

اثر تنش حرارتی بر مقاومت دو سویه از باسیل‌های اسپورزا در مدل شبیه‌سازی دستگاہ گوارش و بررسی خواص پروبیوتیکی آنها

نسیم ادیب‌پور^۱، مرضیه حسینی‌نژاد^{۱*}، ابوالفضل پهلوانلو^۱

۱- گروه زیست‌فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

* نویسندهٔ مسئول (m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)

چکیده

در سال‌های اخیر استفاده از باکتری‌های اسپورزا در محصولات غذایی و دارویی پروبیوتیک به دلیل پایداری در شرایط تنش‌زای تولید و محیط بدن میزبان، بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. در تحقیق حاضر مقاومت دو سویهٔ باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در واکنش به تنش حرارتی و شرایط شبیه‌سازی دستگاہ گوارش، همچنین خاصیت تجمع و آب‌گریزی سطح سلول این سویه‌ها بررسی گردید. نتایج نشان داد که سویه‌های اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در مقابل تنش حرارتی و شرایط شبیه‌سازی دستگاہ گوارش مقاومت داشته و بیش از ۸۰ درصد از جمعیت هر دو سویه زنده‌مانی خود را حفظ کردند. از طرفی، سویهٔ باسیلوس کواگولانس در مقایسه با باسیلوس سابتیلیس از توانایی بیشتری در ویژگی خودتجمعی و هم‌تجمعی برخوردار بود، در حالی که هر دو سویه تمایل بالایی در چسبندگی به حلال‌های هیدروکربنی کلروفرم و اتیل استات از خود نشان دادند. این تحقیق در ادامه پژوهش‌های پیشین که با هدف فرمولاسیون و بهینه‌سازی پوشش خوراکی فراسودمند جهت تولید نبات پروبیوتیک با به‌کارگیری باسیلوس‌های اسپورزای پروبیوتیک انجام گردید، به منظور اطمینان از زنده‌مانی و اثربخشی سویه‌ها صورت پذیرفت.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۲۵
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۰/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶
تاریخ انتشار برخط: ۱۴۰۰/۰۲/۲۶

واژه‌های کلیدی

باسیلوس سابتیلیس
باسیلوس کواگولانس
پروبیوتیک
تنش حرارتی
شرایط شبیه‌سازی دستگاہ گوارش



مقدمه

می‌گردند (Mazkour, Shekarforoush, & Basiri, 2019). طی سال‌های اخیر پروبیوتیک‌های اسپورزا به دلیل پایداری در شرایط تنش‌زای فرایند مواد غذایی مانند دما و فشار بالا، مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند (Cutting, 2011). بررسی‌ها نشان می‌دهد که این باکتری‌ها در شرایط دستگاہ گوارش قابلیت زنده‌مانی بهتری دارند و علاوه بر آن از توانایی ماندگاری طولانی‌مدت در دمای اتاق، دمای یخچال، فریزر و شرایط خشک برخوردارند (Cutting, 2016; Haldar & Gandhi, 2011). همچنین با توجه به زنده‌مانی بیشتر آنها، میزان مورد نیاز این سویه‌ها در تهیهٔ

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر به تعداد کافی مصرف شوند با بهبود سیستم ایمنی بدن و توازن میکروبی دستگاہ گوارش اثرات مفیدی بر سلامت میزبان به‌جا می‌گذارند (FAO/WHO, 2002). این باکتری‌های مفید با جذب مواد مغذی، اتصال به سلول‌های اپیتلیال^۱ و تشکیل کُلنی در روده با باکتری‌های بیماری‌زا رقابت می‌کنند که به موجب آن در اکوسیستم روده غالب‌شده و منجر به تقویت سیستم ایمنی میزبان

^۱ Epithelial cells

حرارتی احتمال صدمه به دیواره اسپور باکتری را افزایش می‌دهد. همچنین تبدیل اسپور به فرم رویشی پیش از مصرف پروبیوتیک و کاهش زنده‌مانی باکتری در معرض شرایط اسیدی معده را امکان‌پذیر می‌سازد. بنابراین لازم است اثر تنش‌های فرایند بر اسپور سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی قرار گیرد.

در پژوهش حاضر، میزان بقای سویه‌های باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس به‌کاررفته در پوشش نبات پروبیوتیک (Adibpour, Hosseinezhad, & Pahlevanlo, 2019؛ ادیب‌پور و همکاران، ۱۳۹۹). پس از تحمل تنش حرارتی آب جوش و شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش بررسی‌شده و در ادامه خاصیت تجمع و آب‌گریزی سطح سلول این سویه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

کشت و شمارش باکتری‌های پروبیوتیک اسپورزا سویه‌های پروبیوتیکی باسیلوس کواگولانس Unique IS-2 و باسیلوس سابتیلیس UBBS-14 از شرکت UniqueBiotech (ساخت هند) خریداری شد. تمامی محیط‌های کشت و مواد شیمیایی استفاده‌شده از شرکت مرک (ساخت آلمان) تأمین گردید. به‌منظور شمارش اولیه سویه‌ها، مقدار ۰/۱ گرم از پودر اسپور هر باکتری به دقت توزین‌شده و پس از اعمال تیمار حرارتی ۹۵-۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه، نمونه‌ها رقیق‌سازی و به‌صورت سطحی به‌ترتیب در محیط کشت نوترینت آگار^۶ برای باسیلوس کواگولانس و تریپتیک سوی آگار^۷ برای باسیلوس سابتیلیس کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه قرار گرفتند (Poormontaseri, Hosseinzadeh, Shekarforoush, & Kalantari, 2017). جهت شمارش و تعیین زنده‌مانی سویه‌ها در هر آزمون، از سوسپانسیون هر باکتری پس از رقیق‌سازی کشت سطحی انجام و به مدت ۲۴-۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌گذاری شدند.

مکمل‌های پروبیوتیک کمتر است (Mingmongkolchai & Panbangred, 2018). برخلاف پروبیوتیک‌های جنس لاکتوباسیل که به فرم رویشی در محصولات تجاری مورد استفاده قرار گرفته و از تنش‌های شرایط محیطی تأثیر پذیرند (Hosseini Nezhad, Hussain, & Britz, 2015)، اسپور برخی سویه‌های باسیلوس که به‌عنوان پروبیوتیک استفاده می‌شوند در حالت رویشی فعال نبوده و به شکل خفته قرار دارند. جامع‌ترین گونه‌های مورد بررسی باسیلوس‌های تشکیل‌دهنده اسپور شامل باسیلوس لیکنیفرمیس^۱، باسیلوس سابتیلیس^۲، باسیلوس کواگولانس^۳، باسیلوس کلازی^۴ و باسیلوس سرئوس^۵ می‌باشند، ولی از صدها مورد شناخته‌شده باسیلوس، تنها باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس به‌عنوان پروبیوتیک قابل‌مصرف برای انسان پذیرفته شده‌اند (Adibpour, Hosseinezhad, Pahlevanlo, & Hussain, 2019). استفاده از پروبیوتیک‌های اسپورزا به‌دلیل پایداری بیشتر نسبت به سویه‌های رویشی، در محصولات غذایی که به‌دلیل ساختار و ماهیت خود و یا نحوه فرایند آنها با به‌کارگیری حرارت و شرایط تنش‌زا همراهند، به‌ویژه محصولات خشک غیرلبنی (مانند نبات)، از گستردگی روزافزون برخوردار است (Adibpour, Hosseinezhad, & Pahlevanlo, 2019).

در پژوهش‌های پیشین بهینه‌سازی فرمولاسیون پوشش خوراکی و بررسی خواص فیزیکی، رئولوژیکی و بافتی این پوشش در تولید محصول نبات پروبیوتیک به‌عنوان یک شیرین‌کننده فراسودمند، با به‌کارگیری دو سویه از باسیلوس‌های پروبیوتیک اسپورزا و زنده‌مانی سویه‌ها طی مدت ۶ ماه مورد بررسی قرار گرفت (Adibpour, Hosseinezhad, & Pahlevanlo, 2019). ادیب‌پور، حسینی‌نژاد و پهلوانلو، (۱۳۹۹). از آنجاکه به‌طور معمول مصرف محصول نبات به‌عنوان شیرین‌کننده سنتی و دارویی همراه آب، چای و نوشیدنی‌های گرم صورت می‌پذیرد، سویه‌های پروبیوتیک استفاده‌شده به هنگام مصرف با تنش حرارتی مواجه هستند. تنش

¹ *Bacillus licheniformis*

² *Bacillus subtilis*

³ *Bacillus coagulans*

⁴ *Bacillus clausii*

⁵ *Bacillus cereus*

⁶ Nutrient agar

⁷ Tryptic soy agar

تازه از باکتری، در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه، تا رسیدن به دانسیته نوری ۰/۵ (OD600nm) گرم‌خانه‌گذاری گردید. همچنین از کشت فریز شده از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *اشریشیا کلی*^۹ ۱۳۳۰ و *سالمونلا انتریکا*^{۱۰} (ATCC ۱۰۷۰۸) به ترتیب در محیط کشت‌های ال‌بی برات^{۱۱} و نوترینت برات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت‌داده و تا رسیدن به دانسیته نوری ۰/۵ (OD600nm) فعال‌سازی شدند. سلول‌ها با استفاده از سانتریفیوژ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه (معادل ۹۱۰۰ دور در دقیقه) به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد از محیط کشت جداسازی، سپس دو مرتبه با استفاده از بافر فسفات سالین^{۱۲} با pH=۷/۳ شست‌وشو و دوباره سانتریفیوژ و سپس مطابق دانسیته نوری ۰/۵ در بافر فسفات با pH=۷/۳ به حالت تعلیق^{۱۳} درآمدند. برای آزمون خودتجمعی^{۱۴}، مقدار ۴ میلی‌لیتر از هر باکتری و برای آزمون هم‌تجمعی^{۱۵} مخلوطی حاوی ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سویه پروبیوتیک و ۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون سویه بیماری‌زا، به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به حالت سکون قرار گرفتند. دانسیته نوری (OD600nm) مایع رویی هر نمونه در لحظه اول به‌عنوان A₀ و پس از آن در ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۲۴ ساعت با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Visible (ChromTech، ساخت تایوان) تعیین گردید. پتانسیل خودتجمعی و هم‌تجمعی با استفاده از رابطه‌های (۱) و (۲) محاسبه شدند (Pandey, Shinde, & Vakil, 2015).

رابطه (۱)

$$[(A_0 - A_t) / A_0] \times 100 = \text{درصد خودتجمعی}$$

در رابطه (۱)، A₀: جذب در لحظه اول (صفر ساعت)

و A_t: جذب در ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶ و ۲۴ ساعت می‌باشد.

رابطه (۲)

$$[(A_x + A_y) / 2 - A(x+y)] / [(A_x + A_y) / 2] = \text{درصد هم‌تجمعی}$$

ارزیابی مقاومت باکتری به اسید و صفرا در مدل شبیه‌سازی دستگاه گوارش در معرض استرس حرارتی مقدار ۱ گرم از پودر لیوفلیزه باکتری‌های پروبیوتیک اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس، پس از قرار گرفتن در آب جوش و کاهش تدریجی دما به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد (به‌عنوان مدل‌سازی شرایط مصرف نبات پروبیوتیک در نوشیدنی گرم) در معرض شیره شبیه‌سازی‌شده معده (حاوی ۳ گرم بر لیتر آنزیم پپسین^۱ در محلول ۰/۲ درصد نمک طعام^۲ که pH آن توسط اسید کلریدریک^۳ ۵ مولار روی ۲/۵-۲ تنظیم شد) تحت دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و با فواصل زمانی معین عمل نمونه‌برداری و شمارش تعداد سلول‌های زنده براساس روش کشت، انجام شد. در ادامه، سویه‌های پروبیوتیکی در معرض شرایط شبیه‌سازی شیره روده (حاوی ۱ گرم بر لیتر آنزیم پانکراتین^۴ در محلول ۰/۱ مولار فسفات پتاسیم^۵ و ۲ درصد حجمی/حجمی نمک‌های صفراوی^۶ که pH آن با محلول ۱ مولار هیدروکسید سدیم^۷ روی ۸/۵-۸ تنظیم شده بود) قرار گرفت. هم‌زمان نمونه شاهد بدون تیمار آب جوش (شرایط کنترل) جهت مقایسه نتایج تهیه و در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش قرار داده شد. زنده‌مانی سویه‌ها در زمان‌های ۰، ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه، پس از نمونه‌برداری دوره‌ای با فواصل زمانی معین و رقت‌سازی، در محیط‌های کشت نوترینت آگار برای باسیلوس کواگولانس و تریپتیک سوی آگار برای باسیلوس سابتیلیس، مطابق روش کشت هر باکتری بررسی گردید (Ozdemir & Floros, 2001).

ارزیابی توانایی تجمع سویه‌های پروبیوتیک

برای سنجش تجمع^۸ باکتری، از کشت فریز شده از باکتری باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس به ترتیب در محیط‌های کشت نوترینت برات و تریپتیک سوی برات تلقیح و به‌منظور فعال‌سازی و تهیه کشت

¹ Pepsin

² NaCl

³ HCl

⁴ Panceratin

⁵ KH₂PO₄

⁶ Ox-bile

⁷ NaOH

⁸ Aggregation

⁹ *Escherichia coli*

¹⁰ *Salmonella enterica*

¹¹ Luria-Bertani broth

¹² Phosphate Buffer Saline (PBS)

¹³ Suspend

¹⁴ Autoaggregation

¹⁵ Coaggregation

در رابطه (۳)، A_{540} initial جذب اولیه سوسپانسیون باکتری و A_{540} aqueous phase جذب فاز آبی پس از جداسازی فازی می‌باشد.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج بر پایه طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و مقایسه میانگین‌ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۴ و رسم نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۱۳ انجام شد.

نتایج و بحث

ارزیابی مقاومت باکتری پروبیوتیک در مقابل اسید و صفرا در مدل شبیه‌سازی دستگاه گوارش

در این پژوهش جهت اطمینان از اثرات پروبیوتیکی **جدول (۱)**، (۲) و (۳) نتایج زنده‌مانی سویه‌ها در مقابل اسید و صفرا در مدل شبیه‌سازی دستگاه گوارش را نشان می‌دهد. براساس این نتایج سویه‌های باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در دمای آب جوش و کنترل، زنده‌مانی قابل‌قبولی در هر سه شرایط اسید، صفرا و اسید-صفرا در شبیه‌سازی دستگاه گوارش از خود نشان دادند (**جدول ۱**، ۲ و ۳). به‌طوری‌که باسیلوس کواگولانس پس از قرارگیری در آب جوش و در شرایط شبیه‌سازی معده، روده و معده-روده به ترتیب ۸۵/۹۵، ۸۶/۸۹ و ۸۷/۰۳ درصد زنده‌مانی نشان داد (**جدول ۴**). این سویه در حالت کنترل در شرایط ذکرشده به ترتیب ۹۴/۱۵، ۹۵/۴۸ و ۹۲/۱۵ زنده‌مانی داشت. همچنین باکتری باسیلوس سابتیلیس پس از حرارت‌دهی در آب جوش و قرارگرفتن در شرایط شبیه‌سازی معده، روده و معده-روده به ترتیب ۸۷/۶۵، ۸۶/۶۸ و ۸۲/۶۹ درصد زنده‌مانی خود را حفظ کرد. در رابطه با باکتری باسیلوس سابتیلیس در نمونه‌های کنترل، در شرایط شبیه‌سازی معده پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه، ۴/۱۲ درصد افزایش در شمارش باکتری‌های زنده در محیط در مقایسه با تعداد اولیه شمارش‌شده در زمان صفر مشاهده شد. نتایجی

در رابطه (۲)، x و y نشانگر جذب سویه‌های پروبیوتیک و بیماری‌زا در لوله‌های کنترل و $(x+y)$ نشان‌دهنده جذب مخلوط آنها می‌باشد.

سنجش آب‌گریزی سطح باکتری

تعیین میزان آب‌گریزی^۱ سطح سلولی (چسبندگی سلول باکتری به حلال^۲) با توجه به توانایی میکروارگانیسم‌ها جهت انتقال از محلول بافر فسفات به حلال هیدروکربنی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور، باکتری‌های باسیلوس کواگولانس و سالمونلا انتریکا در محیط کشت نوترینت برات^۳ و باسیلوس سابتیلیس و اشریشیاکلی به ترتیب در محیط کشت‌های تریپتیک سوی برات و ال بی برات به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون میکروبی در سانتریفیوژ با سرعت ۹۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفته و ته‌نشست سلولی با استفاده از بافر فسفات سالین با $pH=7/3$ دوبار شست‌وشو و پس از سانتریفیوژ مجدد، دانسیته نوری توده زیستی هر باکتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر روی $A_{600} = 0/5$ تنظیم شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری به ۱ میلی‌لیتر از حلال هیدروکربنی (کلروفرم^۴، اتیل استات^۵ و زایلن^۶) افزوده و به مدت ۲ دقیقه با ورتکس مخلوط گردید. نمونه‌ها جهت جداسازی فاز به مدت ۳۰ دقیقه به حالت سکون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رها شده و در ادامه دانسیته نوری فاز آبی اندازه‌گیری و با مقدار اولیه مورد مقایسه قرار گرفت (Meidong et al., 2018). آب‌گریزی باکتری مطابق با رابطه (۳) محاسبه شد.

رابطه (۳)

$$\text{رابطه (۳)} = \frac{A_{540} \text{ initial} - A_{540} \text{ aqueous phase}}{A_{540} \text{ initial}} \times 100 = \text{درصد آب‌گریزی}$$

^۱ Hydrophobicity

^۲ Microbial Adhesion to Solvent (MATS)

^۳ Absorbance

^۴ Chloroform

^۵ Ethyl acetate

^۶ Xylen

از آنها به حالت اسپور باقی‌مانده و قابل‌شمارش نبودند. باتوجه‌به اینکه در شبیه‌سازی شرایط معده-روده ابتدا باکتری وارد محیط اسیدی معده شده و پس از گذشت ۲ ساعت وارد شرایط صفراوی دستگاه گوارش می‌شود، نتایجی تقریباً مشابه محیط اسیدی در شرایط معده-روده‌ای یعنی ۳/۸۹ درصد مشاهده گردید. این نتیجه نشان می‌دهد که اسپورهایی که در اسید معده فعال شده‌اند بعد از آن تقریباً زنده‌مانی خود را با وجود باقی‌ماندن به مدت ۱۲۰ دقیقه در شرایط شبیه‌سازی روده حفظ کردند.

مشابه برای این باکتری در شرایط شبیه‌سازی معده-روده یعنی ۳/۸۹ درصد افزایش در تعداد باکتری نسبت به تعداد اولیه ملاحظه گردید. افزایش تعداد باکتری به‌دست‌آمده برای باسیلوس سابتیلیس را می‌توان به احتمال جوانه‌زنی اسپورها و فعال‌شدن آنها تحت‌شرایط اسیدی معده نسبت داد. مطابق دستورالعمل برای شمارش کامل باکتری‌های اسپورزای به‌کاررفته در این پژوهش، حرارت‌دهی اسپورها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای حداقل ۹۰ درجه سانتی‌گراد ضروری بود؛ در نتیجه درحالی‌که اسپورها بدون حرارت‌دهی وارد شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش شده‌اند ممکن است تعدادی

جدول ۱- بررسی زنده‌مانی* سویه‌های باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در شرایط شبیه‌سازی شده معده (pH=۲) در دو تیمار آب جوش و کنترل

باسیلوس کواگولانس		باسیلوس سابتیلیس		زمان (دقیقه)
آب جوش	کنترل	آب جوش	کنترل	
۱۳/۹۶±۰/۴۹ ^a	۱۳/۵۱±۰/۳۰ ^a	۱۳/۲۹±۰/۲۷ ^a	۱۳/۵۹±۰/۱۳ ^b	۰
۱۲/۶۹±۰/۱۵ ^b	۱۲/۷۵±۰/۱۷ ^b	۱۲/۶۱±۰/۰۲ ^b	۱۴/۰۲±۰/۸۳ ^{ab}	۱۰
۱۲/۶۵±۰/۰۵ ^b	۱۲/۷۶±۰/۱۲ ^b	۱۲/۴۹±۰/۰۲ ^b	۱۴/۱۸±۰/۰۳ ^a	۳۰
۱۲/۲۹±۰/۱۵ ^c	۱۲/۷۲±۰/۲۱ ^b	۱۲/۵۰±۰/۰۶ ^b	۱۴/۱۴±۰/۰۳ ^a	۶۰
۱۲/۰۹±۰/۰۸ ^d	۱۲/۶۶±۰/۲۵ ^b	۱۱/۸۹±۰/۱۰ ^c	۱۳/۹۸±۰/۷۰ ^{ab}	۹۰
۱۲±۰/۱۰ ^d	۱۲/۷۲±۰/۱۳ ^b	۱۱/۶۵±۰/۰۷ ^c	۱۴/۱۶±۰/۲۰ ^a	۱۲۰

* میانگین±انحراف معیار

حروف متفاوت بیانگر معنی‌داری در طول زمان برای هر باکتری است ($P < 0.05$). مقادیر براساس لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بیان شده است.

جدول ۲- بررسی زنده‌مانی* پروبیوتیک‌های اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در شرایط شبیه‌سازی شده روده (pH=۸/۵) در دو تیمار آب جوش و کنترل

باسیلوس کواگولانس		باسیلوس سابتیلیس		زمان (دقیقه)
آب جوش	کنترل	آب جوش	کنترل	
۱۳/۹۶±۰/۴۹ ^a	۱۳/۵۱±۰/۳۰ ^a	۱۳/۲۹±۰/۲۷ ^a	۱۳/۵۹±۰/۱۳ ^b	۰
۱۱/۹۹±۰/۱۳ ^b	۱۲/۹۶±۰/۳۳ ^b	۱۱/۸۳±۰/۰۸ ^b	۱۴/۵۷±۰/۰۶ ^a	۱۰
۱۱/۹۶±۰/۱۷ ^b	۱۲/۹۸±۰/۲۳ ^b	۱۱/۶۷±۰/۰۶ ^b	۱۳/۳۱±۰/۱۰ ^b	۳۰
۱۲/۰۹±۰/۷۶ ^b	۱۳/۰۵±۰/۱۲ ^b	۱۱/۵۹±۰/۱۱ ^b	۱۲/۷۳±۰/۰۴ ^c	۶۰
۱۱/۹۹±۰/۱۹ ^b	۱۲/۹۴±۰/۲۸ ^b	۱۱/۵۴±۰/۰۵ ^b	۱۲/۷۵±۰/۱۸ ^c	۹۰
۱۲/۱۳±۰/۲۴ ^b	۱۲/۹۰±۰/۲۹ ^b	۱۱/۵۲±۰/۰۴ ^b	۱۲/۷۷±۰/۲۳ ^c	۱۲۰

* میانگین±انحراف معیار

حروف متفاوت بیانگر معنی‌داری در طول زمان برای هر باکتری است ($P < 0.05$). مقادیر براساس لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بیان شده است.

جدول ۳- بررسی زنده‌مانی* پروبیوتیک‌های اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در شرایط شبیه‌سازی شدهٔ معده- روده در دو تیمار آب جوش و کنترل

باسیلوس کواگولانس		باسیلوس سابتیلیس		زمان (دقیقه)
آب جوش	کنترل	آب جوش	کنترل	
۱۲/۱۹±۰/۲۵ ^a	۱۲/۵۰±۰/۲۵ ^a	۱۱/۰۵±۰/۰۹ ^a	۱۴/۱۲±۰/۱۴ ^a	۱۰
۱۲/۲۵±۰/۱۹ ^a	۱۲/۵۵±۰/۱۰ ^a	۱۱/۰۴±۰/۱۳ ^a	۱۴/۱۱±۰/۰۹ ^a	۳۰
۱۲/۳۴±۰/۲۶ ^a	۱۲/۴۸±۰/۱۶ ^a	۱۱/۰۲±۰/۰۶ ^a	۱۴/۱۳±۰/۱۱ ^a	۶۰
۱۲/۲۶±۰/۴۵ ^a	۱۲/۴۵±۰/۳۲ ^a	۱۱/۰۴±۰/۱۳ ^a	۱۴/۰۹±۰/۱ ^a	۹۰
۱۲/۱۵±۰/۱۸ ^a	۱۲/۴۵±۰/۵۲ ^a	۱۰/۹۹±۰/۰۹ ^a	۱۴/۱۲±۰/۱۵ ^a	۱۲۰

* میانگین ± انحراف معیار

حروف یکسان بیانگر عدم معنی‌داری در طول زمان برای هر باکتری است ($P < 0.05$). مقادیر براساس لگاریتم واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر بیان شده است.

جدول ۴- درصد زنده‌مانی* سویه‌های باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس در شرایط شبیه‌سازی معده، روده و معده-روده

باسیلوس کواگولانس		باسیلوس سابتیلیس		زمان (دقیقه)
آب جوش	کنترل	آب جوش	کنترل	
۸۶/۰۱±۲/۳ ^a	۹۴/۱۶±۱/۱۳ ^b	۸۷/۶۷±۱/۲۵ ^a	۱۰۴/۱۹±۰/۴۷ ^a	A
۸۶/۹۲±۱/۳۳ ^a	۹۵/۴۸±۰/۰۲ ^a	۸۶/۷±۱/۴۶ ^a	۹۳/۹۶±۰/۷۹ ^b	B
۸۷/۰۷±۱/۷۶ ^a	۹۲/۱۲±۱/۸ ^c	۸۲/۷±۱ ^b	۱۰۳/۸۹±۰/۱ ^a	C

(A) زنده‌مانی بعد از ۱۲۰ دقیقه در شرایط معده (درصد)، (B) زنده‌مانی بعد از ۱۲۰ دقیقه در شرایط روده (درصد) و (C) زنده‌مانی بعد از ۲۴۰ دقیقه در شرایط معده-روده (درصد)

* میانگین ± انحراف معیار

حروف متفاوت بیانگر معنی‌داری در هر ستون است ($P < 0.05$).

و همکاران (۲۰۱۹) پس از استفاده از اسپوره‌های باسیلوس کواگولانس MTCC 5856 در چای و قهوه دم‌کرده، زنده‌مانی سویه در محیط دستگاه گوارش را مورد بررسی قرار دادند. لذا در تحقیق حاضر ویژگی‌های پروبیوتیکی سویه‌های اسپورزا پس از اعمال تنش مجدد مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی شرایط شبیه‌سازی شدهٔ دستگاه گوارش نشان داد که باسیلوس‌های اسپورزای پروبیوتیک قادر خواهند بود در دستگاه گوارش به فرم رویشی تبدیل شده و اثرات پروبیوتیکی خود را ایفا نمایند. در این راستا مطالعه‌های انجام‌شده روی حیوانات آزمایشگاهی نیز نشان می‌دهد که با تزریق دوزهای مختلف سوسپانسیون اسپوره‌های باسیلوس سابتیلیس به صورت خوراکی به موش‌ها و سپس آنالیز نمونه‌های مدفوع آنها، تعداد کل اسپوره‌های دفع شده ۶ برابر بیشتر از تعداد اسپوره‌های خورنده شده به حیوان بود. این نشان می‌دهد که اسپورها جوانه زده و تکثیر شده‌اند و بار دیگر در روده به فرم اسپور تبدیل شده‌اند (Hoa et al., 2001). Cutting و Casula (۲۰۰۲)

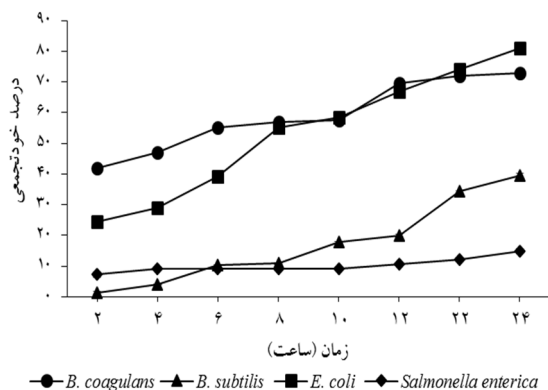
برخلاف پروبیوتیک‌های نوع لاکتوباسیلوس که به فرم رویشی در محصولات تجاری مورد استفاده قرار می‌گیرند، اسپوره‌های باسیلوس‌های پروبیوتیک به صورت خفته و غیررویشی زیست‌داشته و لذا می‌توانند شرایط تنش‌زای فرایند مواد غذایی را تحمل کرده و تا زمان مصرف به شکل غیرفعال از زنده‌مانی لازم برخوردار بمانند. این تحقیق با هدف اطمینان یافتن از اثرات پروبیوتیکی و ارزیابی زنده‌مانی پروبیوتیک‌های اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس که در تهیهٔ نبات پروبیوتیک (Adibpour, Hosseini-zhad, & Pahlevanlo, 2019؛ ادیب‌پور و همکاران، ۱۳۹۹) مورد استفاده قرار گرفته بودند، پس از تحمل تنش حرارتی و ورود به شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش و نیز بررسی توانایی تجمع سویه‌های پروبیوتیکی در روده و آب‌گریزی سطح سلول انجام شد. سویه‌های تجاری پروبیوتیک پس از ورود به شرایط تنش‌زای تولید و یا مصرف برخی محصولات غذایی ممکن است دچار تغییراتی در ویژگی‌های پروبیوتیکی خود شوند. Majeed

کامپیوتری از شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش انسان بزرگسال در حضور مواد غذایی خاص که باعث تحریک و به حداکثر رساندن جوانه‌زنی شد، ارزیابی کردند. هر دو بخش دستگاه گوارش فوقانی (معدده و روده کوچک) و کولون مدل‌سازی گردید. علاوه بر آن، نمونه‌های غذایی حاوی اسپوره‌های این سویه دیالیز شده و با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی^۴ مقدار متابولیت میکروبی و محصولات ناشی از فرایند هضم تولید شده توسط سلول‌های جوانه‌زده موردسنجش قرار گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که زنده‌مانی سویه‌ها پس از گذر از محفظهٔ معدده به میزان قابل‌ملاحظه‌ای (۹۷ درصد) حفظ شده بود و درحالی‌که بخش عمده‌ای از سلول‌ها هنوز در فرم اسپور (۷۶ درصد) باقی‌مانده بودند. این امر نشان‌دهندهٔ آن است که جوانه‌زنی برای تعداد کمی از اسپوره‌های ورودی در این بخش ایجاد شده و اسپوره‌های جوانه‌زده بقای خود را نیز حفظ کرده‌اند. زنده‌مانی پس از عبور کامل از طریق بخش معدده و رودهٔ کوچک به‌طور متوسط ۵۱ درصد بود، به این معنی که به‌طور متوسط نیمی از اسپوره‌های خوراکی روی محیط کشت جامد مشاهده و شمارش شد. ۲۴ ساعت پس از شروع آزمایش، جوانه‌زنی در محیط شبیه‌سازی کولون افزایش یافت به‌طوری‌که تا ۹۷ درصد سلول‌های رویشی و فقط ۳ درصد اسپور شناسایی شد. هیچ کاهش در زنده‌مانی باکتری در محیط کولون مشاهده نشد. در رابطه با فعالیت متابولیک باکتری، افزایش غلظت آمینو اسیدها، دی‌پتیدها و متابولیت‌های چرخهٔ اسید سیتریک در مقایسه با آزمایش اجرا شده در غیاب باسیلوس کوآگولانس BC30، مشاهده گردید (Keller *et al.*, 2019). علاوه بر این، در سال ۲۰۱۹ پژوهشی روی تأثیرات ترکیبی اسپوره‌های سویهٔ پروبیوتیک باسیلوس سابتیلیس و باسیلوس کوآگولانس بر میکروفلور روده و عملکرد رشد در موش‌های صحرایی موردبررسی قرار گرفت. پروبیوتیک‌های فوق به‌طور قابل‌توجهی تعداد باکتری‌های هوازی، باکتری‌های اسید لاکتیک و اسپور را افزایش و منجر به کاهش قابل‌توجه در تعداد باکتری‌های بی‌هوازی و کلی‌فرم^۵ شدند. همچنین، نتایج حاکی از

برای بررسی عملکرد اسپور باسیلوس‌های پروبیوتیک، نحوهٔ جوانه‌زنی اسپور را در مدل دستگاه گوارش موش مورد مطالعه قرار دادند. این محققان با استفاده از یک ژن مهندسی شده به نام *ftsH-lacZ* که به شدت در سلول‌های رویشی قابلیت بیان دارد آزمونی رقابتی را طراحی کردند. با استفاده از این روش، با تزریق دوزهای اسپور حاوی ژن *ftsH-lacZ* به گروه‌های مشخصی از موش ملاحظه گردید که اسپورها در تعداد قابل‌توجهی در ژنوم^۱ و ایلئوم^۲ (بخش‌های مختلف روده) جوانه‌زنی می‌کنند. تعداد سلول‌های رویشی تشخیص داده شده در روده (۱۰^۲ سلول رویشی) حاکی از آن است که اسپورها ممکن است در رودهٔ کوچک برای مدتی حتی کوتاه استقرار یابند (Casula & Cutting, 2002).

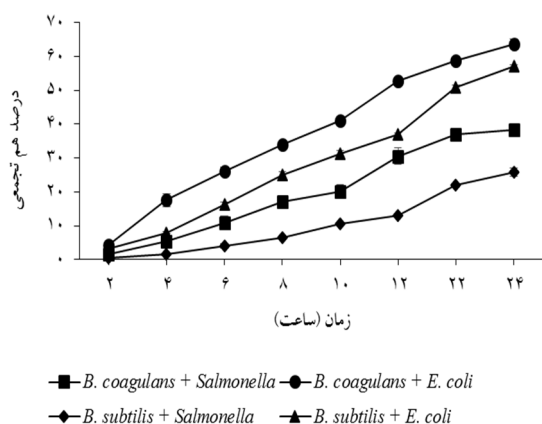
Woodward و La Ragione, Cartman (۲۰۰۸) جوانه‌زنی اسپوره‌های باسیلوس سابتیلیس SC2362 را در دستگاه گوارش جوجه مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه اسپوره‌های خورنده شده به جوجه‌های گوشتی در دستگاه گوارش جوجه جوانه زدند. علاوه بر این، ۲۰ ساعت پس از مصرف اسپور، سلول‌های رویشی بیش از اسپور در سراسر دستگاه گوارش بود. سلول‌های رویشی باسیلوس سابتیلیس موجود در دستگاه گوارش جوجه با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در زمان دقیق^۳ (RT-PCR) ارزیابی و شناسایی شد. سلول‌های رویشی شناسایی شده در این مطالعه یا باید از ابتدا وارد سیستم گوارش شده باشند و یا در اثر جوانه‌زنی و رشد اسپوره‌های مصرف شده حاصل شده باشند (Setlow, 2003). این مشاهده ثابت می‌کند که اگرچه پروبیوتیک‌های اسپورزا به‌طور معمول در هنگام مصرف در حالت خواب و غیرفعال قرار دارند؛ ممکن است در دستگاه گوارش جوانه‌زنی و از طریق مکانیسم‌هایی که نیاز به فعال شدن متابولیک دارند، عمل کنند (Cartman *et al.*, 2008). Farmer, Cash, Verbruggen, Keller. (۲۰۱۹) Venema جوانه‌زنی، بقا و فعالیت متابولیک اسپوره‌های پروبیوتیک تجاری باسیلوس کوآگولانس BC30 Ganeden را در یک مدل پویا و تحت کنترل

¹ Jejunum² Ileum³ Real time PCR⁴ LC-mass/mass⁵ Coliform



شکل ۱- توانایی خودتجمعی سویه‌های جنس باسیلوس و سویه‌های بیماری‌زا

براساس نتایج شکل (۲)، ملاحظه می‌شود که پتانسیل هم‌تجمعی باسیلوس کوآگولانس با هر کدام از سویه‌های بیماری‌زا (اشریشیاکلی و سالمونلا انتریکا) در مقایسه با باسیلوس سابتیلیس طی مدت ۲۴ ساعت بالاتر است، اگرچه هر دو باکتری قدرت هم‌تجمعی بیشتری با اشریشیاکلی (به ترتیب ۶۳/۷۳ و ۵۷/۰۷ درصد) در مقایسه با سالمونلا انتریکا (به ترتیب ۳۸/۳۹ و ۲۵/۸۱ درصد) نشان دادند. توانایی هم‌تجمعی بیشتر میان سویه بیماری‌زای اشریشیاکلی با سویه‌های باسیلوس می‌تواند به علت توانایی بالای این باکتری در خودتجمعی آن باشد.



شکل ۲- توانایی هم‌تجمعی سویه‌های جنس باسیلوس با سویه‌های بیماری‌زا

تشکیل کُلی در دیواره روده یکی از مطلوب‌ترین خواص باکتری‌های پروبیوتیک به‌منظور اعمال اثرات مفید آن است. نتایج این پژوهش حاکی از موفقیت

کاهش مصرف خوراک، افزایش وزن و افزایش نرخ تبدیل خوراک^۱ در موش‌های تغذیه‌شده با پروبیوتیک‌های اسپورزا بود (Mazkour et al., 2019). نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش حاضر نیز نشان داد که باکتری‌های اسپورزای پروبیوتیک مورد مطالعه در شرایط شبیه‌سازی دستگاه گوارش پس از تحمل تنش حرارتی مقاومت داشته‌اند. براساس مطالعه‌های صورت‌گرفته توسط محققان دیگر در زمینه زنده‌مانی و جوانه‌زنی باسیلوس‌ها در شرایط دستگاه گوارش حیوانی (Cartman et al., 2008) و یا شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش انسانی (Keller et al., 2019) می‌توان نتیجه گرفت که اسپورهای باسیلوس کوآگولانس Unique IS-2 و باسیلوس سابتیلیس UBBS-14 با احتمال بالایی قادرند در دستگاه گوارش جوانه‌زنی کنند و تأثیرات سلامت‌بخش برای مصرف‌کننده داشته باشند.

ارزیابی توانایی تجمع سویه‌های مورد بررسی خودتجمعی سویه‌های پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس و Unique IS-2، باسیلوس سابتیلیس UBBS-14 و همچنین سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی ۱۳۳۰ و سالمونلا انتریکا (ATCC ۱۰۷۰۸) طی ۲۴ ساعت در شکل (۱) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده پس از طی ۲ ساعت از زمان آزمون، باسیلوس کوآگولانس با ۴۲/۰۶ درصد و باسیلوس سابتیلیس با ۱/۲۷ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان خودتجمعی را نشان دادند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، باکتری اشریشیاکلی با ۸۱/۰۶ درصد و سالمونلا انتریکا با ۱۴/۸۸ درصد به ترتیب از بیشترین و کمترین قابلیت خودتجمعی برخوردار بودند. این شاخص برای باکتری‌های باسیلوس کوآگولانس و باسیلوس سابتیلیس پس از گذشت ۲۴ ساعت به ترتیب ۷۲/۸۵ و ۳۹/۳۹ درصد ملاحظه گردید.

¹ Feed Conversion Ratio

به‌طور کامل شناخته نشده است. فنوتیپ خودتجمعی، بسته به باکتری‌های موردنظر، ممکن است تحت شرایط خاصی مانند استرس، دردسترس بودن اکسیژن و یا تغییرات دمایی ایجاد شود (Trunk, Khalil, & Leo, 2018). از آنجا که خودتجمعی به‌طور کلی از استرس‌های محیطی محافظت می‌کند، می‌تواند برای هر دو گروه باکتری‌های مفید و بیماری‌زا، به‌ویژه در شرایطی مانند کمبود یا فقدان مواد مغذی یا استرس اکسیداتیو مفید باشد. علاوه بر آن، خودتجمعی و تشکیل میکروکلنی نیز ممکن است در محافظت از باکتری در مقابل سیستم ایمنی میزبان نقش داشته باشد (Fexby et al., 2007). براساس تحقیق‌های انجام‌شده، گروهی از پروتئین‌ها و اگزوپلی‌ساکاریدهای سطحی سلول که با عنوان ترکیبات خود-آگلوتینه‌کننده نام‌گذاری شده‌اند، در پدیده خودتجمعی باکتری‌ها دخالت دارند (Trunk et al., 2018). از سوی دیگر، پتانسیل تهاجمی سویه‌های بیماری‌زا می‌تواند تحت تأثیر خاصیت ضد میکروبی و ضد چسبندگی سویه‌های پروبیوتیک قرار گیرد (Jeon, Lee, Yang, Kim, & Paik, 2017).

سنجش آب‌گریزی سطح باکتری (چسبندگی به حلال‌های هیدروکربنی)

آب‌گریزی سطحی سویه‌های پروبیوتیک باسیلوس کواگولانس Unique IS-2 و باسیلوس سابتیلیس UBBS-14 و سویه‌های بیماری‌زای اشریشیاکلی ۱۳۳۰ و سالمونلا انتریکا (ATCC ۱۰۷۰۸) در حلال‌های هیدروکربنی زایلن (به‌طور کامل غیرقطبی)، کلروفرم (حلال اسیدی و الکترون‌پذیرنده) و اتیل استات (حلال بازی و الکترون‌دهنده) مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۳). براساس نتایج، میزان چسبندگی باسیلوس کواگولانس به کلروفرم ۹۵/۱۸ درصد، به اتیل استات ۵۰/۹۳ درصد و به زایلن ۴۵/۰۶ درصد بود. چسبندگی باسیلوس سابتیلیس به کلروفرم ۶۰/۶۵ درصد، به اتیل استات ۶۲/۸۱ درصد و به زایلن ۳۶/۱۴ درصد ملاحظه گردید. سویه اشریشیاکلی ۶۹/۲۶ درصد به کلروفرم، ۶۴/۶۸ درصد به اتیل استات و ۱/۴۱ درصد به زایلن تمایل به اتصال نشان داد. کمترین تمایل به چسبندگی به حلال‌های هیدروکربنی را در میان ۴ سویه مورد بررسی از باکتری

بیشتر باسیلوس کواگولانس از نظر ویژگی خودتجمعی و هم‌تجمعی در مقایسه با باسیلوس سابتیلیس بود. خودتجمعی خاصیتی است که در آن سلول‌های یک سویه پروبیوتیکی در کنار هم تجمع یافته تا یک توده تشکیل دهند. با کمک این ویژگی، تعداد کمی از باکتری‌ها در حین عبور از شرایط تنش، زنده‌مانی خود را از دست خواهند داد. همچنین شانس تشکیل کلنی و تجمع یافتن آنها در روده افزایش می‌یابد (Pandey et al., 2015). هم‌تجمعی پدیده‌ای است که در آن رقابت میان سویه پروبیوتیک و سویه بیماری‌زا بر سر جایگزینی در روده و اتصال به سلول‌های اپیتلیال شکل می‌گیرد (Jeon et al., 2018). راندمان هم‌تجمعی کشت پروبیوتیک نشان‌دهنده میزان قابلیت این سلول‌ها برای جلوگیری از چسبندگی سویه‌های بیماری‌زا به سلول‌های اپیتلیال روده خواهد بود (Pandey et al., 2015). در مطالعه‌های پیشین، خودتجمعی باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس P229 و باسیلوس پلی‌فرمنتیکوس^۱ SCD پس از ۲۴ ساعت به ترتیب ۷۸/۸۳ و ۸۲/۶۹ درصد (Jeon et al., 2018) و برای باسیلوس سابتیلیس KATMIRA1933 پس از ۸ ساعت ۵۹/۵ درصد (AIGburi et al., 2016) گزارش گردید. بنا به تحقیق مزبور باسیلوس پلی‌فرمنتیکوس SCD و باسیلوس سابتیلیس P229 بالاترین سطح از هم‌تجمعی با سویه بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس^۲ ATCC6538 بعد از ۴ ساعت (به ترتیب ۵۴/۰۴ و ۳۰/۷۲ درصد) را نشان دادند (Jeon et al., 2018). علاوه بر چسبندگی به سلول‌های میزبان، ماتریکس خارج سلولی بافت‌های میزبان و یا سطوح معدنی، بسیاری از باکتری‌ها توانایی اتصال به خود را دارند. این خود چسبندگی به اصطلاح خودتجمعی یا خود-آگلوتینه‌شدن^۳، نامیده می‌شود و در مراحل ابتدایی شکل‌گیری بیوفیلم توسط باکتری صورت می‌گیرد (Kragh et al., 2016). خودتجمعی از جنبه ماکروسکوپی، به صورت توده‌های باکتریایی تشکیل‌شده در انتهای لوله‌های کشت قابل مشاهده می‌باشد. باین‌حال، پدیده خودتجمعی از جنبه‌های زیادی

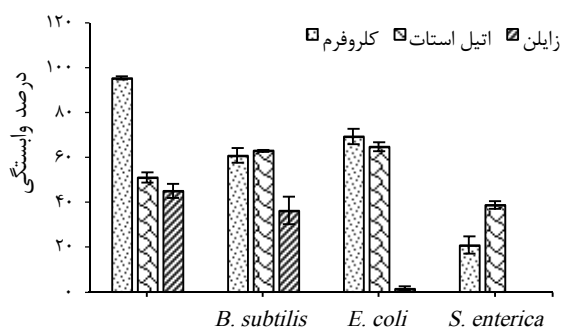
¹ *Bacillus polyfermenticus*

² *Staphylococcus aureus*

³ Autoagglutination

می‌باشند. لذا تفاوت معنی‌دار مشاهده شده در تمایل به چسبندگی میان حلال‌ها، به دلیل واکنش‌های اسید و باز لوئیس^۱ ناشی از الکترون‌دهندگی/پذیرندگی و خصوصیات وابسته به سویه هر باکتری می‌باشد. در سال ۲۰۱۵، سه سویه پروبیوتیکی باسیلوس سابتیلیس، باسیلوس آئروفیلوس^۲ و باسیلوس فیروموس^۳ از دستگاه گوارش نوعی ماهی جداسازی و آب‌گریزی سطح سلولی آنها ارزیابی گردید. براساس نتایج این مطالعه، هر سه سویه پتانسیل آب‌گریزی بالایی بخصوص تمایل زیادی به چسبندگی به حلال کلروفرم نشان دادند (Thankappan, Ramesh, Ramkumar, Natarajaseenivasan, & Anbarasu, 2015). محققان در مطالعه‌ای دیگر، آب‌گریزی سطح سلولی باسیلوس کلازی^۴ DY14 را بالاتر از لیزینی باسیلوس اسفائریکوس^۵ DY13 اعلام کردند (Vaidya, Patel, Kunjadiya, Joshi, & Kunjadiya, 2018). چسبندگی سلول‌های باکتریایی به‌طور معمول با خصوصیات سطحی سلول مرتبط می‌باشد. آب‌گریزی سطح سلول در حقیقت تعامل غیراختصاصی بین سلول‌های میکروبی و میزبان است که در این رابطه پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی و لیپوتیکوئیک اسیدها دخالت دارند (Krasowska & Sigler, 2014; Vaidya et al., 2018). چسبندگی به سلول‌های اپیتلیال روده یک پارامتر حیاتی در پتانسیل پروبیوتیکی محسوب می‌شود، چراکه برای سویه پروبیوتیک توانایی لازم جهت مقاومت در برابر شار محتوای روده و زمینه تشکیل کلنی را فراهم می‌کند. جای‌گیری و تشکیل کلنی در دیواره سلولی سلول‌های اپیتلیال روده و سطوح مخاطی یک ویژگی مهم مطلوب باکتری‌های پروبیوتیکی به‌منظور جلوگیری از چسبندگی باکتری‌های بیماری‌زا، حمله به فضای موجود در روده و جلوگیری از واکنش‌های التهابی است (do Carmo et al., 2015; Thankappan et al., 2018).

سالمونلا انتریکا ملاحظه گردید، به طوری که این سویه ۲۰/۷۹ درصد به کلروفرم و ۳۸/۶۳ درصد تمایل به اتصال با اتیل استات داشت، اما هیچ‌گونه اتصالی به حلال هیدروکربنی زایلن در سویه سالمونلا انتریکا مشاهده نشد. سویه‌های با آب‌گریزی بالای ۴۰ درصد به‌عنوان آب‌گریز در نظر گرفته شدند. در این پژوهش آب‌گریزی سویه باسیلوس کواگولانس بالاترین تمایل نسبت به حلال‌های مورد استفاده را از خود نشان داد. درصد بالای تمایل این سویه به حلال کلروفرم نشان‌دهنده قدرت زیاد الکترون‌دهندگی در سطح سلول باسیلوس کواگولانس می‌باشد. از سوی دیگر، عدم مشاهده تفاوت معنی‌دار در تمایل به حلال‌های کلروفرم و اتیل استات مربوط به باسیلوس سابتیلیس نشان می‌دهد که ممکن است سطح سلولی این باکتری از نظر ویژگی الکترون‌دهندگی و الکترون‌پذیرندگی در وضعیت متعادلی قرار دارد.



شکل ۳- آب‌گریزی سطح سلولی سویه‌های پروبیوتیک و بیماری‌زا در مقابل حلال‌های مختلف تیرک‌های رسم‌شده روی نقاط نشانگر انحراف معیار است.

آزمایش چسبندگی باکتری به حلال‌های هیدروکربنی به‌طور گسترده‌ای برای تخمین ظرفیت چسبندگی سویه‌های باکتریایی استفاده شده است. این روش به‌طور غیرمستقیم، میزان آب‌گریزی سطح باکتری‌ها را با تعیین درصد نسبی باکتری‌های موجود در فاز آب‌گریز پس از مخلوط کردن آن با فاز آبی حاوی کشت فعال باکتری اندازه‌گیری می‌کند. در این پژوهش، باسیلوس کواگولانس در مقایسه با باسیلوس سابتیلیس تمایل بیشتری به اتصال به حلال‌های هیدروکربنی بخصوص حلال اسیدی کلروفرم نشان داد. حلال‌های هیدروکربنی مورد استفاده، از نظر ویژگی‌های واندروالسی مشابه یکدیگر

¹ Lewis

² *Bacillus aerophilus*

³ *Bacillus firmus*

⁴ *Bacillus clausii*

⁵ *Lysinibacillus sphaericus*

نتیجه‌گیری

پایداری حرارتی و زنده‌مانی قابل‌ملاحظه باسیلوس‌های اسپورزا در شرایط تنش ناشی از دستگاه گوارش و فرایند مواد غذایی، به‌کارگیری این باکتری‌ها در فرمولاسیون محصولات پروبیوتیک را در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌ها که به فرم رویشی و فعال‌زیست می‌کنند، با اقبال روزافزون مواجه ساخته است. در ادامه تحقیق‌های پیشین درخصوص به‌کارگیری فرمولاسیون و پوشش‌دهی نبات پروبیوتیک، نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که سویه‌های اسپورزای باسیلوس کواگولانس و باسیلوس سابتیلیس می‌توانند پس از تحمل فرایندهای حرارتی به‌کاررفته در پروسه تولید و در حین مصرف این محصول همراه با آب جوش، تنش‌های حرارتی و شرایط عبور از دستگاه گوارش میزبان را به‌خوبی تاب آورند. همچنین موفقیت این‌گونه از خانواده پروبیوتیک‌ها در تجمع سلولی و قابلیت بیشتر آب‌گریزی سطحی سلول، به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی‌های تعیین‌کننده خواص پروبیوتیکی، باسیلوس‌ها را در مقایسه با لاکتوباسیلوس‌ها از امتیاز بالاتری در استفاده از طیف گسترده‌ای از محصولات غذایی و دارویی برخوردار می‌سازد.

تشکر و قدردانی

محققان مراتب قدردانی خود را از شرکت زعفران سحرخیز به جهت حمایت مالی و فراهم آوردن امکانات آزمایشگاهی لازم در این پژوهش اعلام می‌دارند.

مشارکت نویسندگان

نسیم ادیب‌پور: جمع‌آوری داده، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله و آنالیز داده‌ها؛ مرضیه حسینی‌نژاد: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، جمع‌آوری داده، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، نوشتن پیش‌نویس مقاله، بازبینی و اصلاح مقاله، آنالیز داده‌ها، نظارت بر مطالعه و تأیید نسخه نهایی؛ ابوالفضل پهلوانلو: ارائه ایده پژوهشی و طراحی مطالعه، تجزیه و تحلیل و تفسیر داده‌ها، بازبینی و اصلاح مقاله و نظارت بر مطالعه.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

منابع

- ادیب‌پور، ن.، حسینی‌نژاد، م.، و پهلوانلو، ا. (۱۳۹۹). بهینه‌سازی فرمولاسیون پوشش خوراکی پروبیوتیک و بررسی خواص فیزیکی و بافتی آن جهت پوشش‌دهی نبات فراسودمند. *علوم و صنایع غذایی ایران*، ۱۷ (۱۰۰)، ۱۰۳-۱۱۵.
- Adibpour, N., Hosseininezhad, M., & Pahlevanlo, A. (2019). Application of spore-forming probiotic *Bacillus* in the production of Nabat-A new functional sweetener. *LWT*, 113, 108277. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108277>
- Adibpour, N., Hosseininezhad, M., & Pahlevanlo, A. (2020). Optimization of probiotic edible coating formulation and evaluation of physical and textural properties for rock candy coating. *Food Science and Technology*, 17(100), 103-115. (in Persian)
- Adibpour, N., Hosseininezhad, M., Pahlevanlo, A., & Hussain, M. A. (2019). A review on *Bacillus coagulans* as a Spore-Forming Probiotic. *Applied Food Biotechnology*, 6(2), 91-100. doi:<https://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i2.23958>
- AlGhuri, A., Volski, A., Cugini, C., Walsh, E. M., Chistyakov, V. A., Mazanko, M. S., . . . Chikindas, M. L. (2016). Safety properties and probiotic potential of *Bacillus subtilis* KATMIRA1933 and *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895. *Advances in Microbiology*, 6(6), 432-452. doi:<https://doi.org/10.4236/aim.2016.66043>
- Cartman, S. T., La Ragione, R. M., & Woodward, M. J. (2008). *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(16), 5254-5258. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.00580-08>

- Casula, G., & Cutting, S. M. (2002). Bacillus probiotics: spore germination in the gastrointestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(5), 2344-2352. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2344-2352.2002>
- Cutting, S. M. (2011). Bacillus probiotics. *Food microbiology*, 28(2), 214-220. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.03.007>
- do Carmo, F. L., Rabah, H., De Oliveira Carvalho, R. D., Gaucher, F., Cordeiro, B. F., da Silva, S. H., . . . Jan, G. (2018). Extractable bacterial surface proteins in probiotic–host interaction. *Frontiers in Microbiology*, 9, 645. doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00645>
- FAO/WHO, J. (2002). Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food London. *Ontario, Canada* .
- Fexby, S., Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Roos, V., Høiby, N., Givskov, M., & Klemm, P. (2007). Biological Trojan horse: antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infection and immunity*, 75(1), 30-34. doi:<https://doi.org/10.1128/IAI.01117-06>
- Haldar, L., & Gandhi, D. N. (2016). Effect of oral administration of Bacillus coagulans B37 and Bacillus pumilus B9 strains on fecal coliforms, Lactobacillus and Bacillus spp. in rat animal model. *Veterinary World*, 9(7), 766-772. doi:<https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.766-772>
- Hoa, T. T., Istatico, R., Baccigalupi, L., Ricca, E., Van, P. H., & Cutting, S. M. (2001). Fate and dissemination of Bacillus subtilis spores in a murine model. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(9), 3819-3823. doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.67.9.3819-3823.2001>
- Hosseini Nezhad, M., Hussain, M. A., & Britz, M. L. (2015). Stress responses in probiotic Lactobacillus casei. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 55(6), 740-749. doi:<https://doi.org/10.1080/10408398.2012.675601>
- Jeon, H.-L., Lee, N.-K., Yang, S.-J., Kim, W.-S & Paik, H.-D. (2017). Probiotic characterization of Bacillus subtilis P223 isolated from kimchi. *Food science and biotechnology*, 26(6), 1641-1648. doi:<https://doi.org/10.1007/s10068-017-0148-5>
- Jeon, H.-L., Yang, S.-J., Son, S.-H., Kim, W.-S., Lee, N.-K & Paik, H.-D. (2018). Evaluation of probiotic Bacillus subtilis P229 isolated from cheonggukjang and its application in soybean fermentation. *LWT*, 97, 94-99. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.054>
- Keller, D., Verbruggen, S., Cash, H., Farmer, S & Venema, K. (2019). Spores of Bacillus coagulans GBI-30, 6086 show high germination, survival and enzyme activity in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the gastrointestinal tract. *Beneficial microbes*, 10(1), 77-87. doi:<https://doi.org/10.3920/BM2018.0037>
- Kragh, K. N., Hutchison, J. B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A. E., Irie, Y., . . . Gordon, V. (2016). Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *MBio*, 7(2), e00237-00216. doi:<https://doi.org/10.1128/mBio.00237-16>
- Krasowska, A., & Sigler, K. (2014). How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 112. doi:<https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00112>
- Majeed, M., Majeed, S., Nagabhushanam, K., Arumugam, S., Beede, K., & Ali, F. (2019). Evaluation of probiotic Bacillus coagulans MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food Research International*, 121, 497-505. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.003>
- Mazkour, S., Shekarforoush, S. S., & Basiri, S. (2019). The effects of supplementation of Bacillus subtilis and Bacillus coagulans spores on the intestinal microflora and growth performance in rat. *Iranian journal of microbiology*, 11(3), 260
- Meidong, R., Khotchanalekha, K., Doolgindachbaporn, S., Nagasawa, T., Nakao, M., Sakai, K., & Tongpim, S. (2018). Evaluation of probiotic Bacillus aerius B81e isolated from healthy hybrid catfish on growth, disease resistance and innate immunity of Pla-mong Pangasius bocourti. *Fish & shellfish immunology*, 73, 1-10. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.11.032>
- Mingmongkolchai, S., & Panbangred, W. (2018). Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production. *J Appl Microbiol*, 12(6), 1334-1346. doi:<https://doi.org/10.1111/jam.13690>

- Ozdemir, M., & Floros, J. (2001). Analysis and modeling of potassium sorbate diffusion through edible whey protein films. *Journal of Food Engineering*, 47(2), 149-155. doi:[https://doi.org/10.1016/S0260-8774\(00\)00113-8](https://doi.org/10.1016/S0260-8774(00)00113-8)
- Pandey, K. R., Shinde, P. S., & Vakil, B. V. (2015). Evaluation of molecular variations in probiotic *Bacillus coagulans* and its bacteriophage resistant mutants. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 4(4), 343-355 .
- Poormontaseri, M., Hosseinzadeh, S., Shekarforoush, S. S., & Kalantari, T. (2017). The effects of probiotic *Bacillus subtilis* on the cytotoxicity of *Clostridium perfringens* type a in Caco-2 cell culture. *BMC microbiology*, 17(1), 150. doi:<https://doi.org/10.1186/s12866-017-1051-1>
- Setlow, P. (2003). Spore germination. *Current opinion in microbiology*, 6(6), 550-556. doi:<https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.10.001>
- Thankappan, B., Ramesh, D., Ramkumar, S., Natarajaseenivasan, K., & Anbarasu, K. (2015). Characterization of *Bacillus* spp. from the gastrointestinal tract of *Labeo rohita*-towards to identify novel probiotics against fish pathogens. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(1), 340-353. doi:<https://doi.org/10.1007/s12010-014-1270-y>
- Trunk, T., Khalil, H. S., & Leo, J. C. (2018). Bacterial autoaggregation. *AIMS microbiology*, 4(1), 140. doi:<https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.1.140>
- Vaidya, Y., Patel, S., Kunjadiya, P., Joshi, C., & Kunjadiya, A. (2018). The effect of prebiotics on bacteriocin production and gut adhesion potential of *Lysinibacillus sphaericus* DY13 and *Bacillus clausii* DY14. *Journal of Microbial World*, 10(4), 369-385 .

Effect of Heat Stress on the Resistance of two Spore Forming *Bacillus* Species in the Gastrointestinal Tract Simulation Model and their Probiotic Properties

Nasim Adibpour¹, Marzieh Hosseininezhad^{1*}, Abolfazl Pahlevanloo¹

1- Department of Food Biotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

* Corresponding author (m.hosseininezhad@rifst.ac.ir)

Abstract

In recent years, the application of spore-forming bacteria in probiotic food supplements and medicine have become more interesting due to their stability in stressful condition of production line and gut environment. In the current study, the resistance of *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* in response to heat stress and simulated gastrointestinal tract was investigated. Moreover, the aggregation and hydrophobicity of cell surface of these strains were evaluated. The results showed a survival rate of more than 80% for both species after enduring heat stress and undergoing simulated gastrointestinal conditions. In addition, *Bacillus coagulans* showed a higher autoaggregation and coaggregation ability compared to *Bacillus subtilis*. In addition, both probiotic species presented a high tendency toward adhering to the hydrocarbon solvents like chloroform and ethyl acetate. This study was a continuation of previous studies conducted with the aim of developing and optimizing functional edible coating for the production of probiotic rock candy (Nabat) using spore-forming probiotic bacillus, to ensure the survival and effectiveness of the strains.

Keywords: *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, Heat stress, Probiotic, Simulated gastrointestinal tract

This is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0). To view a copy of this license, visit (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

