE, and Bush LJ. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as a dietary adjunct. *Journal of dairy science* 67: 3045, 1984.

6. Gilliland SE and Walker DK. 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: 905-911, 1990.

7. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition* 73: 374-379., 2001.

8. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandstrom B, Tvede M, and Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 4949-4956, 1999.

9. Lee YK, Lim CY, Teng WL, Ouwehand AC, Tuomola EM, and Salminen S. Quantitative approach in the study of adhesion of lactic acid bacteria to intestinal cells and their competition with enterobacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 66: 3692-3697, 2000.

10. Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, and Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of medical microbiology* 52: 925-930, 2003.

11. Liong MT and Shah NP. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains. *Journal of dairy science* 88: 55-66, 2005.

12. Matija BB, Narat M, and Zori M. Adhesion of Two *Lactobacillus gasseri* Probiotic Strains on Caco-2 Cells. *Food Technology Biotechnology* 41: 83-88, 2003.

13. Morelli L. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal. *Current Issues in Intestinal Microbiology* 1: 59-67, 2000.

14. Ortu S, Felis GE, Marzotto M, Deriu A, Molicotti P, Sechi LA, Dellaglio F, and Zanetti S. Identification and functional characterization of *Lactobacillus* strains isolated from milk and Gioddu, a traditional Sardinian fermented milk. *International Dairy Journal* 17: 1312-1320, 2007.

15. Ouwehand AC, Salminen S, and Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82: 279-289, 2002.

16. Ouwehand AC, Tuomola EM, Lee YK, and Salminen S. Microbial interactions to intestinal mucosal models. *Methods in enzymology* 337: 200, 2001.

17. Pennacchia C, Ercolini D, Blaiotta G, Pepe O, Mauriello G, and Villani F. Selection of Lactobacillus strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat science* 67: 309-317, 2004.

18. Succi M, Tremonte P, Reale A, Sorrentino E, Grazia L, Pacifico S, and Coppola R. Bile salt and acid tolerance of Lactobacillus rhamnosus strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. *FEMS microbiology letters* 244: 129-137, 2005.