مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

ارزیابی خواص پروبیوتیکی ۱۹ سویه *لاکتوباسیلوس گاسری*، *پلانتاروم*، *اسیدوفیلوس* و *فرمنتوم* جدا شده از منابع انسانی و غذایی در شرایط آزمایشگاهی

نسرین هادی نیا[۱]، پریناز مباشرپور[۱]، ثمانه حاتمی[۲]، محمد رضا عدالتیان دوم[۳]، مسعود یاورمنش[۴*]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

۲- دانشجوی دکترا، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

۳- دانشیار، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

۴- دانشیار، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۸ /۱۲/۱۴

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۱

کلمات کلیدی:

باکتری‌های اسید لاکتیک،

خواص پروبیوتیک،

منشاء انسانی،

منشاء غذایی، سیستم ایمنی.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.18

*مسئول مکاتبات:

yavarmanesh@um.ac.ir

چکیده

یکی از نقش‌های سودمند باکتری‌های پروبیوتیک در بدن انسان و حیوانات، تاثیرگذاری آنها بر بلوغ سلول‌های ایمنی و تولید آن‌ها در روده است. در تحقیق حاضر قابلیت زنده‌مانی در محیط اسیدی (pH) معادل ۲/۵ ، پپسین-پانکراتین، مقاومت در برابر نمک صفراوی، قابلیت چسبندگی، تست مقاومت به آنتی‌بیوتیک با اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارنگی روی آمپیسیلین، کانامایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین، خود انبوهش و هم‌انبوهش در تداخل با ۳ پاتوژن روده انسانی (*اشرشیاکلی*(O157:H7 NCTC 12900)، *سالمونلاانتریدیدیس* (ATCC 13076)، *لیستریا مونوسایتوژنز* (ATTC 7644)) بررسی شد. از لحاظ تحمل شرایط اسیدی همه سویه‌ها قابلیت زنده‌مانی بالایی داشتند. سویه‌های LF 56، LF 57، LF 55، O، F و سویه‌های LF56، A7 LF 57 به ترتیب بالاترین میزان تحمل به آنزیم پانکراتین و پپسین را از خود نشان دادند. همه سویه‌ها به جز LF 56 مقاومت بالایی دربرابر نمک صفراوی داشتند. در بین ۱۹ سویه، *لاکتوباسیلوس گاسری* به میزان ۶۲/۹ درصد بالاترین میزان متوسط چسبندگی را داشت. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* LF 56 و *گاسری* C 54 روی سه باکتری بیماری‌زا با مقادیر متوسط ۷۵/۳۱ و ۳۳ درصد به ترتیب بالاترین درصد میانگین خود انبوهش و هم انبوهش را داشتند. با وجود حساسیت سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون، M8 وM11 روی کانامایسین و کلرامفنیکل، LF 55 روی آمپیسیلین، D روی کلرامفنیکل و61 روی کانامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاومت داشتند. *لاکتوباسیلوس گاسری* روی آمپیسیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین مقاومت متوسط و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* روی آمپیسیلین و اریترومایسین مقاومت خوبی از خود نشان دادند. *لاکتوباسیلوس گاسری* (54C, 49A) از لحاظ آزمون‌های پروبیوتیکی با تکیه بر (تحمل شرایط آنزیم پانکراتین، اسیدی، صفراوی، هم‌انبوهشی با پاتوژن‌ها و چسبندگی) بهترین شرایط را دارا بود که می‌تواند بافت اپیتلیوم روده را از عوامل بیماری‌زا محافظت و جانشین باکتریایی خوبی برای کاربرد پروفیلاکتیک و پیشگیری از عفونت‌های روده و تقویت سیستم ایمنی بدن باشد.

۱- مقدمه

امروزه، مواد غذایی مغذّی با خاصیت بهبود دهندهٔ سلامت انسان به‌صورت روزافزون بر محبوبیت شان افزوده می‌شود و در طول سالیان اخیر، مشخصاً مواد غذایی پروبیوتیک، بیش از پیش مورد توجه پژوهشگران صنایع غذایی واقع شده‌است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در مقدار معیّن می‌توانند تأثیرات مثبت بر سیستم ایمنی و سلامت بدن میزبان بگذارند [۱]. برخی از مزایا و فوائد پروبیوتیک‌ها برای بدن میزبان عبارتند از: تنظیم تعادل میکروبی مسیر روده، کاهش سطح کلسترول سرُم، تسکین علائم عدم‌تحمل لاکتوز، کاهش احتمال ابتلا به سرطان روده، ارتقای سطح دسترسی‌پذیری مواد مغذی، پیشگیری یا کاهش احتمال بروز آلرژی در افراد مستعد، بهبود عملکرد سیستم ایمنی و افزایش نرخ جذب کلسیم [۳و۲].

لاکتوباسیلوس گاسری گونه‌ایی از جنس لاکتوباسیلوس است که به طور طبیعی در دستگاه گوارش، سیستم تناسلی و ادرار حضور دارد. این باکتری به کاهش باکتری‌های مضر، تحریک هضم و افزایش عملکرد سیستم ایمنی بدن کمک می‌کند. علاوه بر این *لاکتوباسیلوس گاسری* در بهبود مشکلاتی نظیر آلرژی، یبوست، اسهال، آسم، کلسترول بالا و درد قاعدگی نیز موثر است[٤] .

یکی دیگر از باکتری‌های شاخص لاکتوباسیلوس، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* است. این باکتری باعث کاهش عفونت دستگاه گوارش، بیماری‌های التهاب روده‌ای، کلسترول در سرم خون به همراه بهبود سوخت و ساز بدن و افزایش سیستم ایمنی می‌گردد [۵].

حدود ۸۰ درصد باکتری‌های ماست *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* است. این باکتری در برابر نمک‌های صفراوی و آنزیم‌های گوارشی مقاوم و در محدوده وسیعی از (pH) قادر به زندگی است و در برابر گرما از خود مقاومت نشان می‌دهد. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با تولید بعضی ترکیبات ضد میکروبی عامل مهمی در جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت بیماریزا مثل *لیستریا* در روده و سویه‌های پاتوژنیک دیگر می‌باشد [٦].

لاکتوباسیلوس فرمنتوم از باکتری‌های گرم مثبت متعلق به جنس *لاکتوباسیلوس* است. این باکتری به عنوان یک استارتر مهم برای محصولات غذایی تخمیری و ماده نگهدارنده مواد غذایی حائز اهمیت است. همچنین یک میکروارگانیسم کلیدی در خمیر ترش به حساب می‌آید و به بهبود طعم، بافت یا مواد تشکیل دهنده آن کمک می‌کند. اخیرا برای تهیه مواد غذایی جدید از جمله مواد غذایی غنی شده و کاربردی با ویژگی‌های مفید برای سلامتی انسان استفاده شده است که در حال حاضر سهم مهمی از بازار صنایع غذایی را به خود اختصاص داده است [٦].

پروبیوتیک‌ها درسطوح متعددی روی سیستم ایمنی تاثیر می‌گذارند که از جمله می‌توان افزایش سطح سایتوکاین‌ها و ایمونوگلوبین‌ها، افزایش تکثیر سلول‌های مونونوکلوئاز، فعال کردن ماکروفاژها، افزایش فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی، تعدیل خودایمنی و تحریک ایمنی در برابر باکتری‌های بیماری‌زا و پروتزوآها را نام برد [۷]. بنا به گزارش سازمان غذا و کشاورزی (FAO) و سازمان بهداشت جهانی (WHO)، تنها چند آزمون آزمایشگاهی محدود برای مطالعهٔ سویه‌های مختلف پروبیوتیک در دسترس هستند که شامل آزمون های ارزیابی مقاومت به اسید معده و نمک صفراوی، قابلیت چسبندگی به موکوس[1] و یا سلول-های اپیتلیال انسانی و سرطانی، فعالیت ضدمیکروبی در مقابل باکتری‌های پاتوژنیک، قابلیت کاهش نرخ چسبندگی پاتوژن به سطوح سلول و آزمون فعالیت هیدرولاز نمک صفراوی می‌شوند [۸].

در گذشته، پژوهشگران بر این باور بودند که سویه‌های انسانی منبع اصلی سویه‌های مختلف پروبیوتیک هستند؛ زیرا از لحاظ ساختاری این سویه‌ها در بدن میزبان به گونه‌ای تنظیم و انطباق یافته که به راحتی با محیط دستگاه گوارش انسان سازگاری دارد. اما اخیراً توجه پژوهشگران به سوی مواد غذایی تخمیری جلب شده‌است که در آنها مقدار معیّنی از سویه‌های باکتریایی پروبیوتیک وجود دارد [۹ و ۱۰]. در حال حاضر این گروه از مواد غذایی را به عنوان منبع اصلی ارگانیسم‌های پروبیوتیک می‌شناسند. به بیان دقیق‌تر، محصولات لبنی بهترین منابعی هستند

1. mucus

که می‌توانند سویه‌های پروبیوتیک را به بدن ما برسانند [۱۱]. از سوی دیگر، از آنجایی که مصرف محصولات لبنی با برخی عوارض مثل عدم تحمل لاکتوز و افزایش کلسترول در خون همراه است، اخیراً تولید محصولات پروبیوتیک غیر لبنی در کانون توجه قرار گرفته‌اند. به‌تازگی پژوهش‌هایی به تألیف رسیده‌اند که کاربرد میوه‌ها و سبزیجات تخمیری به عنوان یک مادهٔ خام برای تأمین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را مورد مطالعه قرار داده‌اند؛ اما این منابع از میگروارگانیسم‌های پروبیوتیک نسبت به محصولات لبنی بسیار محدودتر هستند [۱۲].

اسهال دومین علّت شایع مرگ ومیر در میان کودکان زیر ۵ سال می‌باشد. اگرچه بسیاری از این موارد مرگ ومیر در میان جمعیت کشورهای درحال‌توسعه رخ می‌دهند اما در کشورهای توسعه‌یافته نیز شاهد شیوع برخی بیماری‌های عفونی ناشی از آب و مواد غذایی آلوده هستیم [۱۳]. به بیان دقیق‌تر، سالانه از هر ٦ نفر آمریکایی ۱ نفر به این بیماری‌ها آلوده می‌شود. به‌طور معمول، برای درمان عوارض بیماری‌های ناشی از مواد غذایی و آب آلوده، محلول‌های خوراکی و داروهای ضداسهال (مثل لوپرامید) برای بیمار تجویز می‌شوند [١٤]. برخی از آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی نیز در محدودسازی روند رشد پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی در داخل بدن انسان مؤثر می‌باشند؛ اما شواهد نشان دادند که بیماران پس از گذشت مدتی از مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها نسبت به آن‌ها مقاومت پیدا می‌کنند [۱۵].

باکتری‌های پروبیوتیک می‌توانند یک گزینهٔ مناسب برای کنترل و پیشگیری از ابتلا به بیماری‌های ناشی از مواد غذایی باشند؛ زیرا نتایج بسیاری از تحقیقات و پژوهش‌ها، کارآمدی و تأثیرگذاری این باکتری‌ها در کاهش اثر بیماری‌زایی پاتوژن‌های موجود در مواد غذایی را به اثبات رسانده‌اند [١٦و١٧]. همچنین طبق آخرین آمار دومین علت مرگ و میر در ایران سرطان یا تومورهای بدخیم است. شیوع تومورهای بدخیم در بین کشورهای جهان سوم از جمله ایران به علت رژیم غذایی نادرست، تغییر عمده رژیم غذایی در نسل امروز، استفاده از غذاهای از پیش تهیه شده (غذاهای فوری) و عدم استفاده از فراورده‌های لبنی سالم مخصوصا پروبیوتیک‌ها می‌باشد. تنوع فراورده‌های لبنی سنتی مخصوصا تخمیری در ایران بصورت بالقوه دارای منابع ویژه باکتری‌های مفید و ارزشمند (خصوصا پروبیوتیکی) است. مطالعه پیش رو بر آن است تا مقایسه‌ای در میزان خاصیت پروبیوتیکی بین سویه‌های انسانی، تخمیری و لبنی بومی ایران داشته باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه میکروارگانیسم‌ها

۱۹سویه ایزوله شده *لاکتوباسیلوس گاسری*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* از نمونه‌های انسانی با منبع (واژینال زن سالم، روده کوچک نوزاد و مدفوع) و مواد غذایی سنتی(پنیر لیقوان، زیتون تخمیری، دوغ شتر، خمیر ترش، پنیر کوزه، شیر شتر، سبوس گندم، ترخینه، حره)، همچنین دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (PTCC 1643) و *فرمنتوم*(PTCC 1638) از دانشگاه‌های علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، منابع طبیعی گرگان، پژوهشکده صنایع غذایی مشهد، دانشگاه شیراز و گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد تهیه شد. این سویه ها به‌واسطهٔ روش‌های مولکولی شناسایی شده بودند. در NCBI شماره دسترسی توالی-های ژن ١٦ srRNA سویه‌های مذکور گزارش شده‌اند. سویه-های مختلف باکتریایی اسید لاکتیک به مدت ٤٨ ساعت، در محیط کِشت مایع و جامد MRS و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد کِشت شدند.

۲-۲- بررسی و شناسایی مشخصه‌های پروبیوتیک

۲-۲-۱-مقاومت در برابر محیط‌های اسیدی (pH پایین)

ابتدا سویه‌های مورد آزمون به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری، سپس در دور g ٦۰۰۰ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژشدند. فاز رویی دور ریخته شد و سلول‌ها با محلول فسفات بافر با ۲/۵ (pH) شسته، آنگاه به مدت ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند. این

نمونه‌ها به ترتیب قبل و بعد از ٤ ساعت در محلول سالین استریل (سدیم کلرید ۰/۸۵ درصد) رقت‌سازی شدند، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سه رقت آخر در محیط کشت جامد MRS کشت سطحی و پلیت‌ها به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری و شمارش شدند. درصد زنده‌مانی باکتری‌ها با فرمول زیر محاسبه شد [۱۳]:

$$\text{Survival}\% = \frac{\log \text{cfu of viable cells survived}}{\log \text{cfu of initial iable cells inoculated}} \times 100 \quad (۱)$$

۲-۲-۲- مقاومت سویه‌ها در نمک صفراوی

در آزمایش ارزیابی مقاومت سویه‌ها در نمک صفراوی، محیط کِشت مایع MRS حاوی ۰/۳ درصد (وزنی-حجمی) نمک صفراوی (صفرای گاو)، با ۱۰۰میکرولیتر باکتری رشد یافته (در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت) آمیخته و در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و به مدت ٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. قبل و بعد از گرم‌خانه‌گذاری در زمان صفر و چهار ساعت به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از رقت‌های متوالی تهیه‌شده، روی پلیت‌های حاویMRS آگار کشت سطحی و به مدت ٤٨ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری گردیدند، سپس درصد زنده‌مانی باکتری‌ها طبق معادلهٔ شمارهٔ ۱ محاسبه گشت [۱۸].

۲-۲-۳- شبیه سازی شیره معده

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتراز باکتری‌های رشد یافته، به محلول شبیه سازی شده معده (۳ میلی‌گرم بر لیتر پپسین در محلول سالین استریل ۰/۸۵ درصد با ۲/۵ (pH) تزریق و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شدند. قبل و بعد از گرم‌خانه‌گذاری از رقت های متوالی تهیه شده، در محیط کشت MRS آگار کشت سطحی و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤٨ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردیدند، سپس از نظر تعداد سلول زنده مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

۲-۲-٤-شبیه سازی شیره روده (پانکراتین)

میزان ۱میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پانکراتین در محلول سالین ۰/۸۵ درصد حل و (pH) آن به ۸ رسانده شد. به این محلول ۱۰۰ میکرولیتر باکتری رشد یافته تزریق و به مدت ٦ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. قبل و بعد از گرم‌خانه‌گذاری از رقت‌های تهیه‌شده در محیط کشت MRS آگار کشت سطحی و در انکوباتور ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت٤٨ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد، سپس از نظر تعداد سلول زنده مورد بررسی قرار گرفت [۱۹].

۲-۲-۵-چسبندگی سلولی

سویه‌های مورد آزمون در محیط کشت مایع MRS به مدت ۱۸ تا ۲٤ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری سپس در دورg ۵۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی دور ریخته و بافر K2HPO4 ۵۰ میلی مولار با ٦/۵ (pH) به سلول‌ها اضافه و مجددا تا دو مرتبه شسته شدند. آنگاه جذب محلول در محدوده ۰/۸ تا ۱ در طول موج ٥٦۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر مدل lightwave S2000UV/Vis خوانده شد. ۳ میلی‌لیتر از محلول را در لوله آزمایش ریخته و ۰/٦ میلی‌لیتر ان-هگزادکان به آن اضافه و به مدت ۱۲۰ ثانیه مخلوط شد. سپس لوله‌ها به حالت ایستاده و ثابت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه به منظور دو فاز شدن گرم‌خانه‌گذاری شد. آنگاه فاز رویی به دقت جدا و جذب فاز زیرین درطول موج ٥٦۰ اندازه‌گیری شد[۲۰].

$$H\% = \frac{A0-A}{A0} \times 100 \quad (۲)$$

جذب در محدوده ۰٨ تا ۱ =A0

جذب فاز زیرین =A

۲-۲-٦-آزمون خود انبوهش[2] و هم انبوهش[3]

سویه‌های دارای بالاترین درصد خود انبوهش و هم انبوهش، سویه‌های پروبیوتیکی برتر محسوب می‌شوند [۲۱]. آزمون خود انبوهش و هم‌انبوهش سویه‌ها طبق روش (دل وهمکاران ۲۰۰۰) انجام شد. به‌طور خلاصه سویه‌های مورد آزمون به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در محیط کشت مایع

2 . Auto-aggregation
3. Co- aggregation

MRS در شرایط میکروآئروفیلیک رشد کردند. سپس کشت‌های باکتریایی به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۵۰۰ rpm سانتریفوژ شده و پلت سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر بافر PBS تا حدود CFU/ml 10^8 (طول موج ۵۵۰ نانومتر و جذب ۰/۳-۰/۲) مجددا حل شد. هر سوسپانسیون برای ۱۰ ثانیه مخلوط و در دمای اتاق به مدت ٦ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. سپس در هر ساعت، ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون بالایی برداشته و جذب درطول موج ٦۰۰ نانومتر با اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. درصد خود انبوهش طبق فرمول زیر محاسبه گردید [۲۱و۲۲]

$$\text{Auto-aggregation}=1-\left(\frac{At}{A0}\right)\times 100 \quad (۳)$$

که در آن A_t جذب در زمان های مختلف و A_0 جذب در زمان صفر است.

برای آزمون هم انبوهش، مقادیر ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون‌های باکتریایی مورد آزمون و پاتوژن‌های *اشرشیاکلی* (O157:H7 NCTC 12900) ، *سالمونلاانتریدیدیس* (ATCC 13076)، *لیستریا مونوسایتوژنز*(ATTC 7644)) با غلظت استاندارد سلولی cfu/ml 10^8 (طول موج ٦۰۰ نانومتر و جذب ۰/۰۵ ± ۰/۲۵) به مدت ۱۰ ثانیه مخلوط و به مدت ٦ ساعت در دمای اتاق بدون تکان دادن گرم خانه‌گذاری شد. نمونه‌های حاوی مقادیر ٦ میلی‌لیتر از سوسپانسیون یک باکتری به عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. در هر ساعت، ۱میلی‌لیتر از سوسپانسیون بالایی برداشته و جذب مخلوطها (پروبیوتیک و پاتوژن) طی ٦ ساعت گرم خانه گذاری بررسی شد. جذب برای مخلوط و برای سوسپانسیون‌های باکتری به تنهایی تعیین گردید. درصد هم انبوهش طبق معادله (٤) محاسبه شد، که در آن Ax و Ay نشان دهنده خواص انبوهش سویه‌های مورد آزمون و پاتوژن به تنهایی و A(x + y) انبوهش ترکیبی سویه ها و پاتوژن است. همه آزمایش ها در ۲ تکرار انجام شدند [۲۲].

(٤)

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

۲-۲-۷- مقاومت به آنتی‌بیوتیک

بر اساس روش پانل و همکاران ۲۰۱۲، ابتدا در همه چاهک‌های پلیت کشت سلول ۹٦ خانه‌ای به میزان ۹۵ میکرولیتر MRS مایع وسویه‌ها با غلظت نیم‌مک‌فارلند به میزان ۵ میکرولیتر در هر چاهک به جز ردیف کنترل منفی ریخته شد. آنگاه آنتی‌بیوتیک‌های آمپیسیلین، کانامایسین، اریترومایسین، کلرامفنیکل و تتراسایکلین با غلظت اولیه ۱میلی‌گرم بر لیتر به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در چاهک‌های اول به جز ردیف کنترل مثبت ریخته، سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲٤ ساعت گرم خانه‌گذاری شد.. کمترین غلظت بازدارندگی در اولین چاهکی که کمتر از کنترل مثبت بود به عنوان MIC در نظر گرفته شد [۲۳].

۳-نتایج و بحث

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود همه سویه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *اسیدوفیلوس*، *فرمنتوم* و *گاسری* تحمل خوبی در برابر شرایط اسیدی معده با ۲/۵(PH) داشتند. در بین این سویه‌ها بیشترین میزان تحمل به اسید یا pH پایین، مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گرفته شده از شیر با کد M8، پنیر لیقوان با کدهای LF57 و LF56 و *لاکتوباسیلوس گاسری* جدا شده از واژینال زن سالم با کد 54C به میزان ۱۰۰ درصد بود. *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* یک باکتری هتروفرمانتاتیو اختیاری است که قادر به تخمیر پلی‌ساکارید رافینوز نیز می‌باشد [۲٤]. طبق تحقیقات محققان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در بین لاکتوباسیلوس‌های دیگر تحمل بالاتری نسبت به (PH) پایین دارد [۲۵و۲٦]. *لاکتوباسیلوس گاسری* نیز معمولا در روده و دستگاه گوارش انسان، خصوصا در شیر مادر یافت می‌شود که می‌تواند محیط اسیدی معده را به راحتی تحمل کند و طبق پژوهش‌های پیشین هنگامی که در فرم مکمل غذایی مصرف شود باعث کاهش التهاب و ارائه انواع مزایای سلامتی می‌گردد [۲۷].

Table 1 Acid tolerance of LAB strains in PBS ((PH) 2.5) (mean ± SD)

Species	Strains number	source	Initial counts Time (0h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival after Time (4h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival%
L. plantarum	M8	milk	6.6×10^7	7.82±0.01	7.9×10^7	7.90±0.00	100.00
	M11	milk	4.3×10^7	7.63±0.01	1.6×10^7	7.20±0.01	94.38
	S2G	Wheat brane	2.1×10^8	8.32±0.00	7×10^7	7.85±0.00	94.27
	A7	small intestine	0.86×10^7	6.93±0.00	0.18×10^7	6.26±0.00	90.21
	LF 56	Lighvan cheese	1.1×10^7	7.04±0.01	1.2×10^7	7.08±0.02	100.00
	LF 48	Lighvan cheese	1.4×10^8	8.15±0.02	1.1×10^6	6.04±0.01	74.16
	LF 57	Lighvan cheese	1.5×10^7	7.18±0.00	3.6×10^7	7.56±0.01	100.00
	LF 55	Lighvan cheese	1.1×10^7	7.04±0.01	۰.۷۷×10^6	5.88±0.14	83.61
	D	sourdough	4.3×10^7	7.63±0.002	2.5×10^6	6.40±0.01	83.81
	21	Fermented olives	1.4×10^8	8.15±0.001	1.1×10^6	6.04±0.11	74.16
	5	camel milk	1.6×10^8	8.20±0.02	1.1×10^7	7.04±0.00	85.83
	61	Pitcher cheese	1.3×10^8	8.11±0.01	0.54×10^6	5.73±0.1	70.68
L.gassseri	54C	Vaginal	0.18×10^7	6.26±0.00	0.96×10^7	6.98±0.00	100.00
	49	Vaginal	1.4×10^8	8.15±0.00	1.5×10^7	7.18±0.01	88.09
	47 b	Vaginal	7.2×10^7	7.86±0.01	2.5×10^6	6.40±0.01	81.43
	52 b	Vaginal	8.1×10^7	7.91±0.00	1.9×10^7	7.28±0.02	92.04
L. fermentum	O	Camel Doogh	1.3×10^8	8.11±0.01	3.6×10^7	7.56±0.00	93.13
	F	PTCC1638	3.4×10^7	7.53±0.1	0.81×10^6	5.91±0.00	78.46
L. acidophilus	La5	PTCC1643	7.8×10^7	7.89±0.00	6.5×10^6	6.81±0.01	86.33

Values are expressed in mean ± standard deviation
Results are reported as the mean of two replicates

بر طبق جدول ۲ مربوط به درصد بقا در نمک صفراوی شبیه‌سازی شده شیره لوزالمعده، به جز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از پنیر لیقوان با کد LF 56، اکثریت ۱۹ سویه قابلیت زنده‌مانی ۱۰۰ درصد را داشتند. مقاومت به اسید معده و نمک های صفراوی عبور موفقیت‌آمیز پروبیوتیک‌ها از معده و استقرار آن در روده را تضمین می‌نماید. بقای باکتری‌ها در pH پایین اسیدی در شرایط آزمایشگاه تا حدود زیادی می‌تواند زنده ماندن باکتری را حین عبور از معده نشان دهد. مقاومت و پایداری در حضور نمک‌های صفراوی یکی از مهم‌ترین مشخصه‌های باکتری‌های پروبیوتیک است که در زمان انتخاب و گزینش آن‌ها باید معیار و ملاک قرار داده شود؛ زیرا در رودهٔ کوچک و بزرگ، مقدار نسبتاً زیادی نمک صفراوی وجود دارد که برای سلول‌های زنده سمّی و کشنده است [۲۸].

Table 2 Bile salt tolerance of LAB strains (mean ± SD)

Species	Strains number	source	Initial counts Time (0h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival after Time (4h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival%
L. plantarum	M8	milk	3.6×10^6	6.56±0.01	2.5×10^6	6.40±0.00	97.58
	M11	milk	2.2×10^6	6.34±0.00	2.5×10^6	6.40±0.01	100.00
	S2G	Wheat brane	1.3×10^7	7.11±0.00	4×10^7	7.60±0.01	100.00
	A7	small intestine	5.01×10^7	7.70±0.00	7×10^6	2.62±0.00	34.07
	LF 56	Lighvan cheese	0.00	-	0.00	-	-
	LF 48	Lighvan cheese	1.2×10^7	7.08±0.01	4.9×10^6	6.69±0.05	94.51
	LF 57	Lighvan cheese	1.5×10^7	7.18±0.02	9.2×10^6	6.96±0.02	97.04
	LF 55	Lighvan cheese	7.8×10^6	6.89±0.00	4.2×10^7	7.62±0.03	100.00
	D	sourdough	1.1×10^7	7.04±0.01	9.3×10^6	6.97±0.11	98.96
	21	Fermented olives	1.3×10^8	8.11±0.00	2×10^8	8.30±0.00	100.00
	5	camel milk	5.7×10^6	6.76±0.11	4.7×10^7	7.67±0.10	100.00
	61	Pitcher cheese	5.4×10^6	6.73±0.01	8×10^6	6.90±0.00	100.00
L. gasseri	54C	Vaginal	3.6×10^7	7.56±0.02	8.28×10^7	7.92±0.00	100.00
	49	Vaginal	0.72×10^6	5.86±0.00	0.45×10^6	5.65±0.01	96.41
	47 b	Vaginal	1.1×10^6	6.04±0.00	1.7×10^7	7.23±0.00	100.00
	52 b	Vaginal	0.95×10^6	5.98±0.01	1.3×10^7	7.11±0.00	100.00
L. fermentum	O	Camel Doogh	3.7×10^6	6.57±0.01	2.1×10^7	7.32±0.01	100.00
	F	PTCC1638	1.3×10^7	7.11±0.11	1.83×10^7	7.26±0.02	100.00
L. acidophilus	La5	PTCC1643	0.22×10^6	5.34±0.14	4.8×10^6	6.68±0.01	100.00

Values are expressed in mean ± standard deviation
Results are reported as the mean of two replicates

در آزمون شبیه سازی شده شیره معده پپسین با (PH) ۲/۵ *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از روده کوچک با کد A7، از پنیر لیقوان با کدهای LF 56 و LF 57 و از زیتون تخمیری با کد 21، همچنین *لاکتوباسیلوس گاسری* جدا شده از منبع انسانی با کد 54C زنده‌مانی بالایی داشتند. طبق استانداردهای پروبیوتیک ایران ICS:07/100/30 بند ٦-٦ تعداد شمارش کلونی‌ها بعد از تیمار ٤ ساعت نباید از 10^6 کمتر باشد. *لاکتوباسیلوس گاسری* با منبع انسانی با کدهای 49، 47 b، 52 b و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گرفته شده از شیر شتر با کد ۵ تعداد کلونی شمارش شده آنها کمتر از 10^6 بود. *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* با منبع دوغ شتر و استاندارد PTCC 1638 ، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 ، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گرفته شده از پنیر لیقوان با کدهای LF 55 و LF 48 و از خمیر ترش با کد D و گرفته شده از شیر با کد های M 8 و M 11 و از سبوس گندم با

کد S2G و از پنیر کوزه با کد 61 هیچ کلنی بعد از تیمار مشاهده نشد (جدول ۳). از بین ۱۹ سویه فقط ۵ سویه تحمل خوبی به آنزیم پسین داشتند. در واقع مقدار محتوای شیره گوارشی برحسب زمان، طول مسیر دستگاه گوارش و مشخصه‌های فردی انسان‌ها متغیر است؛ اما شرایطی که ما در مدل‌های شبیه‌سازی‌شدهٔ خود فراهم کردیم، احتمالاً نمی‌توانند این تنوع‌ها و تغییرات را به طور کامل بازنمایی کنند [۲۹]. حتی گاهی برخی از مواد غذایی نیز می‌توانند به بقای باکتری‌های محیط در بدن انسان کمک کنند؛ اما در مدل شبیه‌سازی‌شدهٔ ما از دستگاه گوارش این ملاحظات در نظر گرفته نشده‌اند.

Table 3 Survival of LAB strains in simulated gastric conditions (pepsin-(PH) 2.5 solution) (mean ± SD)

Species	Strains number	source	Initial counts Time (0h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival after Time (4h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival%
L. plantarum	M8	Milk	>2000	-	0	-	-
	M11	Milk	>2000	-	0	-	-
	S2G	Wheat brane	0.83×10^{6}	5.92±0.00	0	-	-
	A7	small intestine	9.6×10^{6}	6.98±0.01	1.1×10^{7}	7.04±0.00	100.00
	LF 56	Lighvan cheese	1.2×10^{6}	6.08±0.02	1.6×10^{6}	6.20±0.01	100.00
	LF 48	Lighvan cheese	1.6×10^{6}	6.20±0.00	0.00	-	-
	LF 57	Lighvan cheese	0.014×10^{7}	5.15±0.12	0.93×10^{6}	5.97±0.02	100.00
	LF 55	Lighvan cheese	6.6×10^{3}	4.11±0.01	0.00	-	-
	D	sourdough	1×10^{6}	6.00±0.02	0.00	-	-
	21	Fermented olives	8×10^{6}	6.90±0.04	6×10^{6}	6.78±0.1	98.19
	5	camel milk	0.8×10^{6}	5.90±0.01	0.8×10^{4}	3.90±0.00	$<10^{6}$
	61	Pitcher cheese	1.4×104	4.15±0.01	0.00	-	-
L. gasseri	54C	Vaginal	0.3×10^{7}	6.48±0.01	0.1×10^{7}	6.00±0.01	92.63
	49	Vaginal	0.2×10^{5}	4.30±0.00	0.8×10^{4}	3.90±0.01	$<10^{6}$
	47 b	Vaginal	5.2×10^{5}	5.72±0.02	1.2×10^{4}	4.08±0.00	$<10^{6}$
	52 b	Vaginal	0.1×10^{5}	4.00±0.11	0.25×10^{5}	4.40±0.01	$<10^{6}$
L. fermentum	O	Camel Doogh	0.6×10^{6}	5.78±0.14	0.00	-	-
	F	PTCC1638	1.3×10^{4}	3.82±0.04	0.00	-	-
L. acidophilus	La5	PTCC1643	1×10^{7}	7.00±0.05	0.00	-	-

Values are expressed in mean ± standard deviation
- : no-Significant
Results are reported as the mean of two replicates

بر اساس مطالعات راشدی و گاما در سال ۲۰۱۳ مشخص شد که مقاومت به شیره معده در لاکتوباسیلوس ها به فعالیت پمپ هیدروژن ATPaz و ترکیبات غشائ باکتری بستگی دارد. از طرف دیگر به نوع باکتری، نوع محیط کشت و شرایط گرم خانه‌گذاری نیز مربوط می‌باشد [۳۰]. در تحقیق رخ تابناک و همکاران ۲۰۱۶ نیزاز بین ۲۶ سویه فقط ۵ سویه مقاوم به(PH) پایین بودند [۲۸].

در آزمون زنده‌مانی در شرایط شبیه‌سازی شده شیره روده (پانکراتین با۸ = (PH))، بیشترین میزان زنده‌مانی مربوط به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* جداشده از شیر شتر با کد O و PTCC 1638 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* گرفته شده از پنیر لیقوان با کدهای LF 56، LF 57، LF 55 به میزان ۱۰۰ درصد بود.

Table 4 Survival of LAB strains in simulated intestinal conditions (pancreatin, (PH) =8) (mean ± SD)

Species	Strains number	source	Initial counts Time (0h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival after Time (4h) Cfu/ml	(Log Cfu/ml)	Survival%
L. plantarum	M8	Milk	<10	-	0	-	-
	M11	Milk	0.84×10^{4}	3.92±0.00	0	-	-
	S2G	Wheat brane	1.1×10^{8}	8.04±0.05	0.18×10^{7}	6.26±0.01	77.79
	A7	small intestine	0.1×10^{7}	6.00±0.07	0.6×10^{6}	5.78±0.00	96.30
	LF 56	Lighvan cheese	0.23×10^{6}	5.36±0.01	0.11×10^{7}	6.04±0.00	100.00
	LF 48	Lighvan cheese	0.53×10^{7}	6.72±0.00	0.36×10^{7}	6.56±0.03	97.50
	LF 57	Lighvan cheese	0.38×10^{7}	6.58±0.00	0.81×10^{7}	6.91±0.00	100.00
	LF 55	Lighvan cheese	0.16×10^{6}	5.20±0.06	0.4×10^{6}	5.60±0.00	100.00
	D	sourdough	0.9×10^{7}	6.95±0.07	0.43×10^{7}	6.63±0.02	95.39
	21	Fermented olives	0.11×10^{8}	7.04±0.14	0.15×10^{7}	6.18±0.01	87.71
	5	camel milk	0.36×10^{7}	6.56±0.01	0.11×10^{7}	6.04±0.00	92.15
	61	Pitcher cheese	0.11×10^{6}	5.04±0.04	0.00	0.00	0.00
L. gasseri	54C	Vaginal	0.3×10^{7}	6.48±0.10	0.1×10^{7}	6.00±0.16	92.63
	49	Vaginal	0.014×10^{6}	4.15±0.05	0.00	-	-
	47 b	Vaginal	0.12×10^{7}	6.08±0.03	0.21×10^{6}	6.00±0.01	98.70
	52 b	Vaginal	0.1×10^{7}	6.00±0.11	0.5×10^{6}	5.70±0.00	94.98
L. fermentum	O	Camel Doogh	0.27×10^{8}	7.43±0.08	0.8×10^{8}	7.90±0.00	100.00
	F	PTCC 1638	0.4×10^{7}	6.60±0.00	0.63×10^{7}	6.80±0.00	100.00
L. acidophilus	La5	PTCC 1643	0.94×10^{7}	6.97±0.00	0.00	-	-

Values are expressed in mean ± standard deviation
- : no-Significant
Results are reported as the mean of two replicates

سویه‌های دیگر نیز زنده‌مانی بالایی داشتند به جز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از شیر با کد های M11،M 8 و *لاکتوباسیلوس گاسری* با منبع انسانی و کد49 و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 که بعد از تیمار ٤ ساعت در پلیت هیچ کلونی مشاهده نشد. طبق باور پژوهشگران سویه‌هایی که تحمل شرایط شیره معده و روده را ندارند می توانند از طریق کپسوله شدن از این محیط عبور کنند و به راحتی زنده بمانند [۳۱]. کاظمی و همکاران ۲۰۱٤ از روش کپسوله کردن توانستند سویه بومی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* KC 355240 را از شیره معده عبور دهند [۳۲]. در مورد آزمون آبگریزی یا تست چسبندگی، بیشترین میزان مربوط به سویه‌های *لاکتوباسیلوس گاسری* با منبع انسانی بود که در محدوده ٤۰/٥٤تا درصد٥٦/۱٥بودند. *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از روده کوچک با کد A7 و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از زیتون تخمیری با کد 21 به ترتیب ۳۰/۳۸، ۳۱/۸۰، ۳۹/٦۹ درصد، چسبندگی متوسط و بقیه سویه ها چسبندگی ضعیفی داشتند. یکی دیگر از ویژگی‌های مطلوب باکتری‌های پروبیوتیک، قابلیت کلونیزاسیون در دیوارهٔ روده است. بنابراین، قابلیت اتصال به اپیتلیوم روده (که به عنوان پیش‌شرط کلونیزاسیون شناخته می‌شود) یک شاخص و معیار بسیار مهم در زمان گزینش باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید [۳۳]. بارینو و همکاران در سال ۲۰۱۱ در پی مقایسهٔ ژنوم‌های متعلق به ۱۲ گونه از لاکتوباسیلوس‌ها به این نکته دست یافتند که سهم بسیار زیادی از کل پروتئین‌های سلولی (یعنی ۱۹/۹ الی ۲۹/۳ درصد) را پروتئین‌های سطحی سلول، ازجمله پروتئین‌های غشایی، تشکیل می‌دهند. به بیان مشخص، ژنوم‌های اعضای گروه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[4] (مثل *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس جانسونی*[5] و *لاکتوباسیلوس گاسری*)، که غالباً به عنوان مادهٔ پروبیوتیک مورد استفاده می‌باشند، شمار زیادی از پروتئین‌های حاوی LPXTG[6] را رمزگذاری می‌کنند. نتایج حاصل از برآوردها و بررسی‌ها حاکی از آن بود که نیمی از این پروتئین‌ها، دارای خاصیت اتصال به موکوس هستند [۳٤]. *لاکتوباسیلوس گاسری*، از بافت روده و همچنین، از حفرهٔ دهان، ناحیهٔ واژن، ادرار و خون انسان قابل استخراج است؛ و این بدان معناست که میان این باکتری و بدن انسان، پیوند و تعامل جدی وجود دارد. این سویه به علت دارا بودن تفاوت در میزان دی-آلانین و درصد گروه قند هگزوزی در لنگر کلیسرولیپید دیواره سلولی نسبت به منابع دیگر بیشترین قابلیت چسبندگی به سلول های اپیتلیوم روده را دارند [۳٥]. که یافته های ما در این مطالعه با نتیجه های پژوهشگران پیشین انطباق داشت.

در آزمون خود انبوهش همه سویه‌ها رسوب‌دهی متوسطی داشتند به جز سویه *لاکتوباسیلوس گاسری* 54C از واژینال، که رسوب دهی ضعیفی از خود نشان داد. بیشترین درصد خود انبوهش مربوط به لاکتوباسیلوس پلانتاروم پنیر لیقوان با کد LF 56 به میزان ۷٥ درصد بود. همچنین در تست هم‌انبوهش با باکتری‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلی*(O157:H7 NCTC 12900)، *سالمونلاانتریدیدیس* (ATCC 13076)، *لیستریا مونوسایتوژنز*(ATTC 7644) بیشترین رسوب‌دهی مربوط به *لاکتوباسیلوس گاسری* سویه انسانی با کد 54C روی *سالمونلاانتریدیدیس* به میزان ۳۳/٦۳ درصد، روی *اشرشیاکلی* ۳۱/۹۳ درصد و روی *لیستریا مونوسایتوژنز* ۱۲/۹۸ درصد بود. رسوب‌دهی بقیه سویه‌ها تقریبا در یک سطح بودند (شکل ۳). اثر خودانبوهش و هم انبوهش برای پروبیوتیک‌ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است؛ زیرا به نظر می‌رسد که قابلیت هم انبوهش با قابلیت اتصال به سلول‌های اپیتلیال در رابطه باشد [۳٦]. شایان ذکر است که قابلیت اتصال باکتری‌های پروبیوتیک به سلول‌های اپیتلیال، یکی از پیش‌شرایط کلونیزاسیون و بروز مقاومت نسبت به محیط اسیدی معده و محیط روده به شمار می‌آید. نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان داده‌اند که رسوب سلولی می‌تواند یک عامل مثبت در وقوع کلونیزاسیون برای میکروارگانیسم‌های مفید برای بدن باشد [۳۷].

4. Lactobacillus Acidophilus
5. Lactobacillus Johnsonii
6. LPXTG-motif (Leu-Pro-any-Thr-Gly)

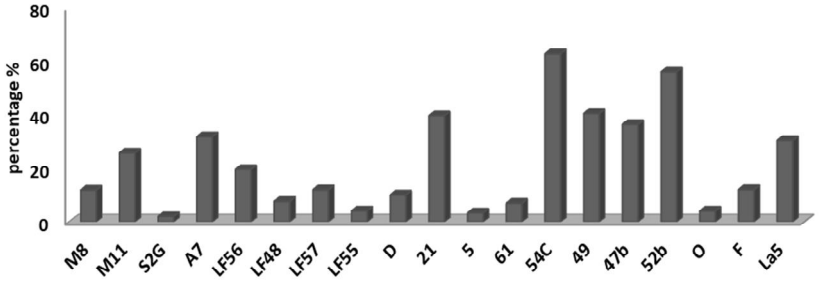

Fig 1 Surface hydrophobicity properties of LAB strains

علاوه بر این، هم انبوهش یک مکانیسم پروبیوتیکی بسیار مؤثر است که از اتصال پاتوژن‌ها به سطح سلول‌های اپیتلیال روده جلوگیری می‌کند [۳۸]. پژوهشگران نیز اظهار داشته‌اند که میان مشخصه‌های خود انبوهش و هم انبوهش با پاتوژن‌ها یک رابطهٔ همبستگی برقرار است. طبق تحقیق کامپانا و همکاران ۲۰۱۷، قابلیت هر کدام از سویه‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک در هم-انبوهش با پاتوژن‌ها و رقابت برای اتصال به سطح سلول‌های اپیتلیال روده کاملاً به هم مرتبط بودند؛ و این وابستگی را می‌توان به حضور برخی مولکول‌های خاص در سطح غشایی سویه‌های پروبیوتیک باکتری لاکتیک‌اسید نسبت داد که یا به عنوان لیگاند عمل می‌کنند و به پاتوژن‌ها متصل می‌شوند، و یا در نقش یک بَست یا چسب باعث اتصال آن سویه‌ها به سلول‌های اپیتلیال روده می‌گردند. دراین مطالعه سویه انسانی *لاکتوباسیلوس گاسری* بیشترین خاصیت چسبندگی و بیشترین خاصیت هم انبوهشی را از خود نشان داد که با نتایج کامپانا و همکاران تطابق داشت [۳۹].

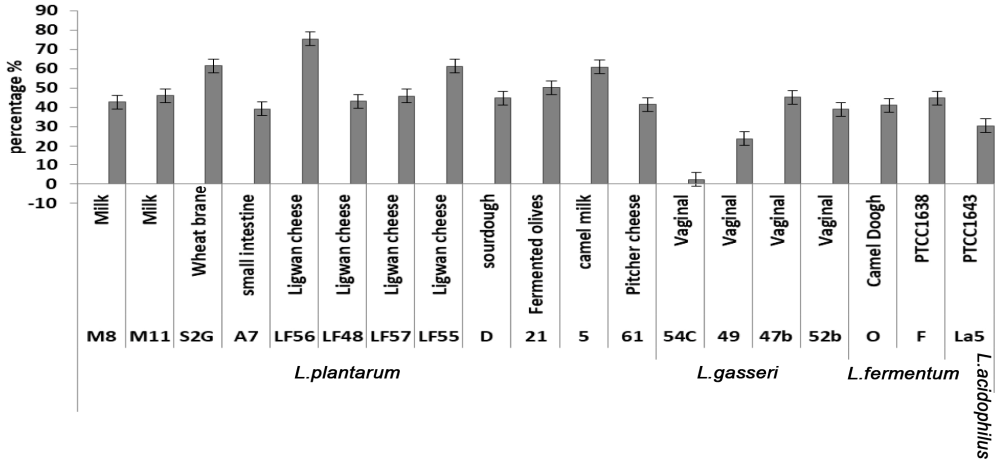

Fig 2 Percentages of auto-aggregation abilities of the different LAB strains

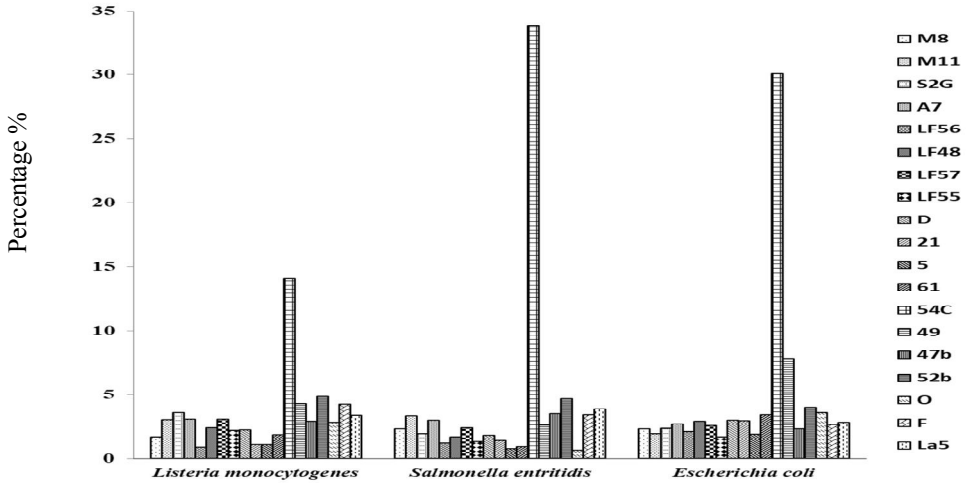

Fig 3 Comparison of co-aggregation abilities percentages among different LAB strains and intestinal pathogens

سویه‌های مختلف *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به آنتی‌بیوتیک‌های مورد آزمون حساس بودند به جز M 8 و M 11 که روی کانامایسین و کلرامفنیکل، LF55 روی آمپیسیلین، D روی کلرامفنیکل و 61 روی کانامایسین، تتراسایکلین و کلرامفنیکل مقاوم بودند. *لاکتوباسیلوس گاسری* روی آمپیسیلین، اریترومایسین و تتراساکلین مقاومت متوسط و *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* PTCC 1638 روی آمپی سیلین و اریترومایسین مقاومت خوبی از خود نشان داد (جدول زیر). مقاومت سویه‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها توسط روش حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) در دو تکرار تعیین شد و توسط نرم افزار اسلاید رایت رسم گردید جایی که نمودار رقت آنتی‌بیوتیک ها با نمودار شاهد همدیگر را قطع کنند به عنوان نقطه cut-off یا نقطه (MIC) در نظر گرفته شد. MIC *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جدا شده از شیر (M8) روی آمپی‌سیلین به میزان ۰/۱٤ تعیین شد که در شکل ٤ به طور نمونه آورده شده است. طبق نظر پژوهشگران پروبیوتیک‌هایی که مقاومت در برابر کلاسهای مختلف آنتی‌بیوتیکها از جمله گلیکوپپتیدها (ونکومایسین)، آمینوگلیکوزیدها (استرپتومایسین و جنتامایسین)، مونوکتات‌ها (آزترونام) و فلوئوروکینولون‌ها (سیپروفلوکساسین) دارند، نگرانی‌هایی را ایجاد می‌کنند زیرا مشخص شده است که عوامل مؤثر در مقاومت به آنتی‌بیوتیک قادر به انتقال از یک لاکتوباسیلوس به دیگری و از همه مهمتر، به گونه‌های دیگر از جمله عوامل بیماری‌زا مانند استافیلوکوک‌ها هستند [٤٠]. در حقیقت، باکتری‌های اسید لاکتیکی که می‌تواند در اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده‌ای از پاتوژن‌ها پیشی بگیرد و مانع از کلونیزاسیون آن‌ها در بافت روده شود؛ از بروز عفونت در بدن میزبان جلوگیری می‌کند [٤١]. برای آنکه ترکیبات پروبیوتیک بتوانند بر سیستم ایمنی و سلامت بدن میزان اعمال اثر داشته باشند، باید از طریق مکانیسم‌های رشد، تشکیل بیوفیلم یا رسوب خود را به روده برسانند. باید به این نکتهٔ مهم نیز اشاره کنیم که قابلیت رسوب‌دهی، یکی از خصوصیات مطلوب باکتری‌های پروبیوتیک به شمار می‌آید. علاوه بر این، میکروارگانیسم‌هایی که از قابلیت هم‌انبوهش با باکتری‌های دیگر، مثل پاتوژن‌ها، برخوردار هستند، نسبت به میکروارگانیسم‌های دیگری که این قابلیت را ندارند، ارجح می‌باشند؛ چرا که باکتری‌های فاقد این قابلیت، به راحتی از سلول‌های اپیتلیال روده جدا می‌شوند و به جای آن‌ها پاتوژن‌ها می‌توانند در بدن میزبان غلبه و تسلّط یابند [۳۹].

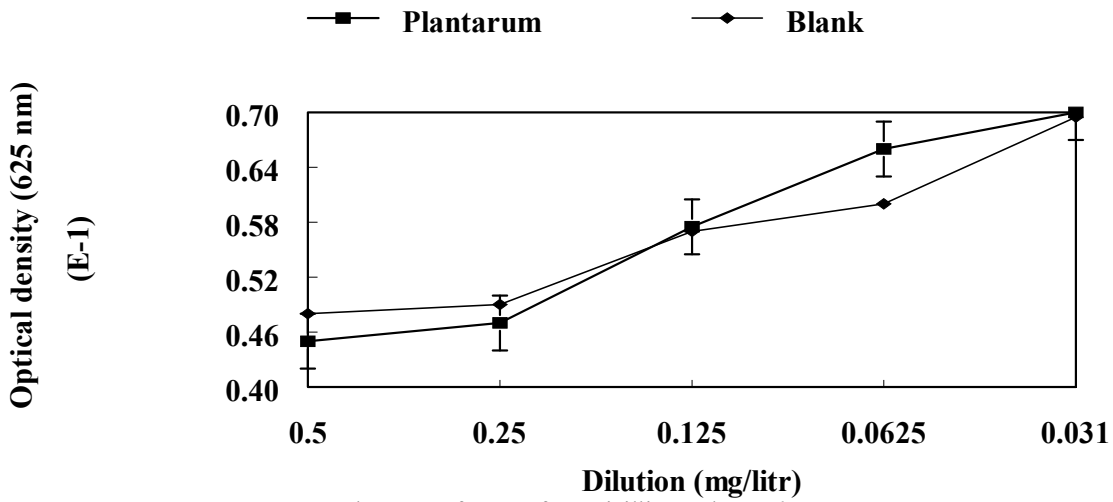

Fig 4 The zone of MIC of Ampicillin on the *L.plantarum* M8

Table 5 Minimum inhibitory concentration (MIC, mg/l) of 5 antibiotics on LAB strains (mean ± SD)

Species	Strains number	source	Ampicillin	kanamycin	Erythromycin	chloramphenicol	tetracycline
L.plantarum	M8	Milk	0.14±0.9	0.002±1.4	0.5±0.00	0.007±0	0.375±0.3
	M11	Milk	0.25±0.00	0.14±1.1	0.5±0.00	ND	0.031±0.00
	S2G	Wheat brane	0.37±2.1	0.25±0.00	0.25±0.00	ND	0.25±0.00
	A7	small intestine	0.31±1.2	0.12±0.00	0.125±0.00	ND	0.5±0.00
	LF56	Ligwan cheese	0.28±0.9	0.5±0.00	0.5±0.00	0.5	0.0175±1
	LF48	Ligwan cheese	0.25±0.00	0.5±0.00	0.25±0.00	0.0.25±0	0.5±0.00
	LF57	Ligwan cheese	0.03±0.00	0.5±0.00	0.31±0.085	ND	0.125±0.00
	LF55	Ligwan cheese	0.001±0.00	0.5±0.00	0.25±0.00	ND	0.015±0.00
	D	sourdough	0.03±0.00	0.5±0.00	0.25±0.00	0.001	0.125±0.00
	21	Fermented olives	0.37±2.1	0.5±0.00	0.5	0.5±0	0.5±0.00
	5	camel milk	0.12±0.00	0.12±0.00	0.125±0.00	ND	0.25±0.00
	61	Pitcher cheese	0.13±0.8	0.002±1.4	0.062±0.00	0.003±0	0.0024±0.00
L.gasseri	54C	Vaginal	0.12±0.9	0.5±0.00	0.25±0.00	ND	0.015±0.00
	49	Vaginal	0.015±0.00	0.5±0.00	0.015±0.00	0.5±0	0.031±0.00
	47b	Vaginal	0.28±0.9	0.5±0.00	0.5±0.00	ND	0.2655±1.2
	52b	Vaginal	0.5	0.5±0.00	0.125±0.00	ND	0.062±0.00
L.fermentum	O	Camel Doogh	0.02±2.00	0.5±0.00	0.005±1.13	ND	0.25±0.00
	f	PTCC1638	0.004±0.9	0.25±0.00	0.009±0.94	ND	0.125±0.00
L.acidophilus	La5	PTCC1643	0.19±2.1	0.03±0.00	0.25±0.00	ND	0.1405±1.00

Values are expressed in mean ± standard deviation
ND: No Detriment

٤-نتیجه گیری

سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیک که قابلیت مطلوبی در اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده داشته باشند، نسبت به باقی سویه‌ها بهتر می‌توانند در روده کلونی بسازند. این سویه‌ها در نقش یک مانع در برابر پاتوژن‌ها عمل می‌کنند و برای ایجاد این سد دفاعی، به مکانیسم‌های مختلفی مثل فعالیت ضدمیکروبی، هم‌رسوب‌دهی با پاتوژن‌ها و اتصال به سلول‌های اپیتلیال روده دسترسی دارند. از میان سویه‌های مختلف باکتری‌های اسید لاکتیکی که در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته‌اند، سویه‌های *لاکتوباسیلوس‌گاسری* جدا شده از واژینال (49A,54C)، *لاکتوباسیلوس‌پلانتاروم* جدا شده از زیتون تخمیری (21) و شیر(M8, M11) و LF 57 از پنیر لیقوان بهترین نامزد به عنوان سویه‌های پروبیوتیک به شمار می‌آیند؛ زیرا سطح فعالیت ضدمیکروبی در آن‌ها بالاست و همچنین، توان قابل‌ملاحظه‌ای در مهار عمل تهاجم در پاتوژن‌ها دارند. علاوه بر این، ترکیبات مختلف سویه‌های باکتریایی اسید لاکتیک می‌توانند مانع از بروز تهاجم از سوی پاتوژن‌ها شوند و این یافته، اهمیت توسعهٔ ترکیبات پروبیوتیک تخصصی و جدید برای ارتقای سیستم ایمنی و وضعیت سلامت بدن میزبان را تأیید می‌کند.

٥-منابع

[1] Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.A.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.J.E., Panagou, E.Z. and Tassou, C.C., 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food microbiology*, *33*(2), pp.282-291.

[2] Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D., 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource technology*, *97*(12), pp.1427-1430.

[3] M.Modzelewska-Kapituła,L.Kłębukowska,K.Kornacki,and W. Łukaszuk, 2008. "Characterization of probiotic properties of Lac-tobacillus strains," Polish Journal of Natural Sciences, 23(2), pp. 366–373.

[4] Itoh, H., Uchida, M., Sashihara, T., Ji, Z.S., Li, J., Tang, Q., Ni, S., Song, L. and Kaminogawa, S., 2011. Lactobacillus gasseri OLL2809 is effective especially on the menstrual pain and dysmenorrhea in endometriosis patients: randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Cytotechnology*, *63*(2), pp.153-161.

[5] Nouri, S., Nazeri, S., Hosseini, P., 2018. Biochemical and molecular virulence of the probiotic bacterium lactobacillus plantarum isolated from apple cider vinegar. Iran biology, 31(1), pp.79-92.

[6] Naghmouchi, K., Belguesmia, Y., Bendali, F., Spano, G., Seal, B.S. and Drider, D., 2019. Lactobacillus fermentum: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Critical reviews in food science and nutrition*, pp.1-13.

[7] Meijerink, M., Van Hemert, S., Taverne, N., Wels, M., De Vos, P., Bron, P.A., Savelkoul, H.F., van Bilsen, J., Kleerebezem, M. and Wells, J.M., 2010. Identification of genetic loci in Lactobacillus plantarum that modulate the immune response of dendritic cells using comparative genome hybridization. *PloS one*, *5*(5).

[8] Joint FAO/WHO Working Group and Joint FAO/WHO Working Group, 2002. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *London: World Health Organization, ON, Canada: Food and Agriculture Organization*

[9] Botta, C., Langerholc, T., Cencič, A. and Cocolin, L., 2014. In vitro selection and characterization of new probiotic candidates from table olive microbiota. *PLoS One*, *9*(4).

[10] Monteagudo-Mera, A., Rodríguez-Aparicio, L., Rúa, J., Martínez-Blanco, H., Navasa, N., García-Armesto, M.R. and Ferrero, M.Á., 2012. In vitro evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, *4*(2), pp.531-541.

[11] Giraffa, G., Chanishvili, N. and Widyastuti, Y., 2010. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in microbiology*, *161*(6), pp.480-487.

[12] Elmacı, S.B., Tokatlı, M., Dursun, D., Özçelik, F. and Şanlıbaba, P., 2015. Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from traditional pickles of the Çubuk region in Turkey. *Folia microbiologica*, *60*(3), pp.241-251.

[13] Conway, P.L., Gorbach, S.L. and Goldin,

B.R., 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, *70*(1), pp.1-12.
[14] Dickinson, B. and Surawicz, C.M., 2014. Infectious diarrhea: an overview. *Current gastroenterology reports*, *16*(8), p.399.
[15] Munot, K. and Kotler, D.P., 2016. Small intestinal infections. *Current gastroenterology reports*, *18*(6), p.31.
[16] Andersson, D.I. and Hughes, D., 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance?. *Nature Reviews Microbiology*, *8*(4), pp.260-271.
[17] Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S. and Calder, P.C., 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), pp.506-514.
[18] Yavuzdurmaz, H., 2007. *Isolation, characterization, determination of probiotic properties of lactic acid bacteria from human milk* (Master's thesis, Izmir Institute of Technology).
[19] Huang, Y. and Adams, M.C., 2004. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *91*(3), pp.253-260.
[20] Rehaiem, A., Belgacem, Z.B., Edalatian, M.R., Martínez, B., Rodríguez, A., Manai, M. and Guerra, N.P., 2014. Assessment of potential probiotic properties and multiple bacteriocin encoding-genes of the technological performing strain Enterococcus faecium MMRA. *Food Control*, *37*, pp.343-350.
[21] Campana, R., Federici, S., Ciandrini, E. and Baffone, W., 2012. Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus ATCC 4356 on the growth and adhesion/invasion characteristics of human Campylobacter jejuni. *Current microbiology*, *64*(4), pp.371-378.
[22] Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M. and Palenzona, D., 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of Bifidobacterium longum. *Letters in applied microbiology*, *31*(6), pp.438-442.
[23] Panel, E.F., 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Journal 2012; 10 (6): 2740, 10 pp.
[24] Molin, G., 2001. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to Lactobacillus plantarum 299v. *The American journal of clinical nutrition*, *73*(2), pp.380s-385s.
[25] Scheirlinck, I., Van der Meulen, R., Van Schoor, A., Huys, G., Vandamme, P., De Vuyst, L. and Vancanneyt, M., 2007. Lactobacillus crustorum sp. nov., isolated from two traditional Belgian wheat sourdoughs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, *57*(7), pp.1461-1467.
[26] Ahmadi Mamaghani, M. H., Alizadeh , A. and Soofi , M. 2020. Effect of ultrasound treatment on the viability of probiotics and physicochemical properties of synbiotic carrot juice. JFST No. 96, Vol. 16.
[27] Itoh, H., Sashihara, T., Hosono, A., Kaminogawa, S. and Uchida, M., 2011. Interleukin-12 inhibits development of ectopic endometriotic tissues in peritoneal cavity via activation of NK cells in a murine endometriosis model. *Cytotechnology*, *63*(2), pp.133-141.
[28] Rokhtabnak, N., Khaleghi, M. and Sasan, H.A., 2016. Isolation and identification of Lactobacillus bacteria with probiotic potential from traditional dairy in Kerman. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, *10*(1), pp.24-34.
[29] Chateau, N., Deschamps, A.M. and Sassi, A.H., 1994. Heterogeneity of bile salts resistance in the Lactobacillus isolates of a probiotic consortium. *Letters in Applied Microbiology*, *18*(1), pp.42-44.
[30] Rushdy, A.A. and Gomaa, E.Z., 2013. Antimicrobial compounds produced by probiotic Lactobacillus brevis isolated from dairy products. *Annals of microbiology*, *63*(1), pp.81-90.
[31] Tokatlı, M., Gülgör, G., Bağder Elmacı, S., Arslankoz İşleyen, N. and Özçelik, F., 2015. In vitro properties of potential probiotic indigenous lactic acid bacteria originating from

traditional pickles. *BioMed research international*, *2015*.

[32] M Kazemi Goraji, H Abbasi,LroozbehNasiraii and E Milani.2014. Influence of microencapsulation of indigenousprobiotic Lactobacillus plantarum on bacterial survival in simulated gastrointestinal conditions.researcher food science.27:1.183-191.

[33] Tomaro-Duchesneau, C., Jones, M.L., Shah, D., Jain, P., Saha, S. and Prakash, S., 2014. Cholesterol assimilation by Lactobacillus probiotic bacteria: an in vitro investigation. *BioMed research international*, *2014*.

[34] Barinov A, Bolotin A, Langella P, Maguin E, van de Guchte M.2011.Genomics of the genus Lactobacillus , Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom. p 3–32.

[35] Shiraishi, T., Yokota, S.I., Morita, N., Fukiya, S., Tomita, S., Tanaka, N., Okada, S. and Yokota, A., 2013. Characterization of a Lactobacillus gasseri JCM 1131T lipoteichoic acid with a novel glycolipid anchor structure. *Appl. Environ. Microbiol.*, *79*(10), pp.3315-3318.

[36] Atassi, F. and Servin, A.L., 2010. Individual and co-operative roles of lactic acid and hydrogen peroxide in the killing activity of enteric strain Lactobacillus johnsonii NCC933 and vaginal strain Lactobacillus gasseri KS120.

1 against enteric, uropathogenic and vaginosis-associated pathogens. *FEMS microbiology letters*, *304*(1), pp.29-38.

[37] Collado, M.C., Meriluoto, J. and Salminen, S., 2008. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, *226*(5), pp.1065-1073.

[38] Garriga, M., Rubio, R., Aymerich, T. and Ruas-Madiedo, P., 2015. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the Listeria monocytogenes adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Beneficial microbes*, *6*(3), pp.337-343.

[39] 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*(1), p.12.

[40] Mater, D.D., Langella, P., Corthier, G. and Flores, M.J., 2008. A probiotic Lactobacillus strain can acquire vancomycin resistance during digestive transit in mice. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *14*(1-3), pp.123-127.

[41] Abdel-Daim, A., Hassouna, N., Hafez, M., Ashor, M.S.A. and Aboulwafa, M.M., 2013. Antagonistic activity of Lactobacillus isolates against Salmonella typhi in vitro. *BioMed research international*, *2013*.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

In vitro evaluation of probiotic properties of 19 strains of *Lactobacillus gasseri, plantarum, acidophilus* and *fermentum* isolated from human and food sources

Hadinia, N. [1], Mobasharpour, P. [1], Hatami, S. [2], Edalatian Dovom, M. R. [3], Yavarmanesh, M. [4*]

1. M.Sc. Student, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology
2. Ph.D student, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology
3. Associate Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology
4. Associate Professor, Ferdowsi University of Mashhad, Faculty of Agriculture, Department of Food Science and Technology

ARTICIE INFO

Article History:

Received 04 March 2020
Accepted 01 November 2020

Keywords:

Lactic acid bacteria,
Probiotic characteristics,
Human sources,
Food sources,
Immune system.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.18

*Corresponding Author E-Mail: yavarmanesh@um.ac.ir

ABSTRACT

In the present study, simultaneous evaluation for the survival ability of probiotic bacteria at (pH) 2.5, viability in the presence of pepsin-pancreatin, resistance to bile salt, Adhesion ability, bacterial resistance against antibiotic substances with measuring of minimum inhibitory concentration, auto-aggregation and co-aggregation with interference of (*Escherichia coli* (NCTC 12900 O157:H7), *Salmonella enterica* (ATCC 13076) and *Listeria monocytogenes* (ATTC 7644)) were investigated. In the test of Acid tolerance, it was found that all the strains had high viability. Strains LF 56, LF 57, LF 55, O, F and strains LF 56, LF 57 and A7 showed that had the most resistant against pancreatin and in the presence of pepsin, respectively. Furthermore, all of the strains except LF56 were highly resistant to bile salts. Among the 19 strains, *Lactobacillus gasseri* had the highest adhesion ability (62.90%). Strain *Lactobacillus plantarum* LF 56 and *Lactobacillus gasseri* 54 C showed that had the highest potentials for auto-aggregation and co-aggregation (75.31% and 33%) on three pathogens, respectively. Several strains of *Lactobacillus plantarum* were sensitive to the studied antibiotic substance. However, strains M8 and M11 were resistant to Kanamycin and Chloramphenicol, and also, LF 55 and D showed high resistance against Ampicillin and Chloramphenicol, respectively. It was, moreover, found that Kanamycin, Tetracycline and Chloramphenicol had no significant influence on strains 61. It was demonstrated that *Lactobacillus gasseri* had medium resistance to Ampicillin, Erythromycin and Tetracycline, while *Lactobacillus fermentum* showed highly resistance to Ampicillin and Erythromycin. According to the results, *Lactobacillus gasseri* (54C,49A) gained the high scores in terms of probiotic properties as compared with other strains. Therefore, *Lactobacillus gasseri* can potentially protect epithelium tissue of intestine against pathogenic bacteria and it is a preferred candidate for prophylactic purposes, preventing of intestine infections and increasing of body immune system.