بررسی اثر پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 بر طول عمر با استفاده از مدل نماتود *سینورابدایتیس الگانس* به صورت درون‌تنی

صفورا اکبری علویجه [۱]، صبیحه سلیمانیان زاد [۲و۳*]، محمود شیخ زین الدین [۴]

۱- دانشجوی دکترای گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
۳- رئیس پژوهشکده زیست فناوری و مهندسی زیستی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.
٤- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

(تاریخ دریافت: ۹٦/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹٦/۰۸/۲۰)

چکیده

اولین اثر مشاهده شده ناشی از مصرف باکتری‌های پروبیوتیک موجود در محصولات تخمیری بر پایه شیر، افزایش طول عمر مصرف کننده بود که برای این اثر لازم است پروبیوتیک‌ها در روده میزبان کلونیزه شوند. هدف از این مطالعه بررسی توانایی کلونیزه شدن سویه پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 در لوله گوارشی نماتود *سینورابدایتیس الگانس* در مقایسه با *اشریشیا کلی* OP50 به عنوان منبع غذایی استاندارد برای نماتود مورد مطالعه و همچنین اثر این سویه‌ها بر طول عمر نماتود به صورت درون‌تنی بود. در این تحقیق همچنین از *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG که یک پروبیوتیک رایج تجاری است به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. برای تعیین دوز بهینه پروبیوتیک‌های مورد استفاده، اثر غلظت‌های ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم از سویه‌های میکروبی مورد مطالعه، بر طول عمر نماتود بررسی شد. نتایج نشان داد، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 با دوز ۰/۱ میلی‌گرم سلول باکتریایی در هر پلیت طول عمر نماتود *سینورابدایتیس الگانس* را به میزان ۳٦/۹۵٪، در مقایسه با گروه کنترل که با *اشریشیا کلی* OP50 تغذیه شدند، افزایش داد. همچنین آزمون کلونیزه شدن سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 نشان داد که از توانایی چسبندگی خوبی به سلول‌های اپیتلیال روده نماتود، در مقایسه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG برخوردار است. در مجموع می‌توان گفت که مصرف پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 با قابلیت کلونیزه شدن در روده، امکان تولید محصولات فراسودمند حاوی این میکروارگانیسم را با هدف افزایش طول عمر میزبان فراهم می‌کند.

کلید واژگان: پروبیوتیک، *سینورابدایتیس الگانس*، طول عمر، کلونیزه شدن، فراسودمند.

*مسئول مکاتبات: soleiman@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

۱- مقدمه

مچنیکوف در سال ۱۹۰۷، مشاهده کرد که مصرف مداوم محصولات لبنی تخمیری اثر مثبت بر طول عمر افراد دارد و مفهوم پروبیوتیک را برای اولین بار معرفی کرد. پروبیوتیک ها طبق تعریف تأیید شده توسط انجمن علمی بین‌المللی پروبیوتیک و پریبیوتیک (ISAPP)[1] در سال ۲۰۱٤، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای (باکتری یا مخمر) هستند که می‌بایست از نظر متابولیکی در محصول ثابت و فعال باقی بمانند، در طول مسیر قبل از مرحله هضم به تعداد زیاد زنده مانده، خود را به سلول‌های اپیتلیال[2] روده برسانند، کلونیزه شوند و آثاری سودمند را در روده میزبان باقی گذارند [۱]. که برآیند تمامی این آثار سودمند می‌تواند منجر به افزایش طول عمر میزبان شود. یکی از چالش‌های اصلی در تولید محصولات پروبیوتیک، ناکارآمد بودن سویه‌های پروبیوتیک تجاری است. باکتری‌های پروبیوتیک پس از ورود به بدن میزبان می‌بایست با فلور میکروبی طبیعی روده رقابت کنند، در این حالت هر چه با محیط سازگارتر باشند احتمال اینکه بتوانند زنده بمانند و آثار فراسودمند خود را اعمال کنند بیشتر است. فلور میکروبی بومی هر منطقه، ترکیبات بازدارنده‌ای از قبیل باکتریوسین‌ها را ترشح می‌کنند که از تکثیر، رشد و فعالیت متابولیکی سویه‌های پروبیوتیک تجاری جلوگیری می کند. همچنین منشأ و خاستگاه پروبیوتیک‌ها، بر قدرت اتصالشان به سلول‌های اپیتلیال روده و ثبات آنها در دستگاه گوارش کاملاً تأثیرگذار است. تمامی این اثرات، مرتبط با تولید انواع آنزیمهای متنوع سازگار با سوبستراهای موجود در محیط زندگی انسان و خواص بیوسنتزی منحصر به فرد این سویه‌های بومی است [۲]. موارد مذکور ضرورت جداسازی و شناسایی سویه‌های بومی و بررسی اثرات بیولوژیک آنها را مشخص می سازد. سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 جدا شده از مدفوع نوزاد ۱۹ ماهه به عنوان یک پروبیوتیک بومی توسط میرلوحی و همکاران در سال ۲۰۰۸ شناسایی شد. تا کنون پروبیوتیک بودن این سویه به صورت برون‌تنی[3]، به اثبات رسیده، همچنین مطالعات نشان داده است که این باکتری از نظر خصوصیات تکنولوژیکی از قبیل تولید انواع متابولیت‌های میکروبی و مقاومت به تنش‌های حین فرآیند مواد غذایی در مقایسه با سایر میکرو ارگانیسم‌های رایج در صنعت، که از خارج از کشور و با صرف ارز تهیه می‌شوند، بسیار کارآمدتر است [۳-٦].

بسیاری از دانسته‌های کنونی در علوم بیولوژی و پزشکی از پژوهش‌های اولیه روی مدل‌های حیوانی به دست می آید. یک ارگانیسم مدل، موجود زنده‌ای است که مطالعات گسترده برای درک پدیده زیستی خاص روی آن انجام می‌شود، با این هدف که یافته‌های به دست آمده قابل تعمیم دادن به سایر ارگانیسم-های دیگر باشد. در انتخاب یک مدل مناسب برای مطالعه اثر رژیم‌های غذایی بر بهبود فلور میکروبی دستگاه گوارش سعی می شود حتی‌الامکان محدودیت‌ها کاهش یافته و امور مربوطه تسهیل گردد. البته سرعت، دقت و هزینه‌های مطالعه نیز در این انتخاب اثرگذارند. با وجود مزایای فراوان استفاده از موش ها به عنوان مدل برای تحقیقات بیولوژیک، هزینه‌های زیاد کار با این حیوان برای مطالعات طول عمر و پیچیدگی فلور میکروبی روده، بررسی مکانیسم اثر رژیم‌های غذایی مختلف را مشکل می‌سازد و لزوم استفاده از مدل‌های ساده تر و با هزینه نگهداری کمتر را نشان می دهد [۷].

در سال ۱۹۷٤، برای نخستین بار سیدنی برنر[4] نماتود *سینورابدایتیس الگانس*[5] را به عنوان یک موجود زنده برای مدل‌های تحقیقاتی درزمینه بیولوژی و علوم اعصاب معرفی کرد [۸]. *سینورابدایتیس الگانس* یک نماتود خاکزی ، آزاد و غیرانگل است که استفاده ازآن در آزمایشگاه‌های تحقیقاتی بی خطر و رایج می باشد. بدن یک *سینورابدایتیس الگانس* بالغ حدود یک میلیمتر طول دارد، شفاف بوده و به سهولت قابل دستکاری و مشاهده می‌باشد. منبع غذایی استاندارد این نماتود باکتری *اشریشیا کلی* OP50 است و به آسانی و ارزانی می توان آن را به تعداد زیاد در آزمایشگاه پرورش داد. چرخه زندگی *سینورابدایتیس الگانس* کوتاه است و از زمان تخم بودن تا تخم گذاری حدود سه روز طول می کشد. در شکل ۱ طرح شماتیک چرخه زندگی این نماتود ارائه شده است.

1. International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics
2. Epithelial cells
3. *In vitro*
4. Sydney Brenner
5. *Caenorhabditis elegans*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

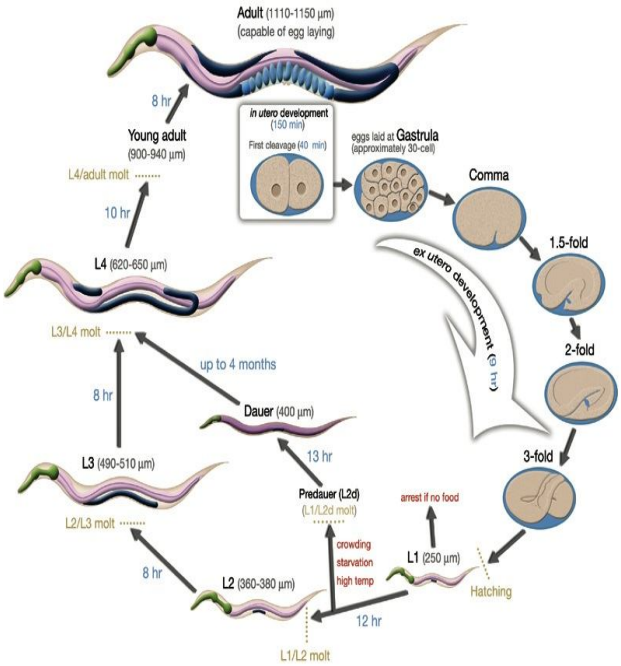

Fig 1 Life cycle of *Caenorhabditis elegans* (www.wormatlas.org)

طول عمر این نماتود در شرایط بهینه از نظر دما (۱۵ تا ۲۵ درجه سانتیگراد) نزدیک به ۲ تا ۳ هفته است. در مقایسه با استفاده از جانوران مدل دیگری مثل موش ، چرخه زندگی *سینورابدایتیس الگانس*، مدت زمان لازم برای کار آزمایشگاهی را کاهش داده و به انجام مطالعات بیولوژیکی و طول عمر سرعت می بخشد [۷]. علت انتخاب *سینورابدایتیس الگانس* به عنوان یک مدل سیستم مناسب خصوصاً برای مطالعه اثرات پروبیوتیک‌ها، شباهت بسیار زیاد سلول‌های اپیتلیال روده ای آن با اپیتلیوم روده‌ای انسان است. سلول‌های اپیتلیال *سینورابدایتیس الگانس* از نوع قطبی با میکروویلی‌های[1] متصل به یک ترمینال وب[2] تشکیل شده از اکتین[3] و رشته‌های حدواسط[4] است. با توجه به شباهت ساختاری سلول‌های روده و همچنین شباهت ژنتیکی قابل توجه (۴۰٪ همولوگ) بین *سینورابدایتیس الگانس* و انسان، این نماتود مدل مناسبی برای مطالعه روی اثرات پروبیوتیک‌ها محسوب می شود [۹].

هدف از پژوهش حاضر بررسی امکان کلونیزه شدن پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 و اثر آن بر طول عمر، در مقایسه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG به عنوان یک پروبیوتیک رایج تجاری، توسط مدل ارگانیسم *سینورابدایتیس الگانس* به صورت درون تنی بود.

1. Microvilli
2. Terminal web
3. Actin
4. Intermediate filaments

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- باکتری‌ها، نماتود و محیط‌های کشت

سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG موجود در کلکسیون میکروبی آزمایشگاه میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان به عنوان پروبیوتیک در این مطالعه انتخاب شدند. *سینورابدایتیس الگانس* (Wild Type N2) و *اشریشیا کلی* OP50 (منبع غذایی استاندارد نماتود) ازمرکز ژنتیک *سینورابدایتیس الگانس*[5] واقع در مینه‌سوتا، امریکا تهیه شد. باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS broth[6] و باکتری *اشریشیا کلی* OP50 در محیط کشت Nutrient broth در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد فعال شدند. برای سنجش طول عمر، نماتودها روی پلیت‌های حاوی محیط کشت NGM[7] غنی شده با نیستاتین (۵ mg/mL) و استرپتومایسین (۱ mg/mL) کشت داده شدند. فرمول تهیه محیط کشت NGM و بافرهای مورد استفاده در این مطالعه اعم از محلول Bleach و بافرهای M9 و S در پیوست۱ آمده است. کلیه محیط‌های کشت و مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت‌های مرک (آلمان) و یا سیگما (امریکا) تهیه شد.

۲-۲- آماده‌سازی تیمارها

به منظور آماده‌سازی پلیت‌های مربوط به هر تیمار ابتدا کشت شبانه[8] از سویه‌های پروبیوتیک و *اشریشیا کلی* OP50 در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد تهیه شد و سوسپانسیون های میکروبی توسط سانتریفیوژ (سیگما[9]، 6K15، آلمان) (۱۳۰۰ ×g، ۵ دقیقه) تهیه و با نرمال سالین تحت شرایط مذکور دوبار شسته شدند. سوسپانسیون میکروبی هر سویه به صورت جداگانه با غلظتهای ۰/۰۱، ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم سلول باکتریایی در هر پلیت روی محیط کشت NGM پخش شدند [۱۰]. بدین ترتیب پلیت‌های مربوط به تیمارهای مورد مطالعه برای کشت نماتود *سینورابدایتیس الگانس* آماده شدند. در ادامه نحوه کشت این نماتود توضیح داده می‌شود.

5. *Caenorhabditis* Genetic Center (CGC)
6. Man Rogosa Sharpe Broth
7. Nematode Growth Medium
8. Overnight
9. Sigma

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

۲-۳- تهیه کشت همزمان از نماتود *سینورابدایتیس الگانس*

پس از شستشوی چهار پلیت حاوی تعداد کافی از تخم‌های نماتود *سینورابدایتیس الگانس*، پیش تیمار آنها با استفاده از محلول Bleach تازه تهیه شده، با هدف حذف *سینورابدایتیس الگانس*های بالغ و هماهنگ‌سازی[1] نماتودها از نظر سن انجام شد. نماتودها درون محلول ذکر شده به مدت یک دقیقه ورتکس شده، و سپس با بافر S توسط سانتریفیوژ (g× ۱۳۰۰، ۱ دقیقه) شستشو داده شدند. سپس تخم ها (۲۰۰ تا ۳۰۰ تخم) در بافر M9 تحت دمای ۲۰ درجه سانتیگراد به مدت ۱۸ ساعت نگهداری شدند تا جمعیت مناسب از نماتود *سینورابدایتیس الگانس* در فاز رشد L1 به دست آید. سپس نماتودها به پلیت‌های ٦ سانتی متری حاوی NGM که روی آن ۵۰ میکرولیتر از کشت سلولی باکتری *اشریشیا کلی* OP50 به عنوان منبع غذایی پخش شده بود، منتقل شده و به مدت ٤٨ تا ٦٠ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند تا به فاز رشد L4 برسند. نماتودهای جمع آوری شده از سطح پلیت توسط بافر M9، پس از سه بار شستشو با بافر S با استفاده از سانتریفوژ تحت شرایط فوق‌الذکر، به یک پلیت NGM استریل فاقد باکتری منتقل شدند [۱۱].

۲-٤- سنجش طول عمر *سینورابدایتیس الگانس*

طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* طبق روش معرفی شده توسط ایکدا و همکاران[2] (۲۰۰۷) تحت تاثیر غلظت‌های مختلف سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG بررسی شد. بدین منظور، پس از بررسی با استریو میکروسکوپ[3] (Olympus SZX16، ژاپن) و حصول اطمینان از رسیدن نماتودهای فاز L1 به فاز L4، در مورد هر تیمار ۵۰ نماتود فاز L4 (۱۰ نماتود در هر پلیت) به پلیت مورد نظر منتقل و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نماتودها با فواصل سه روزه به پلیت‌های تازه انتقال داده شد، و هر ٢٤ ساعت تعداد نماتودهای زنده و مرده، پس از مشاهده میکروسکوپی در هر تیمار ثبت گردید. همچنین نماتودهایی که به طور اتفاقی بر اثر بالا رفتن از دیواره پلیت، یا بازشدن تخم درون بدن از بین رفته بودند از آزمایش حذف شدند [۱۲].

۲-۵- آزمون کلونیزه شدن پروبیوتیک‌ها توسط *سینورابدایتیس الگانس*

تعداد ۱۰ عدد نماتودهای فاز L4، به هر یک از پلیت های حاوی ۰/۱ و ۱ میلی‌گرم سلول باکتریایی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG و *اشریشیا کلی* OP50 به طور جداگانه منتقل شدند. پس از ۵ روز، ۱۰ نماتود به صورت تصادفی در یک میکروتیوب حاوی بافر M9 دوبار سانتریفیوژ (g×۱۳۰۰، ۱ دقیقه) شدند و بعد از شستشو و جدا کردن مایع رویی، ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ اضافه شد تا سطح بدن نماتودها استریل گردد. پس از ۲۰ ثانیه، ۱ میلی‌لیتر بافر M9 اضافه شد تا غلظت نهایی اتانول به ٦/٤ ٪ کاهش یابد. پس از استرلیزاسیون سطحی نماتودها، Triton X-100 با غلظت ۱٪ به بافر اضافه شد و با استفاده از دستگاه Tissuelyser II (کیاژن[4]، امریکا) هموژن شده و محتویات روده استخراج شدند. بافر به‌دست آمده پس از رقیق سازی روی محیط‌های کشت MRS agar برای *لاکتوباسیلوس‌ها* و Nutrient agar برای *اشریشیا کلی* OP50 کشت داده شدند [۱۳].

۲-٦- آنالیز آماری

کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد و داده‌های به‌دست آمده به صورت (انحراف معیار ± میانگین) گزارش شد. داده‌های مربوط به سنجش طول عمر به روش کاپلان-مایر و توسط نرم افزار SPSS (نسخه ۱۷) تحلیل شد و نمودارها توسط همین نرم افزار رسم شد. داده‌های به دست آمده در بخش کلونیزه شدن با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹) تحلیل گردید. آنالیز واریانس یکطرفه در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آزمون LSD به منظور مقایسه میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- سنجش طول عمر

طبق نتایج به‌دست آمده، تغذیه *سینورابدایتیس الگانس* با سویه-های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC

1. Synchronization
2. Ikeda et al.
3. Stereo Microscope
4. Qiagen

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

1896 و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG طول عمر این نماتود را نسبت به تغذیه با *اشریشیا کلی* OP50 افزایش داد (شکل ۲). همچنین، نتیجه‌ی استفاده از غلظت‌های مختلف سوسپانسیون میکروبی، تأییدکننده‌ی وابسته بودن اثر مشاهده شده به دوز مصرفی بود (جدول ۱).

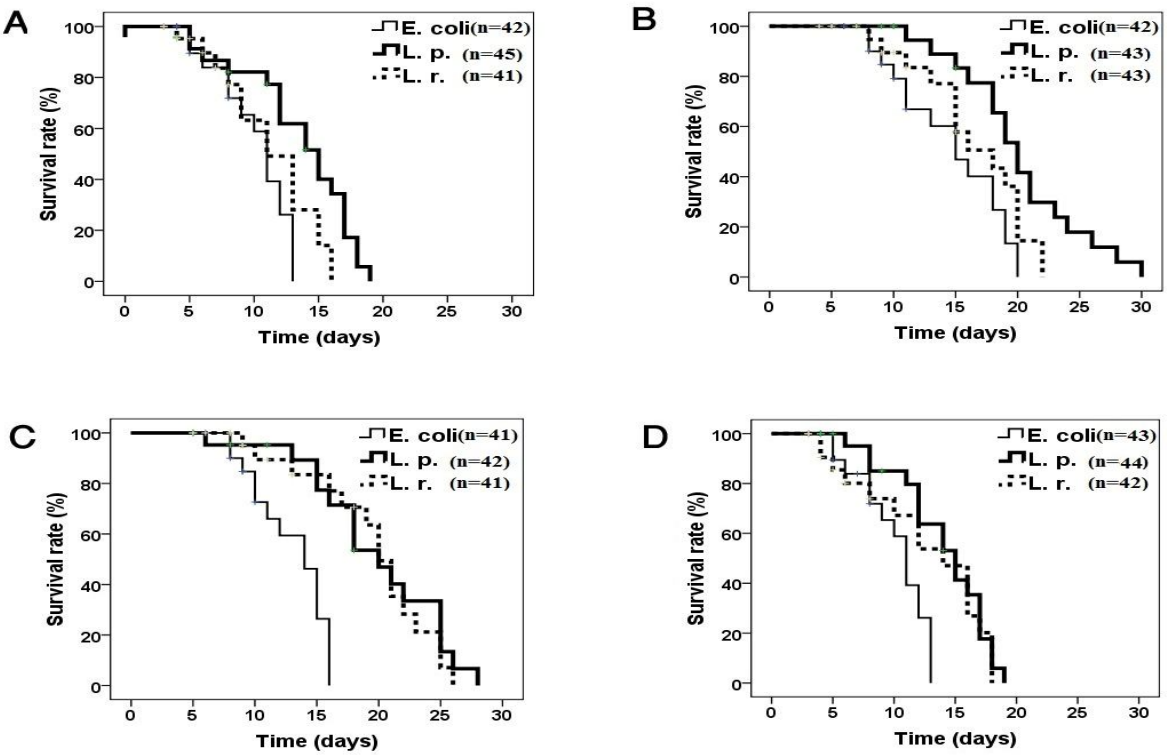

Fig 2 Effect of *L. plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 and *L. rhamnosus* GG on survival rate of *C. elegans* compared to *E. coli* OP50, A: 0.01 mg bacterial cell/plate; B: 0.1 mg bacterial cell/plate; C: 1 mg bacterial cell/plate; D: 10 mg bacterial cell/plate.

Table 1 Effect of bacterial concentration on the average age of *C. elegans*

Bacterial cell concentration (mg/plate)	Average age (days)		
	L. plantarum PTCC 1896	*L. rhamnosus* GG	*E. coli* OP50
0.01	12.61±0.83[c]	11.36±0.90[d]	10.92±0.89[c]
0.1	20.20±1.20[a]	16.62±1.05[b]	14.75±1.02[a]
1	19.97±1.32[a]	19.58±1.21[a]	13.05±0.70[b]
10	14.06±0.86[b]	12.67±1.18[c]	10.19±0.66[d]

Mean ± SD (n=3), Significant at $p< 0.05$ in the same column.

نتایج همچنین نشان داد که با مصرف غلظت ۱۰ میلی‌گرم از هر یک از سویه‌های مورد استفاده، میانگین طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* کاهش پیدا کرد. این امر شاید به تغییرات شرایط شیمیایی دستگاه گوارش *سینورابدایتیس الگانس* به دلیل افزایش متابولیت‌های در دسترس حاصل از کلونیزه شدن پروبیوتیک‌ها مربوط بوده است [۱۰]. از سوی دیگر غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم سوسپانسیون میکروبی نیز باعث کاهش طول عمر نماتود *سینورابدایتیس الگانس* شد، که این نتیجه را می‌توان به دلیل وجود شرایط گرسنگی طی دوره رشد در نظر گرفت [۱۰]. اختلاف میانگین در غلظت‌های ۰/۱، ۱ و ۱۰ میلی‌گرم *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 در هر پلیت معنادار بود (p<۰/۰۵) و غلظت ۰/۱ میلی‌گرم به عنوان دوز بهینه معرفی شد، که استفاده از آن نسبت به دوز مشابه *اشریشیا کلی* OP50 در گروه کنترل به

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

میزان ۳۶/۹۵ ٪ طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* را افزایش داد. در مورد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG نیز اختلاف میانگین در غلظت‌های ۱ و ۱۰ میلی‌گرم در هر پلیت معنادار بود ($p<۰/۰۵$) و غلظت ۱ میلی‌گرم به عنوان دوز بهینه در نظر گرفته شد، که استفاده از آن نسبت به دوز بهینه *اشریشیا کلی* OP50، ۳۲/۷۵ ٪ طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* را افزایش داد. بیشترین میانگین طول عمر با تغذیه با *اشریشیا کلی* OP50 با استفاده از غلظت ۰/۱ میلی‌گرم سوسپانسیون میکروبی در هر پلیت به دست آمد. ژائو و همکاران[1] (۲۰۱۳) نیز اثر تغذیه *سینورابدایتیس الگانس* با باکتری *لاکتوباسیلوس سالیواریوس* FDB89 را بر طول عمر بررسی کردند. در این مطالعه میانگین طول عمر نماتودهای تغذیه شده با پروبیوتیک ۰/۶۵ ± ۲۲/۱ روز بود که نسبت به گروه کنترل (۰/۵۹ ± ۱۹/۷ روز) ۱۱/۹ ٪ افزایش داشت [۱۰]. ایکدا و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ اثر تغذیه *سینورابدایتیس الگانس* با تعدادی از سویه‌های *بیفیدوباکتریوم* و *لاکتوباسیلوس* را در مقایسه با *اشریشیا کلی* OP50 بر طول عمر مورد مطالعه قرار دادند. آنها میزان افزایش طول عمر توسط پروبیوتیک‌ها را بین ۳۳٪ - ۱۷٪ تا ۳۳ ٪ گزارش کردند. این محققین همچنین نشان دادند که اثر میکروب‌های پروبیوتیک بر طول عمر وابسته به سویه است و می‌بایست در مورد هر سویه به طور اختصاصی بررسی گردد [۱۲]. پارک و همکاران[2] (۲۰۱٤) نیز اثر چهار سویه پروبیوتیک ایزوله شده از مدفوع نوزاد را بر افزایش طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* گزارش کردند [۱۳]. ما حصل همه این مطالعات تأیید کننده نتایج به‌دست آمده در این مطالعه است. برای توضیح اثر متفاوت *اشریشیا کلی* و پروبیوتیک‌ها دلایل مختلفی گزارش شده است. در ادامه به مکانیسم‌های پیشنهادی اشاره شده است.

تفاوت در ترکیبات شیمیایی سازنده ساختار سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک و *اشریشیا کلی* OP50 احتمالاً منجر به تفاوت در اثر تغذیه ای آنها بر طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* شده است. البته این بدان معنا نیست که باکتری‌های اسید لاکتیک ساختار شیمیایی مغذی تر از *اشریشیا کلی* OP50 دارند، زیرا اندازه طول بدن نماتودها در طول دوره زندگی معمولاً با استفاده از پروبیوتیک‌ها کمتر است. یکی از تئوری‌های موجود در این رابطه این است که محدودیت نماتودها در دسترسی به ترکیبات انرژی زا به هنگام تغذیه بر روی پروبیوتیک‌ها منجر به افزایش طول عمر و همچنین کاهش اندازه بدن نماتودها می‌شود. این تئوری هم در غیر پستانداران و هم در پستاندارانی ماند موش و سگ نیز به اثبات رسیده است [۱۰].

یکی از اجزاء مؤثر شناخته شده در افزایش طول عمر نماتودها کوآنزیم Q (یوبیکینون[3]) است. این جزء لیپیدی به عنوان یک ناقل الکترون در چرخه تنفس هوازی عمل می‌کند. مطالعات نشان داده است نماتودهای تغذیه شده با موتانت هایی از *اشریشیا کلی* که نقص در سنتز کوآنزیم Q دارند، طول عمر بیشتری نسبت به گروه کنترل داشتند. باکتری‌های اسید لاکتیک نیز معمولاً مجموعه کامل آنزیم‌های مورد نیاز برای سنتز این کوآنزیم را ندارند و همین امر منجر به افزایش طول عمر نماتودها می گردد [۱۲،۱٤]. ایشی و همکاران[4] (۲۰۱۳) نیز مشاهده کردند که با افزودن کوآنزیم Q به محیط کشت، می توان طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* را افزایش داد. لازم به ذکر است، اجزاء ناشناخته و یا متابولیت‌های باکتری‌های اسید لاکتیک نیز می توانند در افزایش طول عمر توسط آنها مؤثر باشند [۱۵].

DAF-16 به عنوان یک فاکتور رونویسی از خانواده forkhead، ژن‌های تشدید کننده ورود به فاز داوئر[5] را در لاروها و در نتیجه بهبود مقاومت به استرس و متعاقباً افزایش طول عمر را در نماتودهای بالغ تنظیم می کند [۱٦]. *سینورابدایتیس الگانس* تحت شرایط استرس زای محیطی مانند کمبود غذا یا انواع تنش‌ها مانند دمای بالای محیط وارد فاز داوئر می شود که در این مرحله با کاهش شدید سطح متابولیسم، کاهش سرعت حرکت حلق و به دنبال آن کاهش سطح تغذیه و تغییرات شدید در چرخه‌های متابولیکی، مقاومت خود را به تنش ها افزایش می دهد و در نتیجه طول عمر افزایش می یابد [۱۷]. اوه و همکاران (۲۰۰۵) نیز خانواده‌ی آنزیم‌های کینازJNK [6] را به عنوان یک تنظیم کننده مثبت برای DAF-16 معرفی کردند [۱۸].

دیواره سلولی در باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان جزء اولیه مؤثر در تحریک سیستم ایمنی به شمار می رود و تفاوت‌های موجود در ترکیبات دیواره سلولی در سویه‌های مختلف پروبیوتیک‌ها می تواند منجر به ایجاد سطوح مختلفی از

1. Zhao et al.
2. Park et al.
3. Ubiquinone
4. Ishi
5. Dauer
6. c-Jun N-terminal kinase (JNK)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

تحریک سیستم ایمنی توسط این باکتری‌ها گردد. برای مثال مورامیل دی پپتید[1] یکی از اجزای پپتیدوگلیکانی موجود در دیواره سلولی باکتری‌های اسید لاکتیک است که تولید سایتوکین ها را توسط ایمونوسیت‌ها تحریک می‌کند. از آنجایی که برخی سایتوکین‌ها مانند اینترکولین-۱ یا فاکتور تومور نکروزیس به عنوان فعال کننده‌های تولید JNK در پستانداران به شمار می روند، تنظیم بالادستی DAF-16 از طریق مسیر JNK را می توان به عنوان دیگر مکانیسم احتمالی افزایش طول عمر در نماتودها بر شمرد [۱۹].

۳-۲- آزمون کلونیزه شدن

در شکل۳ میزان کلونیزه شدن باکتری‌های پروبیوتیک در روده *سینورابدایتیس الگانس* با استفاده از دوزهای مؤثر در افزایش طول عمر (۰/۱ و ۱ میلی‌گرم سلول باکتریایی در هر پلیت) ارائه شده است. توانایی کلونیزه شدن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 به طرز قابل توجهی نسبت به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG به عنوان یک پروبیوتیک تجاری (کنترل مثبت) بیشتر بود. اثر دوزهای مورد استفاده از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 بر توانایی کلونیزه شدن آن معنادار نبود ($p>۰/۰۵$). در حالی که در مورد *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG این اثر معنادار بود ($p<۰/۰۵$) و با افزایش دوز سلول باکتریایی از ۰/۱ به ۱ میلی-گرم در هر پلیت توانایی کلونیزه شدن آن در روده افزایش یافت. پارک و همکاران (۲۰۱٤) نیز نتایج مشابهی را در مورد کلونیزه شدن سویه‌های پروبیوتیک ایزوله شده از مدفوع نوزاد در مقایسه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG گزارش کردند [۱۳]. وانگ و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که دو سویه *لاکتوباسیلوس* ایزوله شده از روده مرغ و خوک به طور قابل توجهی در روده *سینورابدایتیس الگانس* کلونیزه شد و از کلونیزه شدن *سالمونلا* جلوگیری کرد [۱۱].

برای توضیح نتایج به‌دست آمده می‌توان به وجود شباهت ساختاری سلول‌های اپیتلیال روده *سینورابدایتیس الگانس* و انسان اشاره کرد [۹]. شباهت مذکور این نماتود را به عنوان مدل منحصر به فردی برای بررسی کلونیزه‌شدن پروبیوتیک‌ها در روده مورد توجه قرار داده است. سلول‌های اپیتلیال روده از طریق گیرنده‌های TLR[2] قادر به شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک و پاتوژن هستند. اثر متقابل این گیرنده‌ها و سلول-های اپیتلیال روده تولید برخی سایتوکین‌ها را القا می کند که بازسازی سلول‌های اپیتلیال آسیب دیده و به تأخیر انداختن مرگ برنامه ریزی شده سلول (آپوپتوزیس)[3] را در آنها به دنبال دارد [۲۰]. پروبیوتیک‌ها با داشتن توانایی کلونیزه شدن از چسبندگی پاتوژن‌ها به سلول‌های روده جلوگیری کرده و همچنین قادرند به طور همزمان با تولید باکتریوسین‌ها و کاهش pH روده به طور قابل ملاحظه‌ای جمعیت باکتری‌های بیماریزا را در کلون کاهش دهند [۲۱].

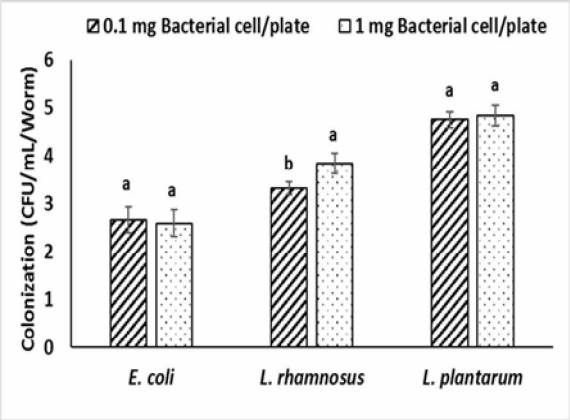

Fig 3 Intestine colonization of *C. elegans* by *L. plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896, *L. rhamnosus* GG, and *E. coli* OP50 (n=3, p<0.05).

٤- نتیجه گیری

پروبیوتیک‌ها از طرق مختلفی اثرات خود را بر بدن مصرف کننده اعمال می کنند و میزان اثر بخشی آنها به سازگاری با بدن میزبان و اکوسیستم روده و شرایط فیزیکوشیمیایی دستگاه گوارش بستگی دارد. مچنیکوف اولین اثر سلامتی بخش پروبیوتیک‌ها را به صورت افزایش طول عمر در افراد ساکن بلغارستان مشاهده کرد. از این رو در این تحقیق اثر سویه پروبیوتیک بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 بر طول عمر و امکان کلونیزه شدن آن در روده، توسط مدل ارگانیسم *سینورابدایتیس الگانس*، در مقایسه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG به عنوان یک پروبیوتیک رایج تجاری، بررسی شد. این سویه پروبیوتیک بومی با دوز ۰/۱ میلی‌گرم سلول باکتریایی در هر پلیت طول عمر *سینورابدایتیس الگانس* را به میزان ۳٦/۹۵ ٪ در مقایسه با گروه کنترل که با *اشریشیا کلی* OP50 تغذیه شدند افزایش داد. همچنین آزمون کلونیزه شدن این سویه نشان داد که از توانایی

1. Muramyl dipeptide
2.Toll-like receptors (TLR)
3. Programmed cell death (Apoptosis)

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

چسبندگی خوبی به سلول‌های اپیتلیال در مقایسه با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG برخوردار است. در مجموع می‌توان نتیجه گرفت که سویه بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* زیرگونه *پلانتاروم* PTCC 1896 به عنوان یک سویه پروبیوتیک بومی با قابلیت کلونیزه شدن در روده، طول عمر میزبان را افزایش می دهد. انجام مطالعات بیشتر با انواع موتانت های *سینورابدایتیس الگانس*، به منظور بررسی نوع مکانیسم اثر این سویه پروبیوتیک بومی در افزایش طول عمر ضروری به نظر می رسد که با انجام این گونه بررسی‌ها امکان تولید محصولات فراسودمند با مشارکت این سویه بومی امکان پذیر می گردد.

۵- منابع

[1] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., et al. 2014. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11 (8): 506–514.

[2] Sybesma, W., Kort, R., and Lee, Y.K. 2015. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? *Trends in Biotechnology*. 33 (4): 197–200.

[3] Mirlohi, M., Soleimanian-zad, S., and Sheikh-Zeinodin, M. 2008. Identification of Lactobacilli from Fecal Flora of Some Iranian Infants Subjects & Methods. *Iranian Journal of Pediatrics*. 18 (4): 357–363.

[4] Mirlohi, M., Soleimanian-Zad, S., Dokhani, S., Sheikh-Zeinodin, M., and Abghary, A. 2009. Investigation of acid and bile tolerance of native lactobacilli isolated from fecal samples and commercial probiotics by growth and survival studies. *Iranian Journal of Biotechnology*. 7 (4): 233–240.

[5] Zamani-Zadeh, M., Soleimanian-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin, M., and Goli, S.A.H. 2014. Integration of Lactobacillus plantarum A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology*. 92: 149–156.

[6] Zamani-Zadeh, M., Soleimanian-Zad, S., and Sheikh-Zeinoddin, M. 2013. Biocontrol of gray mold disease on strawberry fruit by integration of lactobacillus plantarum A7 with ajwain and cinnamon essential oils. *Journal of Food Science*. 78 (10): 1–7.

[7] Calvo, D.R., Martorell, P., Genovés, S., and Gosálbez, L. 2016. Development of novel functional ingredients: Need for testing systems and solutions with Caenorhabditis elegans. *Trends in Food Science and Technology*. 54: 197–203.

[8] Brenner, S. 1974. The genetics of Caenorhabditis elegans. *Genetics*. 77 (1): 71–94.

[9] Pukkila-Worley, R. and Ausubel, F.M. 2012. Immune defense mechanisms in the Caenorhabditis elegans intestinal epithelium. *Current Opinion in Immunology*. 24 (1): 3–9.

[10] Zhao, Y., Zhao, L., Zheng, X., Fu, T., Guo, H., and Ren, F. 2013. Lactobacillus salivarius strain FDB89 induced longevity in Caenorhabditis elegans by dietary restriction. *Journal of Microbiology*. 51 (2): 183–188.

[11] Wang, C., Wang, J., Gong, J., Yu, H., Pacan, J.C., Niu, Z., et al. 2011. Use of Caenorhabditis elegans for preselecting Lactobacillus isolates to control Salmonella Typhimurium. *Journal of Food Protection*. 74 (1): 86–93.

[12] Ikeda, T., Yasui, C., Hoshino, K., Arikawa, K., and Nishikawa, Y. 2007. Influence of lactic acid bacteria on longevity of Caenorhabditis elegans and host defense against Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*. 73 (20): 6404–6409.

[13] Park, M.R., Yun, H.S., Son, S.J., Oh, S., and Kim, Y. 2014. Short communication: Development of a direct in vivo screening model to identify potential probiotic bacteria using Caenorhabditis elegans. *Journal of Dairy Science*. 97 (11): 6828–6834.

[14] Gomez, F., Monsalve, G.C., Tse, V., Saiki, R., Weng, E., Lee, L., et al. 2012. Delayed accumulation of intestinal coliform bacteria enhances life span and stress resistance in Caenorhabditis elegans fed respiratory deficient E. coli. *BMC Microbiology*. 12 (1): 300.

[15] Ishii, N., Senoo-Matsuda, N., Miyake, K., Yasuda, K., Ishii, T., Hartman, P.S., et al. 2004. Coenzyme Q10 can prolong C. elegans lifespan by lowering oxidative stress.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

Mechanisms of Ageing and Development. 125 (1): 41–46.

[16] Lee, S.S. 2003. DAF-16 Target Genes That Control C. elegans Life-Span and Metabolism. *Science*. 300 (5619): 644–647.

[17] Melendez, A., Talloczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.L., Hall, D.H., and Beth L. 2003. Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in C. elegans. *Science*. 301 (5638): 1387–1391.

[18] Oh, S.W., Mukhopadhyay, A., Svrzikapa, N., Jiang, F., Davis, R.J., and Tissenbaum, H.A. 2005. JNK regulates lifespan in Caenorhabditis elegans by modulating nuclear translocation of forkhead transcription factor/DAF-16. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 102 (12): 4494–9.

[19] Troemel, E.R., Chu, S.W., Reinke, V., Lee, S.S., Ausubel, F.M., and Kim, D.H. 2006. p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in C. elegans. *PLoS Genetics*. 2 (11): 1725–1739.

[20] Ng, S.C., Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., and Knight, S.C. 2009. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*. 15 (2): 300–310.

[21] Walker, W.A. 2008. Mechanisms of Action of Probiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 46 (2): 87–91.

پیوست ۱

Media and solutions	Preparation method
NGM medium	20 g agar, 2.5 g bactopeptone, 3 g NaCl, H2O to 1 L and autoclave. Allow the medium to cool to a temperature of 55-60 ˚C before adding 1 mL of 5 mg/mL cholesterol, 1 mL of 1M $CaCl_2$, 1 mL of 1M $MgSO_4$ and 25 mL of 1M KPO_4 buffer pH 6.0 (108.3 g KH_2PO_4 , 35.6 g K_2HPO_4 , H_2O to 1 litre).
M9 buffer	3 g KH2PO4, 6g Na2HPO4, 5 g NaCl, 1mL 1M MgSO4, H2O to 1 L and autoclave.
S buffer	5.85 g NaCl, 1 g K_2HPO_4, 6 g KH_2 PO_4, H_2O to 1 litre and autoclave.
Bleach solution	10 mL solution: 5.5 mL distilled water, 3 mL sodium hypoclorite, 1.5 mL of 5N KOH.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]

Evaluation of effect of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 as a local probiotic on lifespan by the model nematode *Caenorhabditis elegans in vivo*

Akbari-Alavijeh, S. [1], Soleimanian-Zad, S. [2,3*], Mahmoud Sheikh-Zeinoddin [4]

1. Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3. Head of Research Institute for Biotechnology and Bioengineering, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
4. Associate professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

(Received: 2017/09/25 Accepted:2017/11/11)

According to Metchnikoff observations, the first effect of consumption of probiotics in milk-based fermented products, was long lifespan which needs the intestinal probiotic colonization. The aim of this study was investigation of the effect of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 as a local probiotic compared to *Escherichia coli* OP50 as a standard food source on lifespan and their colonization ability in *Caenorhabditis elegans* intestine *in vivo*. In this research, *lactobacillus rhamnosus* GG as a commercial probiotic was used as positive control. To determine the optimum dosage of used probiotics, the concentrations of 0.01, 0.1, 1 and 10 mg bacterial cell/plate were used. Results showed that 0.1 mg bacterial cell/plate of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 increased the lifespan of *C. elegans* by 36.95%, compared to *Escherichia coli* OP50. Also colonization test of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 showed a good adhesion ability of the bacterial cells to intestinal epithelial cells of the nematode, in comparison to *lactobacillus rhamnosus* GG. So it could be concluded that consumption of *Lactobacillus plantarum* subspecies *plantarum* PTCC 1896 as a local probiotic with a good intestinal colonization capability provides the production features of functional foods containing the probiotic species with the purpose of increasing the host's lifespan.

Keywords: Probiotic, *Caenorhabditis elegans*, Lifespan, Colonization, Functional foods.

* Corresponding Author E-Mail Address: soleiman@cc.iut.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-06]