



اثر مهاری پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاكتیس روی رشد و تهاجم لیستریا مونوستیوژنر در مواجه با سلول Caco-2

آیدا لطفی (MSc)^{۱*}، جواد حامدی (PhD)^۲، مجید طاعتی مقدم (PhD)^۳

فرامرز مسجدیان جزی (PhD)^{۴**}

^۱ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، علوم پزشکی تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه بیوتکنولوژی میکروبی، دانشکده زیست‌شناسی و مرکز عالی فیلوزنی موجودات زنده، دانشکده علوم، دانشگاه تهران، ایران

^۳ گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گیلان، رشت، ایران

^۴ گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۸ - پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱/۲۷)

چکیده

زمینه: لیستریا مونوستیوژنر از طریق غذایی آماده منجر به لیستریوز در انسان می‌شود. افراد مسن، بیماران دچار نقص ایمنی، زنان باردار و نوزادان در معرض بالاترین خطر ابتلا به این عفونت هستند. برای شناسایی باکتری‌های پروبیوتیک دارای فعالیت بازدارندگی در برابر لیستریا مونوستیوژنر، ما به بررسی اثر مهاری لاكتوکوکوس لاكتیس در برابر رشد و تهاجم لیستریا مونوستیوژنر پرداختیم.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از سویه لیستریا مونوستیوژنر ATCC7644 و سویه پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاكتیس PTCC1336 استفاده شد. بررسی اثرات مهاری لاكتوکوکوس لاكتیس بر رشد پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر از روش ایجاد چاهک در آگار و برای بررسی اثر مهاری روی تهاجم این باکتری از کشت همزمان آن با سلول‌های انتروسیت انسانی Caco-2 استفاده شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد لاكتوکوکوس لاكتیس در غلظت‌های ۰/۰۵، ۰/۰۵، ۰/۰۵ و ۰/۰۵ دارای خاصیت ضد میکروبی در برابر لیستریا مونوستیوژنر بوده و با افزایش غلظت، اثر بازدارندگی بر این پاتوژن افزایش یافت. علاوه بر این، لاكتوکوکوس لاكتیس اثر مهاری روی تهاجم لیستریا مونوستیوژنر به سلول‌های Caco-2 نشان داد. به طوری که در غلظت ۱ از لاكتوکوکوس لاكتیس کاهش تعداد باکتری با کاهش تهاجم لیستریا به سلول‌ها، از لگاریتم 10^0 به لگاریتم 10^{-1} در غلظت $1/5$ از لگاریتم 10^0 به لگاریتم 10^{-1} در غلظت $1/25$ باکتری از لگاریتم 10^0 به لگاریتم 10^{-1} تأیید شد.

نتیجه‌گیری: لاكتوکوکوس لاكتیس دارای خاصیت ضد میکروبی و مهاری در برابر تهاجم لیستریا مونوستیوژنر بود و می‌تواند به عنوان گزینه‌ای برای مهار تهاجم و عفونت‌های گوارشی این باکتری در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: لیستریا مونوستیوژنر، لاكتوکوکوس لاكتیس، پروبیوتیک، خاصیت ضد میکروبی

*تهران، گروه میکروب‌شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Email: masedian.f@iums.ac.ir

*ORCID: 0009-0007-4069-8959

**ORCID: 0000-0002-0242-6000

چسبندگی لیستریا (LAP) برای کمک به چسبندگی و انتقال از طریق سد اپیتلیال در روده استفاده می‌کند. همچنین پروتئین‌های سطحی ایترنالین (InlA) و ایترنالین B (InlB) را برای اتصال و ورود به سلول‌های میزبان و گسترش سیستمیک به کار می‌برد. مشخص شده است که تهاجم لیستریا مونوسیتوژنر هم در داخل بدن موش و هم در سلول در شرایط آزمایشگاهی اتفاق می‌افتد (۸-۶). اگرچه که سویه‌های ضعیف شده پاتوژن‌های غذایی مانند لیستریا مونوسیتوژنر به عنوان واکسن برای کنترل آن‌ها استفاده شده است اما چنین سویه‌هایی دو خطر مهم را به همراه دارند. در مرحله اول، سویه ضعیف شده پتانسیل بازگشت به فنوتیپ خطرناک خود را پس از تجوییر دارند و ثانیاً، آن‌ها می‌توانند در افراد با سیستم ایمنی ضعیف (شیرخواران جوان، سالماندان) یا افراد دارای نقص ایمنی، مهاجم ظاهر شوند. این خطرات علاقه به جستجوی استراتژی‌های جایگزین برای کنترل پاتوژن‌های غذایی را در محققین مختلف افزایش داده است (۹ و ۱۰).

پروبیوتیک‌ها کاندیدای مناسبی برای مقابله با این بیماری هستند زیرا برای سلامتی میزبان مناسب و به طور رقابتی، عفونت پاتوژن‌های ناشی از غذا را مهار می‌کنند. مزایای آن‌ها شامل تحمل اسید و نمک‌های صفراوي است که امکان بقا، انتقال از طریق دستگاه گوارش و کلونیزاسیون سطح مخاطی را فراهم می‌کنند (۱۱ و ۱۲).

با این حال، گاهی اوقات پروبیوتیک‌ها اثرات مطلوبی را ایجاد نمی‌کنند و سویه‌های پروبیوتیک نوع وحشی در جلوگیری از اتصال لیستریا مونوسیتوژنر به لایه‌های اپیتلیال روده در شرایط آزمایشگاهی ناکارامد بوده‌اند (۱۲ و ۱۳).

با این حال، تولید مواد بازدارنده توسط پروبیوتیک‌ها مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن، CO_2 ، دی‌استیل یا پپتیدهای ضد میکروبی، به عنوان مثال، باکتریوسین‌ها اثبات

مقدمه

لیستریا مونوسیتوژنر باکتری میله‌ای گرم مثبت بدون اسپور و پاتوژن منتقله از غذا (Food borne) است که به دلیل حضور همه جایی آن در طبیعت و توانایی رشد در شرایط فیزیکی متنوع از جمله دمای یخچال تا دماهای بالا (منفی ۱/۵ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد)، pH وسیع (۴ تا ۹/۶) در صنایع غذایی نگرانی خاص محسوب می‌شود (۱). ابتلای به عفونت این باکتری در افراد سالم ممکن است منجر به گاستروانتریت خود محدود شونده شود و در افراد دارای ضعف سیستم ایمنی همچون زنان باردار سبب بیماری لیستریوز گردد (۲ و ۳). میزان شیوع این بیماری از ۹۶ میلیون نفر در سال ۲۰۰۰، به ۱۸۱ میلیون نفر در سال ۲۰۰۶ در ایالات متحده افزایش یافته است. استفاده از شیر غیر پاستوریزه برای تولید پنیر یکی از عوامل اصلی انتقال آلدگی لیستریا است. نشان داده شده است که کارخانه‌های فرآوری تولید پنیر تازه، می‌توانند یکی از محیط‌های مهم آلدگی بالیستریا مونوسیتوژنر باشند که سطوح مختلف که در تماس با غذا هستند، تشکیل بیوفیلم این باکتری را تسهیل کنند (۴). در یک مطالعه در ایران مشخص شد که شیوع لیستریا مونوسیتوژنر با منشاء انسانی با میانگین ۱۰ درصد و با رنج شیوع ۰ تا ۲۸ درصد متغیر بود.

شیوع لیستریا مونوسیتوژنر در حیوانات در ایران ۷ درصد با رنج شیوع ۱ تا ۱۸ درصد برآورد شد. همچنین، شیوع لیستریا مونوسیتوژنر در نمونه‌های غذایی ایرانی ۴ درصد و بین ۰ تا ۵۰ درصد برآورد شد (۵).

لیستریا مونوسیتوژنر استراتژی‌های بقا مختلفی را در محیط‌های چالش برانگیز دستگاه گوارش به کار می‌گیرد. از طریق سطوح مخاطی دستگاه گوارش وارد بدن می‌شود و باعث ایجاد عفونت می‌شود. در طول پیشرفت بیماری، لیستریا مونوسیتوژنر از پروتئین

پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس PTCC 1336 تهیه شده از مرکز پژوهش های علمی صنعتی استفاده گردید. سویه لیستریا مونوستیوژنر بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن براث و سپس برین هارت اینفیوژن آگار (مرک، آلمان) کشت داد شد و ویال های حاوی باکتری پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس لیوفلیزه در محیط براث de Man MRS [دی من]، Rogosa روگوزا، و Sharpe [شارپ]، مرک آلمان کشت داده شد.

تعیین اثر ضد میکروبی و مهار کنندگی پروپیوتیک
به منظور تعیین اثر مهار کنندگی یا تعیین حساسیت لیستریا مونوستیوژنر نسبت به پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس از روش چاهک در آگار استفاده گردید. ابتدا، چاهک هایی با ظرفیت معادل ۱۰۰ میکرولیتر در پلیت ۶ تا ۸ سانتی مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) توسط پیست پاستور ایجاد گردید. سپس غلاظت نیم مک فارلن از لیستریا مونوستیوژنر تهیه و یک سوپ از آن در سطح پلیت کشت داده شد و غلاظت های ۰/۵، ۰/۰۵، ۰ و ۱ از سوپرناتانت حاصل از رشد ۲۴ ساعته باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس به چاهک ها مربوطه تلقیح گردید. در نهایت میانگین قطر هاله عدم رشد بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی گراد اندازگیری گردید. همچنین از محیط کشت MRS و فسفات بافر سالین (PBS) به عنوان کترول منفی استفاده (۲۰) و این تست به صورت سه تکرار برای لیستریا مونوستیوژنر انجام گردید.

بررسی اثر مهاری بر تهاجم پاتوژن در سلول های Caco-2

بررسی اثر مهاری پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس بر تهاجم لیستریا مونوستیوژنر، آزمایش کشت همزمان و

شده است و یک توانایی کاملاً شناخته شده در باکتری های اسید لاکتیک است و این ویژگی ها وابسته به نوع سویه پروپیوتیک ها متفاوت هستند (۱). بنابراین، مطالعات جهت غربالگری باکتری های اسید لاکتیک با منشاء مختلف، با هدف کشف سویه های جدید پروپیوتیک، روز به روز در حال افزایش است (۱۴ و ۱۵). در میان باکتری های اسید لاکتیک، گونه های لاکتوبیلاتی باسیلوس پلاتاریوم که قبلاً لاکتو باسیلوس پلاتاریوم نامیده می شد و لاکتوکوکوس لاکتیس به طور طبیعی در انواع محصولات غذایی تخمیر شده وجود دارند، و این محصولات می توانند به طور ایمن برای مدت طولانی استفاده شوند. سویه های لاکتوکوکوس لاکتیس اجزای اصلی باکتری های اسید لاکتیک در کشت های استارتر هستند که برای تولید بسیاری از محصولات لبنی تخمیر شده استفاده می شوند (۱۶ و ۱۷). علاوه بر این، وجود لاکتوکوکوس در پنیرها با افزایش اینمی میکروبی و توسعه خواص حسی بالاتر (یعنی طعم، خوشبوی و بافت) مرتبط است و همچنین پایداری محصولات در طول ذخیره سازی، مربوط به تولید موادی (مانند اسیدهای آلی، باکتریوسم ها، متابولیت های چربی و اسید آمینه) است که قادر به مهار فساد و میکرووار گانیسم های بیماری زا هستند (۱۸ و ۱۹). از اینرو با توجه به خواص جالب توجه لاکتوکوکوس لاکتیس هدف از این مطالعه بررسی اثر مهاری پروپیوتیک لاکتو باسیلوس لاکتیس روی رشد و تهاجم لیستریا مونوستیوژنر در مواجه با سلول Caco-2 می باشد.

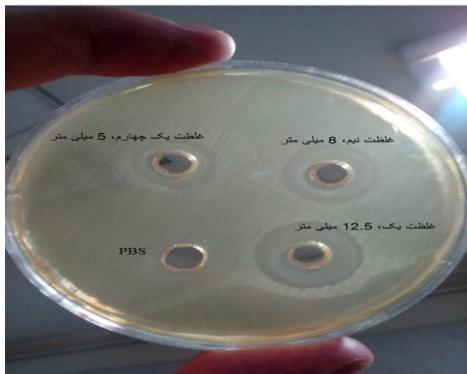
مواد و روش ها

کشت و سویه های باکتریایی

در این مطالعه از سویه لیستریا مونوستیوژنر ATCC 7644 موجود در بانک میکروبی گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران و سویه

یافته‌ها

متوسط نتایج تست تعیین حساسیت پس از سه تکرار نشان داد که پروبیوتیک لاکتوبکتریوس لاکتیس دارای خاصیت بیوکنترلی برای مهار رشد یا خاصیت ضد میکروبی علیه لیستریا مونوسیتوژنر در هر سه غلظت مطالعه شده بود. همچنین مشخص گردید که میانگین قطر هاله عدم رشد لیستریا مونوسیتوژنر در مجاورت این پروبیوتیک برای غلظت‌های $0/25$ ، $0/5$ ، و 1 به ترتیب برابر با 5 ، 8 و $12/5$ میلی‌متر بود (شکل ۱).



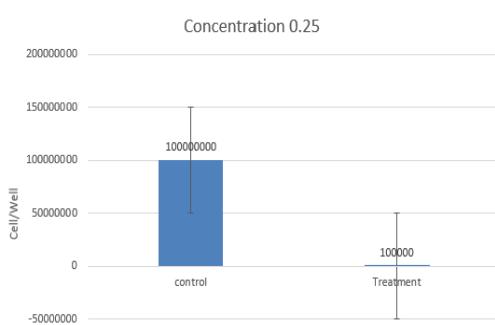
شکل ۱) تعیین حساسیت لیستریا مونوسیتوژنر نسبت به پروبیوتیک لاکتوبکتریوس لاکتیس

Fig 1) Determining the sensitivity of *Listeria monocytogenes* to the probiotic *Lactococcus lactis*

نتایج اثر مهاری پروبیوتیک لاکتوبکتریوس لاکتیس بر تهاجم باکتری لیستریا مونوسیتوژنر در $MOI=100$ نشان داد که با افزایش غلظت این پروبیوتیک، تعداد باکتری لیستریا مونوسیتوژنر در کشت سلولی کاهش و در نتیجه از تهاجم باکتری به سلول‌ها کاسته می‌شود. نتایج کشت سلولی مشخص نمود که پروبیوتیک لاکتوبکتریوس لاکتیس در غلظت 1 سبب کاهش تهاجم

مواجه سلول باکتری با سلول‌های Caco-2 مطابق مطالعه گذشته انجام گردید (۲۱). ابتدا رده سلولی Caco-2 از مؤسسه پاستور خریداری و در فلاسک MEM حاوی محیط نگهدارنده (Minimum Essential Medium) پاساژ داده شد و 24 ساعت در 5 درصد CO_2 در دمای 37 درجه انکوبه گردید، و پس از مونولایر شدن و بعد از شستشو با PBS با $MOI=100$ به پلیت‌های 96 خانه اضافه شد. به ازای هر چاهک مقدار 100 میکرولیتر از غلظت 10^8 باکتری لیستریا مونوسیتوژنر (که با مقایسه با استاندارد نیم مک فارلند تهیه شده بود) تلقیح و سپس 100 میکرولیتر از غلظت‌های $0/25$ ، $0/5$ ، و 1 از سوپرناتانت کشت 48 ساعته باکتری لاکتوبکتریوس لاکتیس به آن افزوده شد. پس از 1 ساعت انکوباسیون در 37 درجه سانتی‌گراد، در این مرحله محتويات محیط کشت با PBS شستشو داده شد و سپس به چاهک‌های استریل EMEM متقل شده و محیط 20 Eagle Minimum Essential Medium (EMEM) حاوی میکروگرم در میلی‌لیتر جنتامايسین به آن اضافه شد تا باکتری‌های خارج سلولی کشته شدند. چاهک‌های حاوی سلول به وسیله PBS سه بار شستشو داده شدند و سلول‌ها به وسیله محلول تریتون ایکس 100 لیز گردیدند. سپس میزان 10 میکرولیتر از محلول حاوی سلول و باکتری بصورت سریالی در محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار (BHI) رقیق گردید (تا از غلظت مواد مغذی محیط کشت کاسته نشود) و بر روی محیط کشت برین هارت اینفیوژن آگار تلقیح و پس از 24 ساعت شمارش کلی باکتری لیستریا مونوسیتوژنر انجام گردید، تمام آزمایش‌ها بصورت 3 بار تکرار با حضور کترل (بدون تیمار) انجام و میانگین تعداد باکتری رشد یافته محاسبه گردیدند.

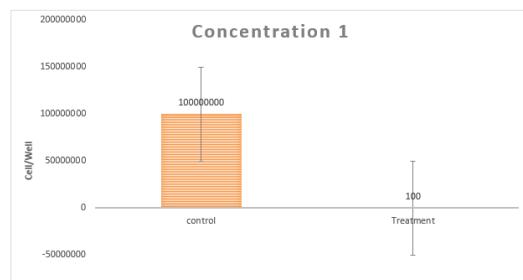
در نهایت بررسی اثر مهاری بر تهاجم باکتری لیستریا مونوسیتوژنر توسط پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس MOI=۱۰۰ در غلظت ۰/۲۵ از سوپرناتانت کشت و در ۱۰۰ مشخص شد که این پروبیوتیک در غلظت ۰/۲۵ مسبب کاهش تهاجم باکتری لیستریا با کاهش تعداد باکتری از لگاریتم 10^8 به لگاریتم 10^5 شد (شکل ۴).



شکل ۴: نتایج کشت سلولی پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس در غلظت ۰/۲۵ سوپرناتانت کشت

Fig 4) The results of cell culture of probiotic *L. lactis* at 0.25 concentration of culture supernatant

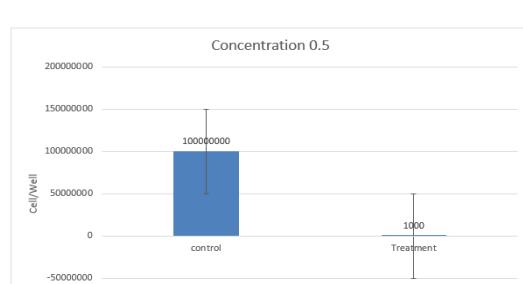
باکتری لیستریا با کاهش تعداد باکتری از لگاریتم 10^8 به لگاریتم 10^2 شد (شکل ۲).



شکل ۲) نتایج کشت سلولی پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس در غلظت ۱ سوپرناتانت کشت

Fig 2) The results of cell culture of probiotic *L. lactis* at 1 concentration of culture supernatant

نتایج کشت سلولی در غلظت ۰/۵ از سوپرناتانت کشت پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس در MOI=۱۰۰ نشان داد که این پروبیوتیک در غلظت ۰/۵ مسبب کاهش تهاجم باکتری لیستریا با کاهش تعداد باکتری از لگاریتم 10^8 به لگاریتم 10^3 شد (شکل ۳).



شکل ۳) نتایج کشت سلولی پروبیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس در غلظت ۰/۵ سوپرناتانت کشت

Fig 3) The results of cell culture of probiotic *L. lactis* at 0.5 concentration of culture supernatant

بحث
به دلیل اثرات کم استفاده از واکسن‌های غیرفعال یا خطرات استفاده از واکسن‌های زنده ضعیف شده و رشد روزافزون مقاومت میکروبی به آنتی‌بیوتیک‌ها در پاتogen‌های منتقله از مواد غذایی، نیاز مبرمی به روش‌های جایگزین ایمن برای پیشگیری یا درمان این بیماری‌های منتقله از غذا وجود دارد. گزارش شده است که پروبیوتیک‌ها به عنوان مواد نگهدارنده و یا افزودنی‌های (Safe additive or preservative agent) مفید به غذا می‌توانند اثرات مفیدی برای ارتقای سلامت میزبان داشته باشند این ویژگی‌ها آن‌ها را به عنوان یک جایگزین مناسب به جای استفاده از مواد نگهدارنده شیمیایی در غذا معرفی می‌کند (۲۲). در این مطالعه نتایج آزمایش

پروپیوتیک‌ها می‌توانند کاندیدای مناسبی برای استفاده به عنوان کشت‌های محافظت شده در تولید پنیر تازه در نظر گرفته شوند، و همه سویه‌های آزمایش شده قادر به کاهش تعداد این پاتوژن مواد غذایی بودند (۱). چندین مطالعه آزمایشگاهی نشان داده‌اند که فعالیت آتاگونیستی پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس در برابر پاتوژن‌ها، از جمله لیستریا مونوستیوژنر با تولید باکتریوسین‌ها مرتبط بوده است (۲۶ و ۲۷). در مطالعاتی دیگر هنگامی باکتری‌های اسید لاکتیک که در برابر لیستریا مونوستیوژنر با روش انتشار چاهک آزمایش شدند، هیچ فعالیت ضدبacterیایی برای سویه‌های لاکپلاستی باسیلوس پلاتاریوم مشاهده نشد در حالی که چهار سویه از لاکتوکوکوس لاکتیس فعالیت بازدارنده از خود نشان دادند، که توانایی آن‌ها در تولید ترکیبات ضدمیکروبی تأیید گردید (۲۸ و ۲۹). از این‌رو، درجه معنی از تنوع فعالیت ضدمیکروبی را نه تنها بین گونه‌های مختلف، بلکه بین سویه‌های متعلق به یک گونه می‌توان مشاهده کرد و فعالیت ضد میکروبی عمدتاً مرتبط با نوع سویه‌ها هستند (۱).

در مطالعه ما مشخص شد که پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس اثر مهاری بر تهاجم باکتری لیستریا مونوستیوژنر داشت که با افزایش غلظت این پروپیوتیک، تعداد باکتری لیستریا مونوستیوژنر در کشت سلولی کاهش و در نتیجه از تهاجم باکتری به سلول‌ها کاسته شد. مطالعات در زمینه بررسی تأثیر پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس بر تهاجم پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر محدود می‌باشد. در یک مطالعه، متوجه شدند که پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس نه تنها پتانسیل بهبودی در مقابل عفونت ناشی از پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر در موش را دارا بود، بلکه زمینه‌ساز اثرات ایمونولوژیک متفاوتی در حیوان آزمایشگاهی شد که در حذف لیستریا مونوستیوژنر مؤثر بود (۳۰). مطابق با

تعیین حساسیت نشان داد که پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس خاصیت مهار رشد باکتری لیستریا مونوستیوژنر را در هر سه غلظت مطالعه شده داشت. مطالعات زیادی در مناطق مختلف دنیا گزارش نموده‌اند که پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس دارای خاصیت بیوکترلی و ضدمیکروبی علیه طیف مختلفی از میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. در این راستا، در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ مشخص شد که پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس دارای خاصیت ضد میکروبی بود و توانایی مهار رشد استافیلوکوکوس ائرروس به عنوان یک پاتوژن مهم غذایی را دارد (۲۲). شجاعی و همکاران در مطالعه‌ای به بررسی خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس علیه قارچ‌های آلوده کننده پنیر سفید ایرانی پرداختند. این محققین متوجه شدند که عصاره پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس دارای خاصیت آنتی اکسیدانی و ضدقارچی بسیار قوی بود (۲۴). در مطالعه‌ای مشابه با نتایج بدست آمده از مطالعه ما، بنکروم (Benkerroum) و همکاران، به بررسی کاربرد کترلی پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس علیه باکتری لیستریا مونوستیوژنر پرداختند. نتایج این محققین نشان داد که میزان فراوانی این پاتوژن پس از ۳ ساعت از تلقیح اولیه پروپیوتیک (10^7 واحد تشکیل کلنی بر میلی‌لیتر) کاهش یافت و استفاده از این پروپیوتیک به عنوان استارتتر، عمر مفید پنیر را تا ۵ روز افزایش داد (۲۵). مطالعه‌ای دیگر در زمینه خاصیت مهاری پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس علیه پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. نتایج این مطالعه با نتایج بدست آمده از مطالعه ما دارای مطابقت بود زیرا پنج سویه پروپیوتیک لاکتوکوکوس لاکتیس به طور قابل توجهی تعداد پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر را کاهش دادند. همچنین نتایج نشان داد که این

اپتیلیال افزایش می‌دهد (۳۴-۳۶). این نتایج نشان می‌دهد که تأثیر پروبیوتیک‌ها بر اساس نوع پروبیوتیک در تهاجم پاتوژن‌ها می‌تواند متفاوت باشد و مطالعات بیشتری در مورد تعامل پروبیوتیک‌های بالقوه با باکتری‌های بیماری‌زا باید انجام شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های ما نشان داد که پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاکتیس خاصیت ضدمیکروبی و ضد تهاجمی علیه لیستریا مونوستیوژنر به عنوان پاتوژن مستقله از غذا را داشت. بنابراین، هنگامی که این پروبیوتیک‌ها با اثرات ضدمیکروبی و ضد تهاجمی خود در برابر پاتوژن‌ها غذایی موجود به غذاها اضافه شوند، می‌توانند اینمی غذا را در برابر رشد میکروبی افزایش دهند. همچنین این یافته‌ها پتانسیل تولید تجاری را برای اعمال اثرات پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاکتیس برای محافظت در برابر عفونت لیستریا مونوستیوژنر را نشان می‌دهد و در آینده نیاز به مطالعات بیشتری در زمینه استفاده از این پروبیوتیک برای کنترل پاتوژن‌های مختلف وجود دارد. همچنین پیشنهاد می‌شود تا از پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاکتیس برای غلبه بر عفونت لیستریا مونوستیوژنر در مواد غذایی استفاده شود.

سپاس و قدردانی

نویسندهای این مقاله کمال تشکر و قدردانی را از دانشگاه علوم پزشکی ایران به دلیل حمایت جهت انجام تکنیک‌های آزمایشگاهی این تحقیق دارند.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندهای بیان نشده است.

نتایج بدست آمده از مطالعه ما، پویمنیدیو (Poimenidou) و همکاران، به بررسی مهار رشد، چسبندگی و تهاجم لیستریا مونوستیوژنر به سلول‌های Caco-2 توسط باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک پرداختند. نتایج نشان داد لاكتوپاسیلوس‌ها قادر به چسبیدن به سلول‌های Caco-2 در سطوح قابل توجهی بالاتر از سویه کنترل بودند و چسبندگی و تهاجم لیستریا مونوستیوژنر به سلول‌های Caco-2 به میزان زیادی در طول رقابت باکتری‌های پروبیوتیک اسید لاکتیک کاهش یافت (۳۱). لیستریا مونوستیوژنر یک پاتوژن مهاجم است و پس از چسبیدن به سطح سلول یوکاریوتی، به داخل سلول‌های میزبان نفوذ می‌کند و چرخه حیات درون سلولی خود را آغاز می‌کند. پروبیوتیک‌هایی که قادر به جلوگیری از این ورود و تهاجم این باکتری به سلول‌ها شوند، برای یک اثر محافظتی برای سلامت انسان امیدوار کننده خواهند بود (۳۱). علاوه بر این نشان داده شده است که پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاکتیس در شرایط آزمایشگاهی می‌تواند در کاهش تهاجم پاتوژن‌های باکتریایی به سلول‌های اپتیلیال روده مؤثر باشد (۳۲).

همانند نتایج بدست آمده از مطالعه ما، مطالعه‌ی دیگر نیز انجام شد که به بررسی پتانسیل پروبیوتیک‌های حاصل از کشت‌های لبیات تجاری در برابر عفونت لیستریا مونوستیوژنر در شرایط *in vitro* و *in vivo* پرداخت. محققین در این مطالعه متوجه شدند که پروبیوتیک لاكتوکوکوس لاکتیس یکی از پروبیوتیک‌هایی بود که منجر به کاهش تهاجم و چسبندگی پاتوژن لیستریا مونوستیوژنر در سلول‌های اپتیلیال انسانی Caco-2 شد (۳۳). از طرفی بر عکس نتایج ما مطالعاتی نیز وجود دارند که نشان داده‌اند افزودن برخی از پروبیوتیک‌ها به سلول‌های Caco-2 قبل از آلووده شدن بالیستریا مونوستیوژنر و برخی از پاتوژن‌های دیگر، تهاجم و چسبندگی پاتوژن‌ها را در سلول‌های

References:

- 1.Pisano MB, Fadda ME, Viale S, et al. Inhibitory effect of Lactiplantibacillusplantarum and *Lactococcus lactis* autochthonous strains against *Listeria monocytogenes* in a laboratory cheese model. *Foods* 2022; 11(5): 715.
doi: [10.3390/foods11050715](https://doi.org/10.3390/foods11050715).
- 2.Valenti M, Ranganathan N, Moore LS, et al. *Listeria monocytogenes* infections: presentation, diagnosis and treatment. *Br J Hosp Med (Lond)* 2021; 82(10): 1-6.
doi: [10.12968/hmed.2021.0107](https://doi.org/10.12968/hmed.2021.0107).
- 3.Yousefian F, Genera F, Soeizi M, et al. *Listeria monocytogenes* Infection in a 69-year-old Diabetic. *J Clin Med Img Case Rep* 2022; 2(5): 1253. <https://jcmimagescasereports.org/article/JCM-V2-1254.pdf>.
- 4.García-Almendárez BE, Cann IK, Martin SE, et al. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control* 2008; 19(7): 670-80. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.07.015>.
- 5.Ranjbar R, Halaji M. Epidemiology of *Listeria monocytogenes* prevalence in foods, animals and human origin from Iran: a systematic review and meta-analysis. *BMC Public Health* 2018; 18(1): 1057.
doi: [10.1186/s12889-018-5966-8](https://doi.org/10.1186/s12889-018-5966-8).
- 6.Davis ML, Ricke SC, Donaldson JR. Establishment of *Listeria monocytogenes* in the gastrointestinal tract. *Microorganisms* 2019; 7(3): 75. doi: [10.3390/microorganisms7030075](https://doi.org/10.3390/microorganisms7030075).
- 7.Akritidou T, Akkermans S, Gaspari S, et al. Effect of gastric pH and bile acids on the survival of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* during simulated gastrointestinal digestion. *Innov Food Sci Emerg Technol* 2022; 82: 103161.
doi: [10.1016/j.ifset.2022.103161](https://doi.org/10.1016/j.ifset.2022.103161).
- 8.Ireton K, Mortuza R, Gyanwali GC, et al. Role of internalin proteins in the pathogenesis of *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 2021; 116(6): 1407-19.
doi: [10.1111/mmi.14836](https://doi.org/10.1111/mmi.14836).
- 9.Mercenier A, Müller-Alouf H, Grangette C. Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr Issues Mol Biol* 2000; 2(1): 17-25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11464916/>.
- 10.Marelli B, Perez AR, Banchio C, et al. Oral immunization with live *Lactococcus lactis* expressing rotavirus VP8 subunit induces specific immune response in mice. *J Virol Methods* 2011; 175(1): 28-37.
doi: [10.1016/j.jviromet.2011.04.011](https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.04.011).
- 11.Hossain MdI, Mizan MdFR, Ashrafudoulla Md, et al. Inhibitory effects of probiotic potential lactic acid bacteria isolated from kimchi against *Listeria monocytogenes* biofilm on lettuce, stainless-steel surfaces, and MBEC™ biofilm device. *LWT* 2020; 118: 108864. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108864>.
- 12.Ewida RM, Hasan WS, Elfaruk MS, et al. Occurrence of *Listeria* spp. in soft cheese and ice cream: effect of probiotic *Bifidobacterium* spp. on survival of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Foods* 2022; 11(21): 3443.
doi: [10.3390/foods11213443](https://doi.org/10.3390/foods11213443).
- 13.Koo OK, Amalaradjou MA, Bhunia AK. Recombinant probiotic expressing *Listeria* adhesion protein attenuates *Listeria monocytogenes* virulence in vitro. *PLoS One* 2012; 7(1): e29277.
doi: [10.1371/journal.pone.0029277](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029277).
- 14.Rzepkowska A, Zielińska D, Oldak A, et al. Organic whey as a source of *Lactobacillus* strains with selected technological and antimicrobial properties. *Int J Food Sci Technol* 2017; 52(9): 1983-94. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13471>.
- 15.Prabhurajeshwar C, Chandrakanth K. Evaluation of antimicrobial properties and their substances against pathogenic bacteria in-vitro by probiotic *Lactobacilli* strains isolated from commercial yoghurt. *Clin Nutr Exp* 2019; 23: 97-115. <https://doi.org/10.1016/j.yclnex.2018.10.001>.
- 16.Ferrer Valenzuela J, Pinuer LA, Garcia Cancino A, et al. Metabolic fluxes in Lactic acid bacteria—A review. *Food Biotechnol* 2015; 29(2): 185-217. <https://doi.org/10.1080/08905436.2015.1027913>
- 17.Lo R, Bansal N, Turner MS. Characterisation of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives

- against *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Control* 2018; 85: 472-83.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.036>.
18. Lopez-Diaz TM, Alonso C, Roman C, et al. Lactic acid bacteria isolated from a hand-made blue cheese. *Food Microbiol* 2000; 17(1): 23-32.
<https://doi.org/10.1006/fmic.1999.0289>.
19. Dal Bello B, Cocolin L, Zeppa G, et al. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. *Int J Food Microbiol* 2012; 153(1-2): 58-65.
doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.016).
20. Karimi S, Rashidian E, Birjandi M, et al. Antagonistic effect of isolated probiotic bacteria from natural sources against intestinal *Escherichia coli* pathotypes. *Electron Physician* 2018; 10(3): 6534-6539.
doi: [10.19082/6534](https://doi.org/10.19082/6534).
21. Nakamura S, Kuda T, An C, et al. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe* 2012; 18(1): 19-24.
doi: [10.1016/j.anaerobe.2011.11.006](https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.11.006).
22. Mathipa MG, Bhunia AK, Thantsha MS. Internalin AB-expressing recombinant *Lactobacillus casei* protects Caco-2 cells from *Listeria monocytogenes*-induced damages under simulated intestinal conditions. *PLoS One* 2019; 14(7): e0220321.
doi: [10.1371/journal.pone.0220321](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0220321).
23. Ma D, Jiang Y, Ahmed S, et al. Physical and antimicrobial properties of edible films containing *Lactococcus lactis*. *Int J Biol Macromol* 2019; 141: 378-86.
doi: [10.1016/j.ijbiomac.2019.09.006](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.09.006).
24. Shojaee A, Anvar SAA, Hamed H, et al. Antifungal and antioxidant activity of two essential oils and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* extract on selected Iranian white cheese-contaminating fungi. *Int J Dairy Technol* 2022; 75(2): 372-9.
<https://doi.org/10.1111/1471-0307.12842>.
25. Benkerroum N, Oubel H, Zahar M, et al. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *J Appl Microbiol* 2000; 89(6): 960-8.
doi: [10.1046/j.1365-2672.2000.01199.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.01199.x).
26. Nero LA, Mattos MR, Beloti V, et al. Autochthonous microbiota of raw milk with antagonistic activity against *Listeria monocytogenes* and *salmonella enteritidis*. *J Food Saf* 2009; 29(2): 261-70.
<https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2009.00155.x>.
27. Kondrotiene K, Kasnauskyte N, Serniene L, et al. Characterization and application of newly isolated nisin producing *Lactococcus lactis* strains for control of *Listeria monocytogenes* growth in fresh cheese. *LWT* 2018; 87: 507-14.
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.021>.
28. Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989; 55(8): 1901-6.
doi: [10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989](https://doi.org/10.1128/aem.55.8.1901-1906.1989).
29. Pisano MB, Fadda ME, Melis R, et al. Molecular identification of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* dairy strains and their technological and genotypic characterization. *Food Control* 2015; 51: 1-8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.11.005>.
30. Lukic J, Jancic I, Mirkovic N, et al. *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus salivarius* differently modulate early immunological response of Wistar rats co-administered with *Listeria monocytogenes*. *Benef Microbes* 2017; 8(5): 809-22.
<https://doi.org/10.3920/BM2017.0007>.
31. Poimenidou SV, Skarveli A, Saxami G, et al. Inhibition of *Listeria monocytogenes* Growth, Adherence and Invasion in Caco-2 Cells by Potential Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Fecal Samples of Healthy Neonates. *Microorganisms* 2023; 11(2): 363.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms11020363>.
32. Zhang JS, Corredig M, Morales-Rayas R, et al. Downregulation of *Salmonella* virulence gene expression during invasion of epithelial cells treated with *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* JFR1 requires OppA. *Probiotics & Antimicro Prot* 2020; 12: 577-88.
<https://doi.org/10.1007/s12602-019-09574-1>.

- 33.Aljasir SF, D'Amico DJ. Probiotic potential of commercial dairy-associated protective cultures: In vitro and in vivo protection against *Listeria monocytogenes* infection. *Food Res Int* 2021; 149: 110699.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110699>.
- 34.Gueimonde M, Jalon L, He F, et al. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res Int* 2006; 39(4): 467-71.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.10.003>.
- 35.Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45(4): 454-60.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02212.x>.
- 36.Abasi S, Keshtmand Z. The effect of probiotic *bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus casei* on sperm maturation in streptozotocin-diabetic rats. *Iran South Med J* 2020; 22(6): 392-401. (Persian)
doi: [10.29252/ismj.22.6.392](https://doi.org/10.29252/ismj.22.6.392).

Original Article

The inhibitory effect of probiotic *Lactococcus lactis* on the growth and invasion of *Listeria monocytogenes* in Caco-2 cell line

A. Lotfi (MSc)^{1*}, J. Hamedi (PhD)², M. Taati Moghadam (PhD)³,
F. Masjidian Jezi (PhD)^{4}**

¹ Department of Microbiology, School of Modern Sciences and Technologies, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran

² Department of Microbial Biotechnology, School of Biology and Center of Excellence in Phylogeny of Living Organisms, School of Science, University of Tehran, Iran

³ Assistant Professor of Medical Microbiology, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Guilan University of Medical Sciences, Rasht, Iran

⁴ Associate Professor of Medical Microbiology, Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received 16 Apr, 2023)

Accepted 9 Dec, 2023)

Abstract

Background: *Listeria monocytogenes* leads to listeriosis in humans through the consumption of ready-to-eat foods. Older adults, immunocompromised patients, pregnant women, and newborns are at the highest risk for this infection. To detect probiotic bacteria with an inhibitory activity against *L. monocytogenes*, we evaluated the inhibitory effect of *Lactococcus lactis* on the growth and invasion of *L. monocytogenes*.

Materials and Methods: In this study, we used the *L. monocytogenes* ATCC 7644 strain and the *L. lactis* PTCC 1336 probiotic strain. To investigate the inhibitory effects of *L. lactis* on the growth of pathogenic *L. monocytogenes*, we employed the well diffusion agar method, and to investigate its inhibitory effect on invasion by this bacterium, we conducted a co-culture with Caco-2 human enterocyte cells.

Results: The results showed that *L. lactis* in concentrations of 0.25, 0.5, and 1 had antimicrobial properties against *L. monocytogenes*. With increasing concentration, the inhibitory effect on this pathogen increased. In addition, *L. lactis* showed an inhibitory effect on the *L. monocytogenes* invasion of Caco-2 cells. Therefore, in the concentration of 1, *L. lactis* decreased the number of bacteria by reducing the invasion of the cells by *Listeria* from log 10⁸ to log 10²; in the concentration of 0.5, from log 10⁸ to log 10³; and in the concentration of 0.25, from log 10⁸ to log 10⁵.

Conclusion: *L. lactis* has antimicrobial and inhibitory properties against the invasion of *L. monocytogenes* and can be considered an option to inhibit invasion and gastrointestinal infections caused by this bacterium.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, *Lactococcus lactis*, probiotic, antimicrobial properties

©Iran South Med J. All rights reserved

Cite this article as: Lotfi A, Hamedi J, Taati Moghadam M, Masjidian Jezi F. The inhibitory effect of probiotic *Lactococcus lactis* on the growth and invasion of *Listeria monocytogenes* in Caco-2 cell line. Iran South Med J 2023; 26(3): 178-188

*Address for correspondence: Department of Medical Microbiology, School of Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Email: masjidian.f@iums.ac.ir

*ORCID: 0009-0007-4069-8959

**ORCID: 0000-0002-0242-6000