Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 3 (08-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

The Antimicrobial and Co-aggregation effects of probiotic *lactobacilli* against some pathogenic bacteria

Maliheh Ershadian[1], Nazila Arbab Soleimani[1], Hatef Ajoudanifar[1], Mohammad Reza Vaezi Khakhki[2]

1. Department of Micribiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.
2. Department of Biology, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/07/07
Accepted: 2015/02/04
Available online:2015/06/10

Article Subject:
Medical Bacteriolgy

IJMM 1394; 9(3): 14-22

Corresponding author at:

Maliheh Ershadian

Department of Micribiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

Email:
ershadianmaliheh@yahoo.com

Abstract

Background and Aim: Nowadays, probiotic *Lactobacilli* are as suitable candidate to control and treat diseases, due to their microbial characteristics and especially co-aggregation which prevent attachment and colonization of pathogenic bacteria. The aim of this study is investigation of antimicrobial and co-aggregation of probiotic bacteria, *Lactobacillus.plantarum* PTCC 1601, *Lactobacillus casei* PTCC 1801, and isolated *Lactobacilli* from dairy products of Sabzevar city against some pathogenic bacteria.

Materials and Methods: Isolation and purification of probiotic *lactobacilli* from Sabsevar traditional dairy products was done by common methods. Among 10 isolated probiotic *lactobacilli*,two of them which had more probiotic potentail were selected and their phylogenetic and molecular characteristics was investigated by 16s rDNA sequencing technique. Antimicrobial and anti-adhesive effect of probiotic bacteria was examined by Modified Double Layer, co-Culture and co-aggregation methods. Co-aggregation of probotic bacteria with pathogens was seen by ATM microscope.

Results: In this study, isolated probotic *lactobacilli* from Sabsevar traditional dairy products and standard bacteria, *L.plantarum* and *L.casei* shown the most antimicrobial effect and co-aggregation with pathogenic bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, respectively. Inhibition of pathogenic bacteria in the presence of probotic bacteria was seen by co-culture method.

Conclusions: According to this study, all used probiotic bacteria in this research inhibited the growth of pathogenic bacteria, among them *L.casei* had spectacular antimicrobial effect and co-aggregation with pathogenic bacteria and it may be used as a suitable candidate to control diseases.

Key Words: lactobacillus, Co-culture, Co-Aggregation, AFM microscopy, Probiotic

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodani Far H, Vaezi Khakhki M. The Co-aggregation effects of probiotic lactobacillus against some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :14-22

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

اثر ضدمیکروبی و تجمع سلولی لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی با برخی از باکتری های بیماری زا

ملیحه ارشادیان [۱]، نازیلا ارباب سلیمانی [۲]، هاتف آجودانی فر ۲، محمد رضا واعظی کاخکی [۳]

۱. گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان،دامغان، ایران

۲. گروه زیست شناسی دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۴/۱۶

پذیرش:۱۳۹۳/۱۱/۱۵

انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۹/۰۹

موضوع:

باکتری شناسی پزشکی

IJMM 1394; 9(3): 14-22

نویسنده مسئول:

ملیحه ارشادیان

گروه میکروبیولوژی ،دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران

تلفن: ۰۹۳۰۵۵۷۰۰۲۸

پست الکترونیک:

ershadianmaliheh@yahoo.com

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی به علت داشتن خصوصیات ضد میکروبی و به ویژه تجمع پذیری که از اتصال اولیه و استقرار باکتری های بیماری زا در بدن میزبان جلوگیری می کنند. هدف از این مطالعه، بررسی اثر ضدمیکروبی و تجمع پذیری باکتری های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 و *لاکتوباسیلوس کازه ای* *PTCC* 1608 و نیز جدایه های *لاکتوباسیلوسی* محصولات لبنی شهرستان سبزوار بر روی برخی از باکتری های بیماری زا است.

مواد و روش کار: *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی با روش‌های استاندارد از نمونه‌های لبنی سنتی جداسازی و خالص سازی شدند. از ده جدایه *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی، دو جدایه که بیشترین توان پروبیوتیکی را داشتند، انتخاب شدند و ویژگی های فیلوژنی و مولکولی آن هابه کمک تکنیک 16s rRNA sequencing بررسی شد. اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی باکتری های پروبیوتیک با استفاده از روش های Modified Double Layer ، Co-Culture و Co-aggregation مورد بررسی قرار گرفت وسپس با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تجمع پذیری باکتری های پروبیوتیک با باکتری بیماری زا مشاهده شد.

یافته‌ها: در این تحقیق *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی جدا شده از ماست سنتی شهرستان سبزوار و نیز باکتری‌های استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوی کازه ئی* بیشترین اثر ضد میکروبی در کشت دولایه و تجمع سلولی با باکتری های بیماریزای *سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* را به ترتیب نشان دادند اثر مهار رشد باکتری های بیماریزا در حضور باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از روش کشت همزمان مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: آزمایش های انجام شده نشان داد که باکتری های پروبیوتیکی در این تحقیق توانایی جلوگیری از رشد باکتری های بیماریزا را داشتند و دراین میان *لاکتوباسیلوس کازه‌ئی* اثر ضد میکروبی ونیز تجمع پذیری قابل ملاحظه ای با باکتری های بیماری‌زا داشت و شاید بتوان از آن بعنوان کاندیدای مناسب جهت کنترل بیماری استفاده کرد.

کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس*، Co-Culture، Co-Aggregation، میکروسکوپ نیروی اتمی AFM، پروبیوتیک

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

افزایش بیماری‌های میکروبی و پیدایش سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، امروزه محققین را بر آن داشته تا با روش‌های جدید و بکارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، درمان و کنترل بیماری ها را میسر سازند. از سال ها پیش، مصرف میکروارگانیسم های زنده (پروبیوتیک ها) در مواد غذایی به منظور داشتن اثر سلامت بخشی در انسان، در کشورهای مختلف جهان رایج بوده است (۲ و ۱). باکتری های پروبیوتیک، میکروارگانیسم‌های زنده ای هستند که وقتی در مقادیر متعادل مورد استفاده قرار گیرند در سلامتی میزبان مفید خواهند بود. این باکتری ها با استقرار در بخش های مختلف بدن سبب ایجاد خواص سلامت بخشی برای میزبان می شوند و باید بر حسب کاربردشان به میزان کافی بکار روند (۳). خصوصیات ویژه ای در پروبیوتیک‌ها سبب شده که قابل اهمیت

باشند از جمله اینکه این میکروارگانیسم ها غیر بیماریزا هستند و عوارضی مشابه عوارض ناشی از مصرف آنتی بیوتیک‌هارا ندارند، به آنزیم‌های هضم کننده مقاوم می‌باشند، دارای خاصیت ضد سرطانی و ضد توموری هستند و قدرت کاهش کلسترول و چربی های خون را دارند (۶-۴). پروبیوتیک‌ها عمدتاً از جنس *لاکتوباسیلوس* و *بیفیدیوباکتریوم*ها می‌باشند و شبیه به میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش انسان هستند از این رو دارای خصوصیاتی چون تحمل اسید و املاح صفراوی، تولید اسیدهای ارگانیک، پراکسیدهیدروژن، ترکیبات ضد میکروبی و تجمع پذیری سلولی با باکتری های بیماریزا، ممانعت از اتصال باکتری های بیماری زا به سطوح دستگاه گوارشی و ... می باشند (۱۰-۷). باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی با میکروب های بیماری زا و اثرات ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های بیماری زا به سلول هدف در میزبان شان شده و آن ها را با تولید ترکیبات ضد میکروبی از بین می برند و از شروع روند بیماری جلوگیری می کنند (۱۱). مطالعات کمی درارتباط با تجمع سلولی میان باکتری های پروبیوتیک و باکتری های بیماریزا انجام شده است که نشان می دهد، پروتئین های موجود در مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیکی در تجمع سلولی نقش دارند و اغلب پروتئین‌های سطحی می‌باشند (۷). یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین APF است که اخیراً به عنوان پروتئین سطحی موثر در تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس‌ها* شناسایی شده است (۱۲). پروبیوتیک‌های مورد مطالعه در این تحقیق از جنس *لاکتوباسیلوس* می‌باشند که باکتری‌های گرم مثبت، کاتالاز منفی، غیر متحرک و فاقد اسپور هستند (۱۳). هدف از این تحقیق، بررسی اثر ضدمیکروبی و اثر تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی جدا شده از محصولات لبنی و *لاکتوباسیلوس*های خریداری شده *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 و*لاکتوباسیلوس کازه‌ئی* PTCC 1608 بر علیه باکتری های بیماریزا شایع نظیر *اشریشیا کلی* PTCC 1396، *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1310، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *کلبسیلا پنومونیه* و *انتروکوکوس فیکالیس* بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی از ماست سنتی شهرستان سبزوار

ابتدا نمونه هایی از ماست های محلی شهرستان سبزوار با شرایط استریل جمع آوری شد و ۱ گرم از هر نمونه با ۵۰ml آب مقطر رقیق و از آن ۱ml به ۵۰ml محیط کشت MRS براث (Merck, Germany) انتقال داده شد و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°c در جار بی هوازی گرماگذاری شدند. سپس خالص سازی نمونه ها با روش کشت خطی برروی محیط کشت MRS آگار (Merck, Germany) انجام و با استفاده از رنگ آمیزی گرم، باسیل های گرم مثبت نازک و زنجیره ای برای تایید *لاکتوباسیلوس* از سایرین جدا شدند. آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی برای شناسایی بیشتر انجام گردید (۱۴). ده جدایه *لاکتوباسیلوس* از نظر میزان پتانسیل پروبیوتیکی با آزمایشاتی نظیرتحمل شرایط محیط با pH اسیدی ۸-۲ و تحمل نمک صفراوی XGAL(Merck, Germany) بررسی شدند و دو جدایه که نتایج بهتری نسبت به سایرین داشتند انتخاب و از آنها برای انجام آزمایشات بعدی ذخیره گلیسرول تهیه و در ۲۰°c- نگهداری شدند (۱۵).

شناسایی مولکولی *لاکتوباسیلوس* های با خاصیت پروبیوتیکی بر اساس تعیین ترادف ژن 16SrRNA

مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج DNP™ (High yield DNA purification) در شرایط استریل انجام شد و برای بررسی کیفیت DNA استخراج شده از ژل آگارز یک درصد و الکتروفورز استفاده شد. غلظت DNA با دستگاه نانو اسپکتروفتومتری (Termo nonodrap 1000) از رابطه Conc DNA(µg/ml)=50.d.A260 اندازه گیری شد و DNAهای ژنومی با استفاده از PCR از نظر تکثیر 16SrRNA مورد بررسی قرار گرفتند. واکنش PCR به منظور تکثیر DNA استخراج شده در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر (بافر PCR 10x ۵µl، $Mgcl_2$ (۲mM)۵µl، dNTPs (۲/۵mM) ۱/۵ µl، از هر پرایمر (۱۰pMol) ۱ µl و آنزیم Taqپلیمراز (۵u) و ۳ میکرولیتر DNA الگو و تا حجم نهایی (۵۰ میکرولیتر آب مقطر) در ۳۵ سیکل تکثیر، مرحله اولیه جداسازی دورشته در ۹۵°C به مدت ۲ دقیقه، مرحله واسرشت شدن در ۹۵°C به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها ۵۲°C به مدت ۴۵ ثانیه، مرحله طویل شدن رشته هدف در۷۲°C به مدت ۱ دقیقه ومرحله طویل شدن نهایی در ۷۲°C به مدت ۵ دقیقه انجام شد. از مخلوط واکنشگر PCR فاقد DNA الگو به عنوان شاهد منفی و *لاکتوباسیلوسوس پلانتاروم* استاندارد PTCC 1058) تهیه شده از بانک میکروبی سازمان پژوهش های علمی صنعتی ایران) به عنوان سویه کنترل مثبت استفاده گردید. برای واکنش PCR از یک جفت پرایمر جهانی fD1 (5′CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′) و rD1 (5′-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3′) (سیناژن-ایران) استفاده شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز

توسط دستگاه Gel documentation (Cambridge U.K) مشاهده شد و نمونه ها برای تعیین توالی به شرکت BioNeer کره جنوبی فرستاده شدند (۱۶).

آماده سازی باکتری ها و شرایط کشت آن ها

باکتری های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC 1058 و *ولاکتوباسیلوس کازئی* PTCC 1608 و باکتری های بیماریزا *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC 1310 و *اشریشیا کلی* PTCC 1396 از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شدند. باکتری های پروبیوتیکی خریداری شده در ۵۰ml محیط MRS براث تلقیح و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در جار بی هوازی گرماگذاری شدند و سپس از آن ها کشت جامد تهیه شد. باکتری های بیماریزای *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیا کلی* خریداری شده هر کدام در ۵۰ml محیط BHI براث (Merck, Germany) تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سویه های باکتری های بیماریزای *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکس فکالیس* از بیمارستان تهران تهیه شدند و از صحت باکتری بیماری زا با استفاده از روش تست حساسیت به آنتی‌بیوتیک ها و آزمون‌های بیوشیمیایی متداول استاندارد اطمینان حاصل گردید. از نمونه های باکتری‌های بیماریزا و باکتری های پروبیوتیک ذخیره گلیسرول ۳۰ درصد تهیه و در ۲۰- درجه نگهداری شدند (۸).

روش کشت دو لایه ای اصلاح شده

ابتدا باکتری های پروبیوتیک در محیط کشت مایع MRS براث (Merck, Germany) pH=۶/۵ تحت شرایط استریل کشت داده شدند و پس از گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در جار بی هوازی، ۵۰ µl از هر پروبیوتیک در وسط پلیت حاوی محیط MRS آگار (Merck, Germany) ریخته و اجازه داده شد تا رطوبت حاصل از مایع میکروبی کاملاً جذب محیط شود و مجدداً پلیت های MRS آگار (Merck, Germany) به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه در جار بی هوازی گرما گذاری گذاری شدند. سپس محیط MHA (Merck, Germany) مذاب برروی محیط MRS آگار (Merck, Germany) حاوی پروبیوتیک ریخته و اجازه داده شد تا کاملاً محیط ببندد. سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از کشت شبانه باکتری های بیماریزا تهیه و بصورت متراکم بر روی محیط MHA (Merck, Germany) کشت داده شدند. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری و سپس از نظر قطر هاله عدم رشد بررسی شدند. آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار شد و میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری های بیماریزا درحضورباکتری های پروبیوتیک گزارش گردید (۱۶ و ۸).

تأثیر کشت همزمان بر مهار رشد باکتری‌های بیماریزا

ابتدا کشت شبانه باکتری های پروبیوتیک در محیط MRS براث (Merck, Germany)، در جار بی هوازی و دمای ۳۷ درجه سلسیوس تهیه شد. باکتری های بیماری زا به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس در محیط کشت BHI (Merck, Germany) گرماگذاری شدند. سپس باکتری‌های پروبیوتیک و بیماریزا به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و با بافرفسفات PBS (pH=۷/۲) شستشو داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از باکتری های پروبیوتیک و بیماریزا در بافر فسفات حل و بطور همزمان (cfu /ml) $۱۰^{۷}$ – $۱۰^{۶}$ از باکتری های پروبیوتیک و (cfu /ml) $۱۰^{۶}$– $۱۰^{۵}$ از باکتری های بیماریزا به محیط کشت BHI (Merck, Germany) تلقیح شدند (۱). در ساعت اول و همچنین پس از ۱۶ ساعت، ۱ میلی لیتر از کشت توأم را خارج و از آن سری رقت در محیط کشت اختصاصی هر باکتری با استفاده ازروش pour plate تهیه شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شده و تعداد cfu بررسی شد. جهت کنترل و مقایسه از هر باکتری بیماریزا به تنهایی در محیط کشت BHI (Merck, Germany) کشت داده شد و مطابق روش بالا آزمایش بر روی آن ها انجام شد. درصد مهار رشد باکتری های بیماریزا در حضورباکتری های پروبیوتیک از طریق فرمول زیر محاسبه گردید (۱۷ و ۸).

$$\text{درصد مهار رشد} = \frac{(\text{کنترل}(cfu\,/ml) - \text{کشت همزمان}(cfu\,/ml))}{\text{کنترل}(cfu/\,ml)} \times 100$$

بررسی تجمع یافتن باکتری های پروبیوتیک با باکتری های بیماریزا

دراین آزمون میزان درصد اتصال باکتری های پروبیوتیک به باکتری های بیماری زا و بر اساس روش Collado بررسی شد (۱۸). ابتدا باکتری های پروبیوتیک در محیط MRS براث (Merck, Germany) کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و در جار بی هوازی گرماگذاری شدند. کشت شبانه از باکتریهای بیماریزا در محیط BHI (Merck, Germany) تحت شرایط ۳۷ درجه سلسیوس بدست آمد. باکتری های پروبیوتیک و

باکتریهای مورد آزمایش در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه و با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و توسط بافر فسفات شستشو داده شدند. مایع رویی خارج شده و از رسوب باقی مانده در انتهای لوله، سوسپانسیون باکتریایی در PBS با میزان جذب نوری ۴ درصد در طول موج ۶۶۰nm برای هر نمونه تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه باکتری های پروبیوتیک و ۵۰۰ میکرولیتر از باکتریهای بیماریزا با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. پس از ۴ ساعت هر لوله اپندورف حاوی مخلوط باکتری های پروبیوتیک و بیماریزا سانتریفیوژ شدند. مایع رویی از نظر میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ nm بررسی شدند و میزان تجمع یافتن براساس فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد تجمع یافتن} = A_1\text{-}A_2 / A_1 \times 100$$

A_1 میزان جذب نوری بلافاصله پس از مخلوط کردن باکتری های پروبیوتیک و باکتری های مورد نظر است و A_2میزان جذب نوری مایع رویی پس از ۴ ساعت است در این آزمایش به عنوان کنترل هر باکتری به تنهایی بررسی شد (۱۹ و ۱۸).

بررسی تجمع یافتن باکتری های پروبیوتیک با باکتری های بیماریزا با استفاده از میکروسکوپ AFM

در این آزمایش برای اولین بار با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس کازه ئی* با *سودوموناس آئروژینوزا* مورد مطالعه قرار گرفت. ابتدا تجمع پذیری باکتری ها بر طبق روش Collado انجام شد (۱۸). سپس از نمونه توسط سمپلر بر روی لامل استریل به ابعاد ۱×۱ میلی متر یک قطره قرار داده شد وپس از خشک شدن کامل در دمای اتاق توسط میکروسکوپ نیروی اتمی(AFM) ازآن عکس برداری شد (۲۰).

محاسبات آماری

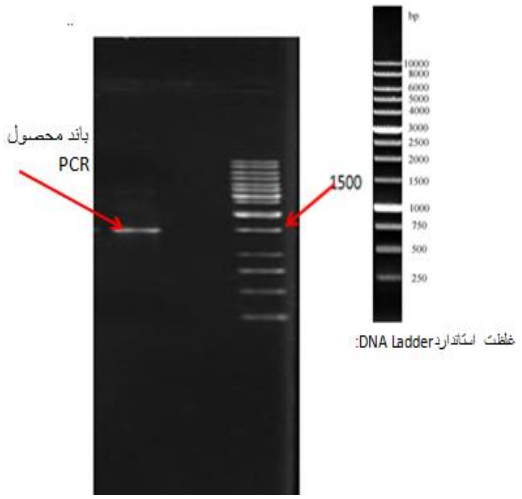
تجزیه و تحلیل آماری نتایجبا آزمون T-test در این مطالعه توسط نرم افزارSPSS نسخه 16 محاسبه گردید.

یافته‌ها

پس از تعیین ترادف 16S rRNA جدایه ها و هم ترازی ترادف های به دست آمده با ترادف های معتبر تطابق (Blast) گردید به منظور رسم درخت فیلوژنی سویه های ترادف یابی شده، از نرم افزار Clustal (1.82 version)، نرم افزار (Phylodrow Version 0.80) و روش Neighbour joining استفاده شد. تحلیل داده توالی یابی شده توسط شرکت BioNeer کره جنوبی نشان داد که دو سویه K1 و Y11 جدا شده از ماست سنتی سبزوار دارای ۹۹٪ شباهت با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* است (تصویر ۲). سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y11 با شماره اختصاصی GenBank: JX556102.1. در مرکز ملی داده های بیولوژیکی (NCBI) به ثبت رسید (تصویر ۱).

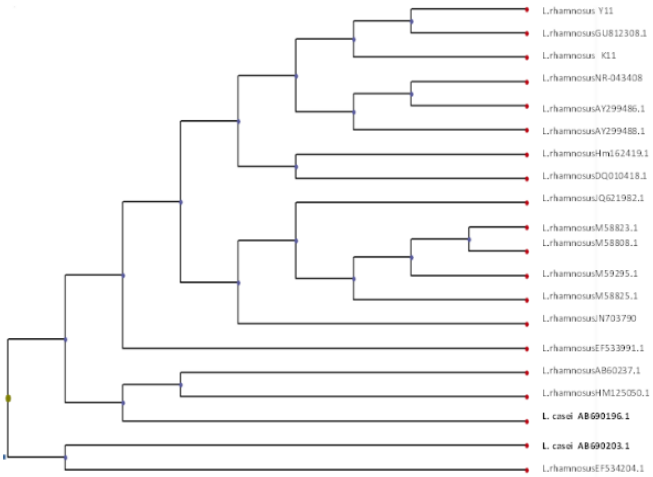
نتایج ارزیابی کشت دولایه اصلاح شده نشان داد که از میان چهار باکتری پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس کازه‌ئی* دارای بیشترین میانگین اثرمهار رشد میکروبی بر روی باکتری های بیماری زا و بویژه برروی *سودوموناس آئروژینوزا* با قطر هاله عدم رشد ۳۵/۱ میلی متر بود. میانگین قطر هاله عدم رشد *کلبسیلا پنومونیه*، *استافیلوکوکوس اورئوس وانتروکوکس فکالیس* در حضور این باکتری پروبیوتیک ۳۳ میلی متر بدست آمد و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین اثر ضدمیکروبی را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۵/۳۳ میلی متر داشت و از بین سویه های جداشده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* Y11 دارای بیشترین اثر مهاری رشد بر روی *کلبسیلا پنومونیه* با میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۴/۳۳ میلی متر بود (نمودار ۱).

در کشت همزمان، *لاکتوباسیلوس کازه ای* به ترتیب بیشترین اثر مهاری رشد را بر باکتری های بیماری زای *سودوموناس آئروژینوزا* و *اشریشیاکلی* به ترتیب با میانگین ۸۰/۰۳ و ۷۱/۰۵ در صد مهار رشد نشان داد. همچنین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین اثر مهاری رشد را برروی باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *انتروکوکوس فکالیس* به ترتیب با میانگین ۷۵/۰۱ و ۷۰/۰۶ درصد مهار رشد نشان داد و *کلبسیلا پنومونیه* کمترین میانگین درصدهای مهار رشد در حضور باکتری های پروبیوتیک ها را داشت. در میان جدایه‌ها با روش کشت مشابه بیشترین میانگین درصد مهار رشد باکتری های بیماریزا در حضور *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* K1 مربوط به سویه *سودوموناس آئروژینوزا* و کمترین میانگین درصد مهار رشد مربوط به سویه *استافیلوکوکوس اورئوس* با ۴۵/۶۵٪ بود. میانگین درصد مهار رشد *انتروکوکوس فکالیس* در حضور چهار باکتری پروبیوتیک ۶۲/۷۵٪ بود.



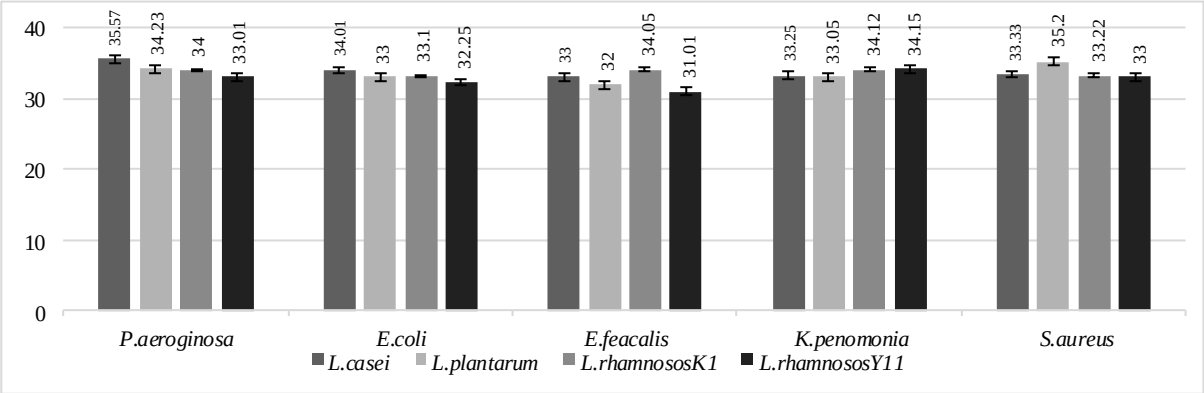
شکل ۱: محصول PCR، باند bp۱۵۰۰ مربوط به ژن 16s rRNA باکتری جداسازی شده لاکتوباسیلوس رامنوسوس Y11 از ماست سنتی سبزوار.

از بین جدایه ها *لاکتوباسیلوس رامنوسوس K1* بر روی *استافیلوکوکس اورئوس* با میانگین مهار رشد ۵۵/۱۶٪ بیشترین اثر و برروی *کلبسیلا پنومونه* کمترین اثر را نشان داد (نمودار ۲). بررسی اثر تجمع پذیری لاکتوباسیلوس های پروبیوتیک با باکتری های بیماریزا از این جهت که از اثر ضد اتصالی بر روی آن ها داشته و از شروع بیماری جلوگیری می کند اهمیت دارد نتایج نشان داد که میزان تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس کازه ای* با *سودوموناس آئروژنزا* و *اشیرشیا کلی* بیش از سایر باکتری ها است و به ترتیب با میانگین تجمع یافتن ۷۷/۰۳ و ۶۸/۱۵ درصد بدست آمد وهمچنین میانگین تجمع یافتن *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با *استافیلوکوکس اورئوس* بیش از سایرباکتری های پروبیوتیک ۶۵/۱۳ درصد بود. تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به طور مجزا با *استافیلوکوکوس اورئوس* با میکروسکوپ نوری نیز بررسی شد (تصویر ۳).

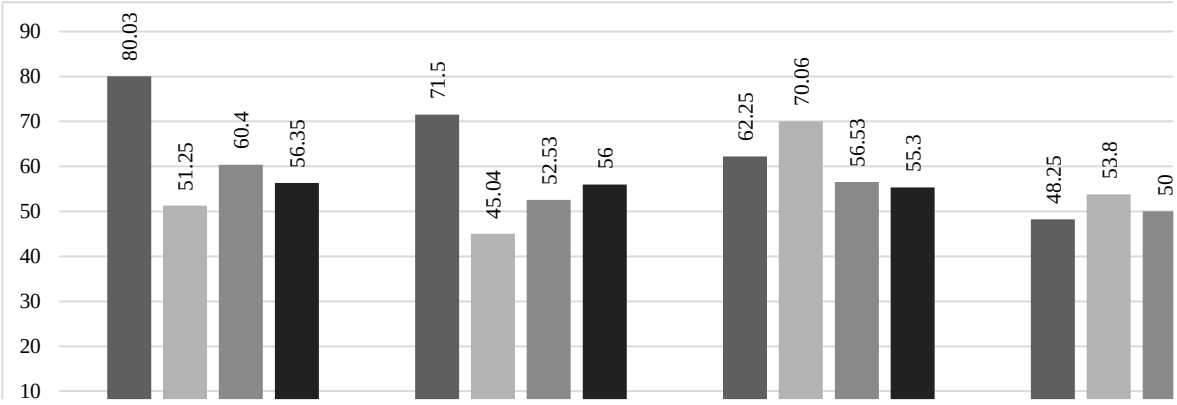


شکل ۲: رسم درخت فیلوژنی سویه های *لاکتوباسیل* جدا سازی شده *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* K11 و Y11 از ماست سنتی سبزوار با استفاده از نرم افزار (Phylodrow Version 0.80)

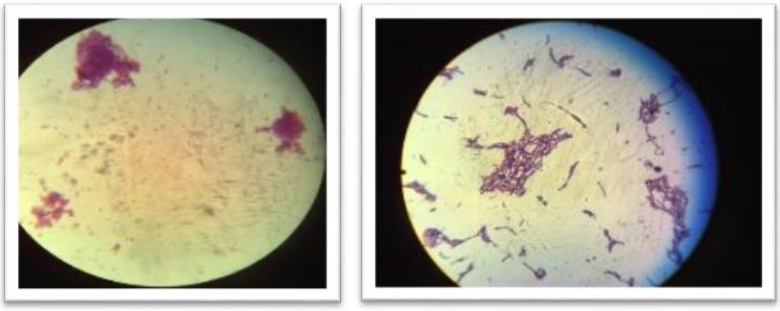
در بین جدایه ها نیز *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* K1 بیشترین میانگین تجمع پذیری را با *سودموناس آئروژینوزا* ۵۰ درصد و کمترین میانگین تجمع پذیری آن با *کلبسیلا پنومونیه* ۴۲/۴۶ درصد بود. همچنین بررسی نتایج آزمون تی مستقل نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معنی‌داری بین *لاکتوباسیلوس* ها وجود دارد. (نمودار ۳). مشاهده تجمع سلولی باکتری پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوسوس کازئی* با باکتری بیماری زای *استافیلوکوکوس اورئوس* در حد میکرومتر با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) صورت گرفت و پس از عکس برداری با استفاده از نرم افزارهای این میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM)، باکتری های کروی شکل *استافیلوکوکوس اورئوس* با اندازه حدود ۰/۵ میکرومتری که توسط باکتری های میله ای شکل *لاکتوباسیلوس کازه ئی* با اندازه حدود ۱ میکرومتری احاطه شده بود، مشاهده شد (تصویر ۴).



نمودار ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد در کشت کامل باکتری های پروبیوتیک بر علیه باکتری های بیماریزا بر حسب میلی متر

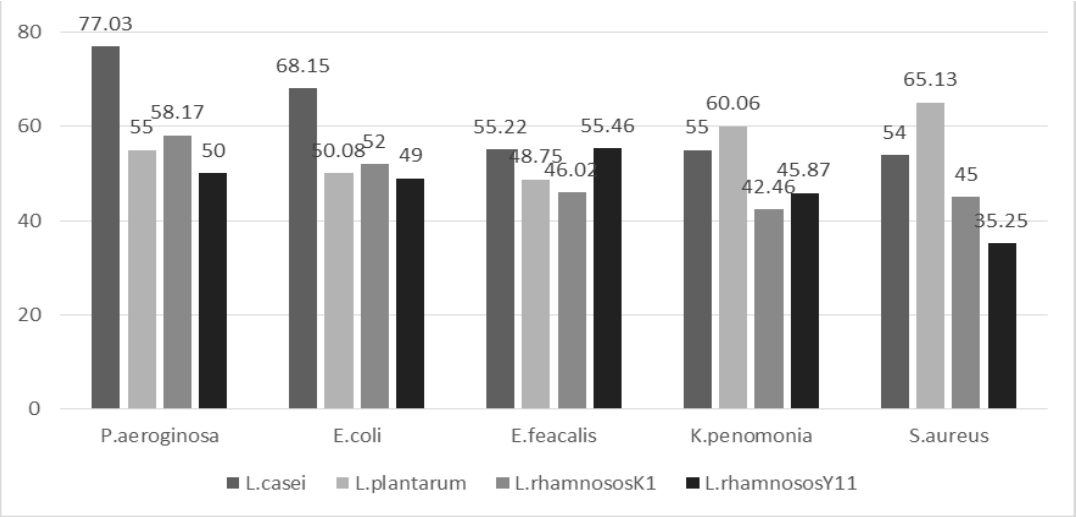


نمودار ۲: میانگین درصد مهار رشد تأثیر کشت همزمان باکتری های پروبیوتیک بر روی باکتری های بیماری زا

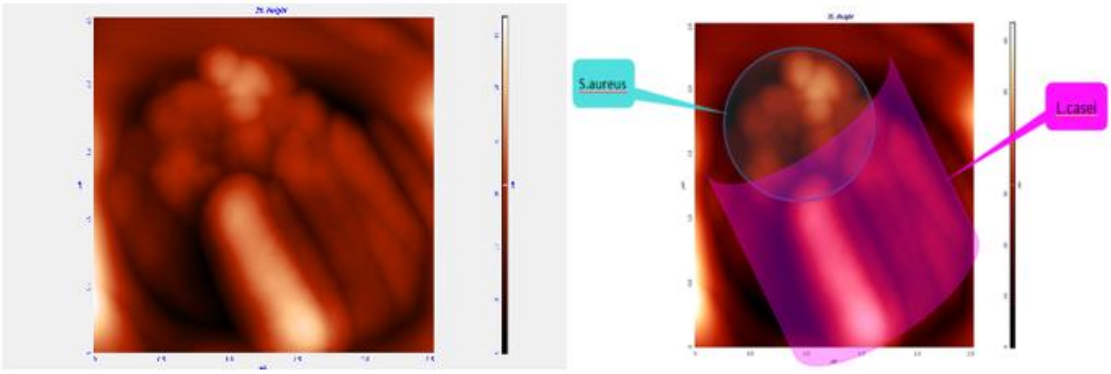


L.casei+S.aureus *L.plantarum+S.aureus*

شکل ۳: تصویر تجمع سلولی باکتری های پروبیوتیکی *لاکتوباسیلوس کازه ئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با باکتری بیماری زای *استافیلوکوکوس اورئوس* با استفاده از میکروسکوپ نوری.



نمودار ۳: میانگین درصد تجمع یافتن باکتری های پروبیوتیک و باکتری های بیماری زا



شکل ۴: تصویر میکروسکوپی از تجمع سلولی *لاکتوباسیلوس کازئی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در حد میکرومتر که درابتدا تجمع پذیری باکتری ها بر طبق روش Collado انجام شد (۱۸). سپس از نمونه توسط سمپلر بر روی لامل استریل به ابعاد ۱×۱ میلی متر یک قطره قرار داده شد وپس از خشک شدن کامل در دمای اتاق توسط میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM) ازآن عکس برداری شد.

بحث

امروزه با افزایش بیماری ها و پیدایش سویه‌های باکتری‌های مقاوم به آنتی بیوتیک‌ها، محققین را بر آن داشته تا با روش‌های جدید و بکارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، درمان و کنترل بیماریها را میسر سازند. این مطالعه به منظور بررسی خواص ضد میکروبی باکتری های پروبیوتیک بر روی برخی از باکتری های بیماریزا و مهار آن ها بر اساس مکانیسم ضد اتصالی و تجمع پذیری باکتری های پروبیوتیک و باکتری های بیماریزا انجام شد. در این تحقیق برای بررسی اثر کشت کامل باکتری های پروبیوتیک از روشی که در سال ۲۰۰۱ دانشمندی به نام Maia آن را Double layer method نامید و در سال ۲۰۱۰ توسط Arbab Solemani و همکاران کمی اصلاح شد و Modified Double Layer نام گرفت، استفاده شد (۸ و ۱۶). کشت کامل باکتری های پروبیوتیک در این آزمایش اثر مهاری بر رشد باکتری های بیماریزا داشتند. میانگین مجموع قطر هاله عدم رشد در روش کشت دو لایه ۳۴/۵ میلی متر بدست آمد و *لاکتوباسیلوس کازئی* بیشترین اثر مهارکنندگی را بر رشد *سودوموناس آئروژینوزا* با اندازه قطر هاله عدم رشد ۳۵/۵۷ میلی متر داشت که این نتایج مطابق با یافته های Christian Forestierو همکارانش در سال ۲۰۰۸ بود که توانایی باکتری های پروبیوتیک در جلوگیری از عفونت *سودموناس آئروژینوزا* را در بین بیماران گزارش کردند (۲۱). Mami anas و همکارانش در سال ۲۰۱۴ اعلام کردند کشت کامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اثرات ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیاکلی* و *باسیلوس سوبتلیس* دارد و نشان دادند *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین اثر ضد میکروبی را دارد که دراین تحقیق نیز *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بیشترین اثر ضد میکروبی علیه

استافیلوکوکوس اورئوس نشان داد (**۲۲**). یکی از توانایی های باکتری‌های پروبیوتیک آن است که قادرند باکتری های بیماریزا را به دام انداخته و با آن ها تجمع یابند، بدین ترتیب فعالیت باکتری های بیماریزا متوقف و عملکردشان مهار می شود. گزارش هایی از Reid در سال ۱۹۸۸، Schachtsiek در سال ۲۰۰۴ و Collado در سال ۲۰۰۷ وجود دارد که بیان داشتند باکتری های پروبیوتیک علاوه بر تولید عوامل ممانعت کننده رشد باکتری های بیماریزا نظیر اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و یا تولید باکتریوسین، با مکانیسم تجمع سلولی با باکتری های بیماریزا، مکانیسم دفاعی قابل اهمیتی را برای میزبان بر علیه اتصال و استقرار عوامل باکتریایی بیماری زا ایجاد می کنند (**۲،۲۱،۲۴**)؛ اما هنوز مطالعات در خصوص مکانیسم های تجمع سلولی و باکتری های بیماریزا ها وجود ندارد و روش های کمی در حال حاضر برای اندازه گیری قابلیت تجمع سلولی باکتری های پروبیوتیک وجود دارد که توسط Cesena و همکارانش در سال ۲۰۰۱، Jankovi ۲۰۰۳ و collado ۲۰۰۸ آزمایش شده است، در تحقیق حاضر برای اولین بار نشان داده شد که *لاکتوباسیلوسوس کازه ای* با *سودوموناس آئروژنزا* بیشترین درصد تجمع سلولی (۷۷/۰۳٪) را در میان دیگر باکتری های بیماریزا داشت (**۲۱** و **۲۵،۲۶**). نتایج حاصل از این آزمایش مؤید آن است که باکتری های پروبیوتیک با درصدهای بالایی قادرند با باکتری های بیماری زای مورد آزمایش تجمع یابند و بدین ترتیب سبب مهارباکتری های بیماریزا شوند و نیز میزان تجمع یافتن میان *لاکتوباسیلوس کازهئی* با باکتری های بیماریزا بیشتر از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بود و برای اولین بار توسط میکروسکوپ نیروی اتمی تجمع سلولی باکتری پروبیوتیکی با باکتری بیماری زا بررسی شد. در سال ۲۰۰۵ اثر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی *سودموناس آئروژینوزا* توسط Lim و همکارانش گزارش شد (**۲۷**). در این تحقیق نیز اثر کشت همزمان *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی و باکتری های بیماریزا بررسی شد که در این میان *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشترین اثر مهار رشد را نشان داد و مشابه نتایج بدست آمده توسط Lim و همکارانش در سال ۲۰۰۹ بود (**۲۷**). در کشت همزمان *لاکتوباسیلوس کازهئی* بیشترین اثر مهار کنندگی رشد را بر *سودموناس آئروژینوزا* (۸۰/۰۳٪) و سپس *اشریشیا کلی* (۷۱/۰۵٪) نشان داد که تقریباً با نتایج بدست آمده توسط Khalfa و Klale در سال ۲۰۰۸ یکسان بود (**۲۸**).

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از اساتید محترم دانشگاه حکیم سبزواری، جهت به ثمر رسیدن این پژوهش، تشکر و قدر دانی می گردد.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J Nutr. 2000;130(2S Suppl):384S-90S.

2. Reid G, Burton J. Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 2002;4(3):319-24.

3. FAO/WHO: Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a joint FAO/WHO Expert Consultation. 2001; October 1-Cordoba, Argentina.

   http://www.who.int/foodsafety/publications/fsmanagement/en/probiotics.pdf

4. Rafter J. Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. Br J Nutr. 2002;88 Suppl 1:S89-94.

5. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. Curr Issues Intest Microbiol. 2000;1(1):13-24.

6. Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. Int J Mol Sci. 2009;10(9):3755-75.

7. Collado MC, Surono I, Meriluoto J, Salminen S. Indigenous dadih lactic acid bacteria: cell-surface properties and interactions with pathogens. J Food Sci. 2007;72(3):M89-93.

8. Soleimani NA, Kermanshahi RK, Yakhchali B, Sattari TN. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis.

African Journal of Microbiology Research. 2010 18;4(20):2169-73.

9. Chou LS, Weimer B. Isolation and characterization of acid-and bile-tolerant isolates from strains of Lactobacillus acidophilus. Journal of Dairy Science. 1999 31;82(1):23-31.

10. Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS microbiology reviews. 2004 1;28(4):405-40.

11. Chen H, Hoover DG. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2003 Jul 1;2(3):82-100.

12. Reniero R, Cocconcelli P, Bottazzi V, Morelli L. High frequency of conjugation in Lactobacillus mediated by an aggregation-promoting factor. Journal of General Microbiology. 1992 Apr 1;138(4):763-8.

13. Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's manual of systematic bacteriology. Springer, New York, Berlin, Heidelberg. 2004.

14. Bosch M, Nart J, Audivert S, Bonachera MA, Alemany AS, Fuentes MC, Cuné J. Isolation and characterization of probiotic strains for improving oral health. Archives of oral biology. 2012 31;57(5):539-49.

15. Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. Int dair j. 1998 31;8(5):487-90.

16. Maia OB, Duarte R, Silva AM, Cara DC, Nicoli JR. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with Salmonella enterica subsp. enterica ser. Typhimurium. Vet microb. 2001 20;79(2):183-9.

17. Lim S, Dong-Soon IM. Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean fermented Foods. J. Microbiol. Biotechnol., 2009 19(2): 178–186.

18. Collado, M. C., Meriluoto, J., and Salminen, S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur. Food Res. Technol., 2008 22(6):1065-73.

19. Collado, M.C., Meriluoto, J., Salminen, S. Interactions between pathogens and lactic acid bacteria: aggregation and coaggregation abilities.Eur. J. Food Res. Technol.2007 10 (7):0632.

20. Dufrene YF. Atomic force microscopy, a powerful tool in microbiology. J Bacteriol. 2002;184(19):5205-13.

21. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of Lactobacillus caseirhamnosus: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. Res Microbiol. 2001 28;152(2):167-73.

22. Anas M, Eddine HJ, Mebrouk K. Antimicrobial activity of Lactobacillus species isolated from Algerian raw goat’s milk against Staphylococcus aureus. World J Dairy Food Sci. 2008;3(2):39-49.

23. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. Eur food res technol. 2008 1;226(5):1065-73.

24. Schachtsiek, M., Hammes, W.P., Hertel, C. Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 2004 70 (12): 7078–7085.

25. Cesena C, Morelli L, Alander M, Siljander T, Tuomola E, Salminen S, Mattila-Sandholm T, Vilpponen-Salmela T, Von Wright A. Lactobacillus crispatus and its nonaggregating mutant in human colonization trials. J dairy sci. 2001 31;84(5):1001-10.

26. Jankovic I, Ventura M, Meylan V, Rouvet, M., Elli, M., Zink, R..Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shapein *Lactobacillus gasseri* 4B2. J Bacteriol. 2003 18(5):3288–96.

27. Lim IS, Lee HS, Kim WY. The effect of lactic acid bacteria isolates on the urinary tract pathogens to infants in vitro. J Kor med sci. 2009 Jan 1;24(Suppl 1):S57-62.

28. Al-Delaimy KS, Kanakri KA. Bacterial Antagonism between Lactobacillus casei and Staphylococcus aureus with other Bacteria on Refrigerated Broiler Carcasses.