Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 10, Number 6 (January - February)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

The effect of Prebiotic Chitosan on the growth and antimicrobial characteristic of Probiotic *lactobacilli*

Nazila Arbab Soleimani[1], Roha Kasra Kermanshahi[2], Bagher Yakhchali[3]

1. Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran
2. Department of Biology, Alzahra University, Tehran, Iran
3. National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2016/07/31
Accepted: 2017/01/14
Available online: 2016/02/05

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 2017; 10(6): 34-43

Corresponding author at:

Dr. Nazila Arbab Soleimani

Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran

Tel: 0982335225046

Email:
nazilaarbab@yahoo.co.uk

Abstract

Background and Aim: Nowadays, prebiotics are the matter of interest, because of stimulating the growth and activity of beneficial enteric bacteria (probiotic) and their antimicrobial and antitumor characteristics. The aim of this research is to study the effect of prebiotic Chitosan on the growth of probiotic bacteria and their antimicrobial effect.

Materials and Methods: This research was done in 2010 in order to study of the effect of prebiotic chitosan on the growth of probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 by using of drawing growth curve of these bacteria in the presence of different chitosan concentrations, also, the effect of this prebiotic on antimicrobial properties of probiotic bacteria was investigated against *Escherichia coli* by using of overlay method and blank disk method.

Results: According to the test results, the growth of two probiotic bacteria were increased in the presence of chitosan and the most effective concentration of prebiotic chitosan was achieved, 6.5 (mg/mL).Antimicrobial effects of probiotic bacteria were increased in the presence of chitosan against *E.coli* especially Entrohaemoragic *E. coli* in comparison with the time that probiotic bacteria were used alone.

Conclusions: According to the results of this study, prebiotic chitosan, due to increasing effect on the growth and antimicrobial characteristic of probiotic *lactobacillus*, can be a proper candidate for effective symbiotic compound against pathogenic bacteria.

KeyWords: Prebiotic, Chitosan, *Lactobacillus*, Probiotic

Copyright © 2017 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Arbab Soleimani N, Kasra Kermanshahi R, Yakhchali B. The effect of Prebiotic Chitosan on the growth and antimicrobial characteristic of Probiotic *lactobacilli*. Iran J Med Microbiol. 2017; 10 (6): 34-43

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۰ – شماره ۶ – بهمن و اسفند ۱۳۹۵

Journal homepage: www.ijmm.ir

Farname Inc.

تأثیر پری‌بیوتیک کیتوزان بر رشد و خاصیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی

نازیلا ارباب سلیمانی[۱]، روحا کسری کرمانشاهی[۲]، باقر یخچالی[۳]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران
۳. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله
دریافت: ۱۳۹۵/۰۵/۱۰
پذیرش:۱۳۹۵/۱۰/۲۵
انتشار آنلاین: ۱۳۹۵/۱۱/۱۷
موضوع:
مواد ضد میکروبی

IJMM 1395; 10(6): 34-43

نویسنده مسئول:
دکتر نازیلا ارباب سلیمانی

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

تلفن: ۰۹۸۲۳۳۵۲۲۵۰۴۶

پست الکترونیک:
nazilaarbab@yahoo.co.uk

چکیده

زمینه و اهداف: امروزه پری‌بیوتیک‌ها ازنظر تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های روده‌ای مفید (پروبیوتیک‌ها)، خصوصیات ضد میکروبی و ضد توموری بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند. هدف از این تحقیق، بررسی اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها است.

مواد و روش کار: این تحقیق در سال ۱۳۸۹ به منظور بررسی اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر میزان رشد باکتری‌های پروبیوتیک *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 و *Lactobacillus casei* PTCC 1608 با استفاده از رسم منحنی رشد این باکتری‌ها در حضور غلظت‌های مختلف پری‌بیوتیک کیتوزان انجام شد و همچنین اثر این پری‌بیوتیک بر خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک علیه باکتری بیماری‌زای *E.coli* با استفاده از روش اثر کشت کامل و انتشار دیسک بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس آزمایش‌های انجام‌شده مشخص شد که رشد دو باکتری پروبیوتیک در حضور کیتوزان افزایش یافت و مؤثرترین غلظت پری بیوتیک کیتوزان ۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک این تحقیق در حضور کیتوزان علیه *E.coli* به‌ویژه انتروهموراژیک اشریشیاکلی *(EHEC)* در مقایسه بازمانی که خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی بررسی شد، افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: بر اساس یافته‌های این تحقیق پری‌بیوتیک کیتوزان به علت اثر افزایشی بر رشد و خاصیت ضدمیکروبی دو *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی می‌تواند به‌عنوان کاندید ترکیب سینبیوتیک مؤثر بر باکتری‌های بیماری‌زا باشد.

کلمات کلیدی: پری‌بیوتیک، کیتوزان، *لاکتوباسیلوس*، پروبیوتیک

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

مقدمه

پری‌بیوتیک‌ها، کربوهیدرات‌های زنجیره کوتاه غیرقابل‌هضم می‌باشند که تحت تأثیر آنزیم‌های گوارشی انسان قرار نگرفته و از طریق تحریک رشد و یا فعالیت یک یا تعدادی از باکتری‌های روده به‌سلامت میزبان کمک می‌نمایند (۳-۱). امروزه پری‌بیوتیک‌ها بسیار موردتوجه قرارگرفته‌اند، چراکه در نوع الیگوساکاریدهای با وزن مولکولی پایین می‌توانند به‌عنوان منابع کربن برای باکتری‌های روده به‌حساب آیند (۴). این مواد زمانی که بدون تجزیه شدن از روده کوچک عبور کردند، به‌صورت تغییرنیافته در اختیار باکتری‌های روده‌ای مفید (پروبیوتیک‌ها) قرارگرفته، سبب کاهش pH و تولید اسیدهای چرب زنجیره کوتاه شده که به نوبهٔ خود منجر به کاهش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا می‌شوند (۶،۵). پری‌بیوتیک‌ها ازنظر تحریک رشد و فعالیت باکتری‌های *Bifidobocterium* و *Lactobacillus* بااهمیت می‌باشند (۹-۷).

کیتوزان یک پلی مر خطی با پیوندهای (۴-۱) βگلوکوز آمینی است. این ماده مشتق داستیله شده کیتین می‌باشد. اغلب کیتوزان‌های تجاری موجود بیش از ۸۵٪ دی استیله شده هستند و وزن مولکولی بین ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ کیلو دالتون دارند. یکی از

خصوصیات مهم کیتوزان بار مثبت آن در محلول اسیدی است که این به علت وجود آمین‌های اولیه روی مولکول آن است که به پروتون‌ها متصل می‌شوند. قابلیت حل شدن کیتوزان زمانی صورت می‌گیرد که ۵۰٪ گروه‌های آمینی، پروتونه شوند، بنابراین حلالیت این ماده به‌شدت در pH بالاتر از ۶/۵ – ۶ کاهش می‌یابد. محلول‌های کیتوزان خصوصیت تشکیل فیلم دارند و بنابراین در ژل‌ها مؤثرند (۱۱،۱۰).

کیتوزان به علت فراوانی، قیمت مناسب و خصوصیات مؤثرش بسیار کاربرد دارد. این ماده دارای خاصیت ضد میکروبی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها است. فعالیت ضد میکروبی این ماده بستگی به نوع کیتوزان دارد. به‌طورکلی مخمرها و کپک‌ها نسبت به این ماده بسیار حساس هستند. دسته دوم میکروارگانیسم‌های حساس به کیتوزان باکتری‌های گرم مثبت و درنهایت باکتری‌های گرم منفی هستند. فاکتورهای متعددی وجود دارند که به‌طور محرک داخلی و خارجی فعالیت ضد میکروبی کیتوزان را تحت تأثیر قرار می‌دهند. کیتوزان‌های با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۱۰ کیلو دالتون) فعالیت ضد میکروبی بیشتری نسبت به کیتوزان طبیعی نشان می‌دهند. کیتوزان‌هایی که دی‌استیله شدن بالاتری دارند خاصیت ضد میکروبی بیشتری نشان می‌دهند که به علت حلالیت آن‌ها است (۱۳،۱۲).

کاهش pH سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی کیتوزان می‌شود. گفته می‌شود که خاصیت ضد میکروبی کیتوزان به علت واکنش یونی بین گروه‌های کاتیونی مولکول‌های کیتوزان و گروه‌های آنیونی غشاء سلولی میکروب است (۱۳).

کیتوزان به‌عنوان یک پری‌بیوتیک قادر است سبب تحریک رشد *Lactobacillus* و *Bifidobacteria* شود. این پری‌بیوتیک به علت طول کوتاه زنجیره و گروه‌های آزاد آمینی در واحدهای D–گلوتامین به‌راحتی حل می‌گردد و همچنین به علت خصوصیات فیزیولوژیکی نظیر پری‌بیوتیک بودن، ضد تومور و ضد میکروبی بسیار موردتوجه می‌باشد (۱۳،۱۲).

هدف از این تحقیق، بررسی اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌های مورداستفاده

باکتری‌های پروبیوتیک استفاده‌شده در این تحقیق *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 و *Lactobacillus casei* PTCC 1608 و سویه شاهد استاندارد *E.coli* ATCC 25922 به‌صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از Persian Type Culture Collection تهیه شدند.

باکتری بیماری‌زای جداشده از دستگاه ادراری یوروپاتوژنیک اشریشیاکلی (*UPEC*)، باکتری بیماری‌زای عامل اسهال به نام انتروتوکسیژنیک اشریشیاکلی (*ETEC*) و انتروهموراژیک اشریشیاکلی (*EHEC*) به ترتیب از دانشگاه الزهرا، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، و مرکز بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد تهیه شد.

محیط‌های کشت و پری بیوتیک

محیط‌های کشت استفاده‌شده در این تحقیق شامل *Lactobacillus* MRS Broth (MRSB) (شرکت HIMEDIA هندوستان)، Luria Broth (LB) (شرکت Merck آلمان)، Muller Hinton Broth (MHB) و Muller Hinton Agar (MHA) (شرکت Merck آلمان)، بودند. پری بیوتیک کیتوزان با درجه دی استیلاسیون ۷۵٪ از شرکت سیگما خریداری شد.

بررسی تأثیر پری بیوتیک کیتوزان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک

ازآنجاکه یکی از مکانیسم‌های اثر پری‌بیوتیک‌ها تأثیر بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک در جهت مثبت است این آزمایش جهت بررسی اثر افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک تحت تأثیر پری بیوتیک کیتوزان انجام شد. ابتدا غلظت‌های مختلف (۰/۱-۵۰ mg/mL) از کیتوزان تهیه شد. باکتری‌های پروبیوتیک در محیط کشت MRS براث (۵۰ mL) تحت شرایط بی‌هوازی در دمای ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند. از کشت تازه سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه شد. سپس سوسپانسیون میکروبی در محیط کشت تازه MRS براث (۵۰mL) تکمیل‌شده با غلظت‌های متفاوت پری بیوتیک‌کیتوزان و بدون پری بیوتیک به‌عنوان کنترل در ۳۷°C و جار بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت گرما گذاری شدند. هردو ساعت یک‌بار میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۶۲۵ nm بررسی شد و منحنی

رشد باکتری‌های پروبیوتیک در حضور و عدم حضور پری‌بیوتیک‌کیتوزان رسم شد (۱۴).

بررسی تأثیر پری بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک

بررسی اثرات ضد میکروبی کشت کامل باکتری‌های پروبیوتک در حضور کیتوزان

در این آزمایش بهترین غلظت پری‌بیوتیک مؤثر برافزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک انتخاب شد. پس از تهیه کشت شبانه باکتری‌های پروبیوتیک در حضور ۶/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از پری بیوتیک کیتوزان در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در جار بی‌هوازی، آزمایش‌های ضد میکروبی انجام شد. با کمک سمپلر ۵۰ میکرولیتر از هر پروبیوتیک رشد کرده در حضور کیتوزان در وسط پلیت حاوی محیط MRS آگار قرار داده شد و اجازه داده شد تا رطوبت حاصل از مایع میکروبی کاملاً جذب محیط گردد. پلیت های MRS آگار به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C و جار بی‌هوازی گرما گذاری شدند. سپس محیط مولر هینتون آگار MHA مذاب بر روی محیط MRS آگار حاوی پروبیوتیک رشد کرده در حضور کیتوزان ریخته شد و اجازه داده شد تا کاملاً محیط MHA ببندد. سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند از کشت شبانه باکتری‌های بیماری‌زا تهیه و به‌صورت متراکم به روی محیط MHA کشت داده شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷°C گرما گذاری شدند و پس از زمان گرما گذاری جهت بررسی قطر هاله عدم رشد بررسی شدند. آزمایش برای هر باکتری سه بار تکرار شد. به‌عنوان شاهد مراحل فوق انجام شد با این تفاوت که اثر ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی بررسی شد (۱۵).

روش انتشار دیسک

جهت تهیه مایع رویی، باکتری‌های پروبیوتیک در ۵۰ mL محیط کشت MRS براث در حضور ۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پری بیوتیک کیتوزان به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C و جار بی‌هوازی گرما گذاری شدند. سپس به لوله‌های سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰ rpm و دمای ۴°C سانتریفیوژ شدند. مایع رویی هر لوله با دقت به ظرف استریل دیگری منتقل و سپس از فیلتر میلی پور (۰/۲ میکرون) جهت اطمینان از عدم وجود هرگونه سلولی در مایع رویی عبور داده شدند. مایع رویی برای استفاده کوتاه‌مدت در فریزر ۲۰°C– و برای مصرف بلندمدت در ۷۰ °C– ذخیره شدند. کشت شبانه از باکتری‌های بیماری‌زا و شاهد *E.coli* در محیط لوریا برتانی (LB) در دمای ۳۷ °C تهیه شد. با کمک سوآب استریل از هر سوسپانسیون باکتری (معادل نیم مک فارلند) بر روی محیط MHA به‌صورت متراکم کشت داده شد و پس از جذب کامل رطوبت سوسپانسیون باکتری‌ها دیسک‌های حاوی ۵۰µL مایع رویی به کمک پنس استریل بر روی محیط کشت با رعایت فاصله هر دیسک از دیگری و نسبت به لبه پلیت قرار داده شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ °C گرما گذاری شدند و پس‌ازاین مدت قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری شد. این آزمایش سه بار تکرار شد. به‌عنوان شاهد اثر ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی بررسی شد (۱۶).

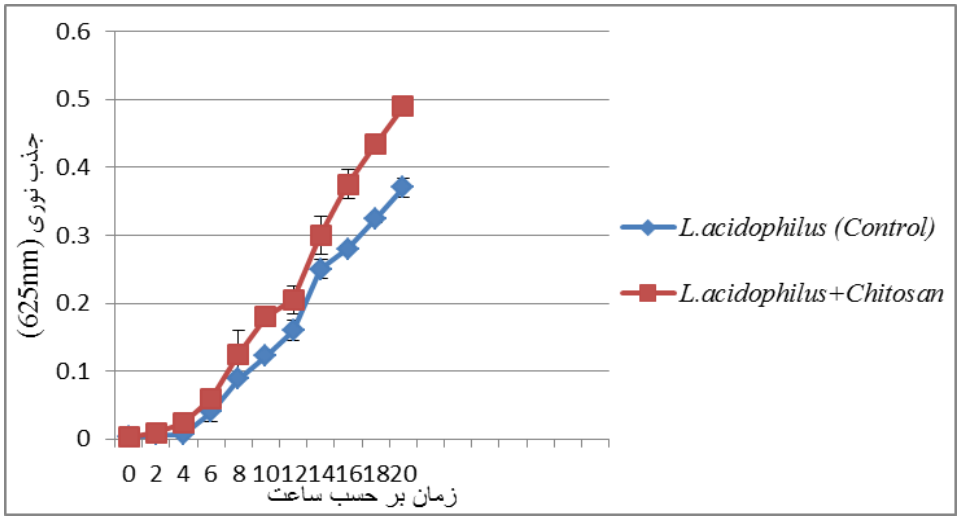
آنالیز آماری

آنالیز آماری در این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ .(SPSS Statistics for Windows, Version 17.0 Chicago: SPSS Inc,USA) و آزمون t جفت شده و بر اساس میانگین و انحراف معیار STDEV Error Bar رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel انجام شد. در اغلب داده‌ها تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ و ۰/۰۰۰۱ = P value مشاهده شد.

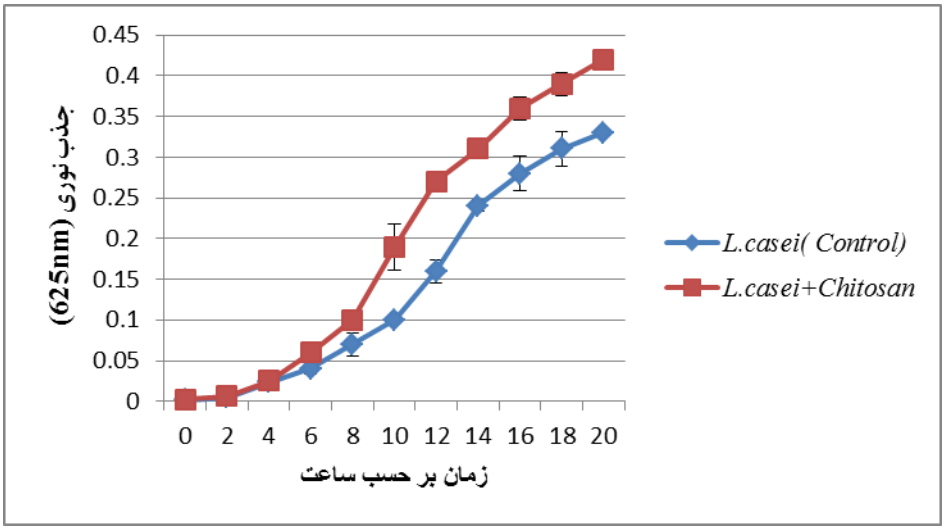
یافته‌ها

به‌منظور بررسی اثر پری بیوتیک‌ها برافزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک منحنی رشد پروبیوتیک‌ها در حضور پری‌بیوتیک کیتوزان رسم شد. پری بیوتیک کیتوزان دارای اثر افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک *L.acidophilus* و *L.casei* بود. بیشترین تأثیر پری‌بیوتیک کیتوزان برافزایش رشد *L.acidophilus* مشاهده شد. مؤثرترین غلظت پری بیوتیک کیتوزان ۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. آزمون آماری t جفت شده اثر کیتوزان بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک *L.acidophilus* و *L.casei* در مقایسه با شاهد فاقد کیتوزان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ٪۵ و ۰/۰۰۰۱= Pvalue را نشان داد.

در نمودارهای ۱ و ۲ به ترتیب اثر کیتوزان برافزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک *L.acidophilus* و *L.casei* نشان داده‌شده است.



نمودار ۱: تأثیر پری بیوتیک کیتوزان برافزایش منحنی رشد *L.acidophilus*

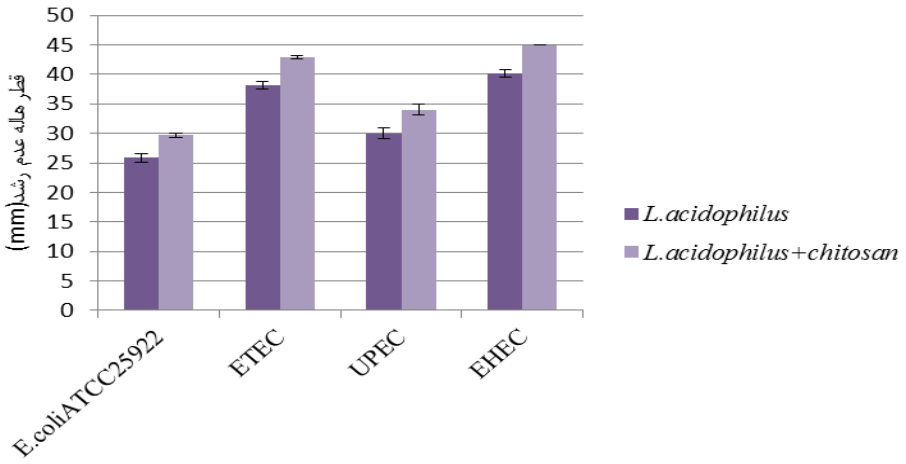


نمودار ۲: تأثیر پری بیوتیک کیتوزان برافزایش منحنی رشد *L.casei*

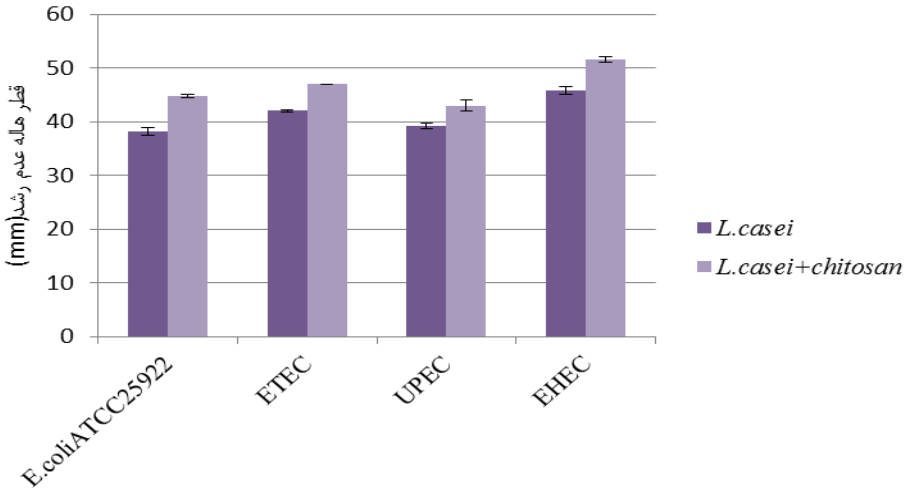
ازآنجاکه مؤثرترین غلظت کیتوزان در افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک حدود ۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود در این تحقیق به‌منظور بررسی تأثیر پری بیوتیک کیتوزان بر خصوصیات ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک از این غلظت استفاده شد. در ابتدا مشخص شد که باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی دارای خاصیت ضد میکروبی علیه سویه‌های *E.coli* به‌ویژه سویه جداشده از روده انسان هستند و بیشترین اثر ضد میکروبی کشت کامل و مایع رویی مربوط به *L.casei* که به ترتیب حدود ۵۰ و ۱۶/۵ میلی‌متر به دست آمد.

خصوصیات ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک پس از قرار گرفتن در حضور ۶/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پری بیوتیک کیتوزان بررسی شد. بیشترین تأثیر کیتوزان در افزایش خاصیت ضد میکروبی کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک مشاهده شد که قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور کشت کامل پروبیوتیک‌های تحت تأثیر کیتوزان در حدود ۵ میلی‌متر افزایش یافت. تأثیر پری بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های مورد آزمایش نیز مشاهده شد، قطر هاله‌های عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیک حدود ۴ میلی‌متر تغییر کرد. آنالیز آماری مقایسه میانگین اثر ضد میکروبی کشت کامل و مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیک به همراه کیتوزان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و ۰/۰۰۰۱= *P-value* را نشان داد.

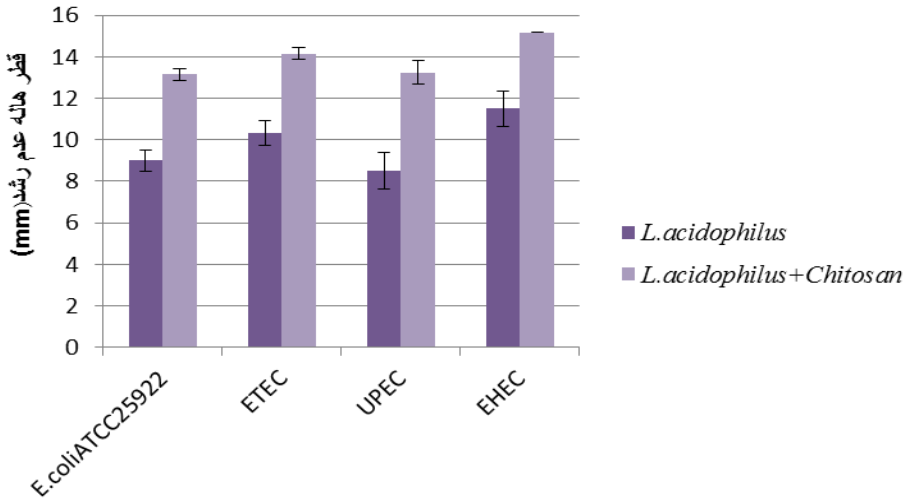
در نمودارهای ۳، ۴، ۵ و ۶ به ترتیب اثر کیتوزان برافزایش خاصیت ضدمیکروبی کشت کامل و مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیک *L.acidophilus* و *L.casei* علیه سویه‌های *E.coli* در مقایسه با وقتی‌که باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی بکار می‌روند نشان داده‌شده است.



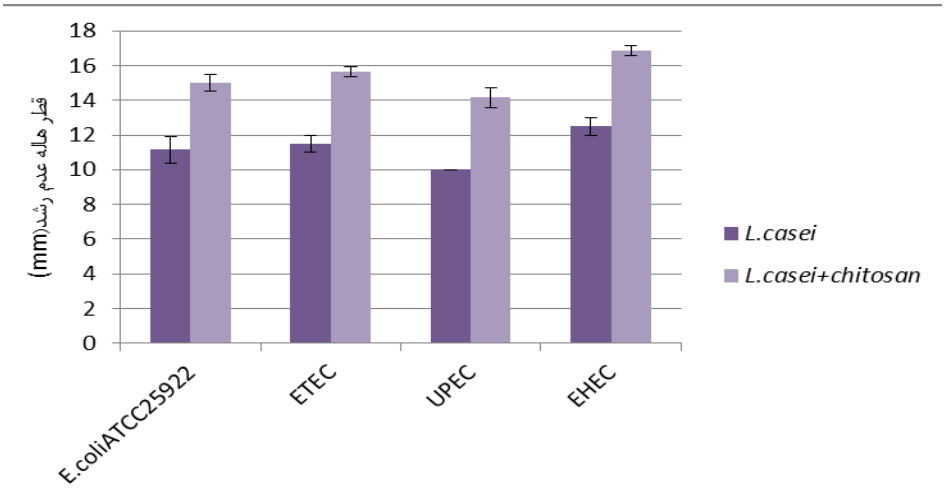
نمودار ۳: اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی کشت کامل *L.acidophillus* علیه سویه‌های بیماری‌زا و شاهد *E.coli* در مقایسه با شاهد فاقد کیتوزان



نمودار ۴: اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی کشت کامل *L.casei* علیه سویه‌های بیماری‌زا و شاهد *E.coli* در مقایسه با شاهد فاقد کیتوزان



نمودار ۵: اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی مایع رویی *L.acidophillus* علیه سویه‌های بیماری‌زا و شاهد *E.coli* در مقایسه با شاهد فاقد کیتوزان



نمودار ۶: اثر پری‌بیوتیک کیتوزان بر خاصیت ضد میکروبی مایع رویی *L.casei* علیه سویه‌های بیماری‌زا و شاهد *E.coli* در مقایسه با شاهد فاقد کیتوزان

بحث

امروزه محققین بر این باور هستند که پری‌بیوتیک‌ها، (کربوهیدرات‌های زنجیره کوتاه غیرقابل‌هضم)، می‌توانند ازنظر افزایش رشد و فعالیت باکتری‌های *Bifidobocterium* و *Lactobacillus* بااهمیت باشند (۸) و مصرف هم‌زمان پروبیوتیک و پری‌بیوتیک به‌صورت ترکیبات سین بیوتیکی سبب افزایش تعداد پروبیوتیک‌ها می‌شود. تحقیقات نشان داده است که پری‌بیوتیک ها تنها رشد یا فعالیت پروبیوتیک خوراکی را تحریک نمی‌کنند، بلکه سبب رشد و فعالیت باکتری‌های بومی خاصی در روده شده که این عملکرد مؤثر به نظر می‌رسد (۱۷،۵).

Gibson و Rabertford در سال ۱۹۹۵ واژه سین بیوتیک را تعریف کردند که درواقع مخلوطی از پروبیوتیک‌ها و پری‌بیوتیک‌ها هستند که اثرات مفید خود را از طریق مکمل‌های غذایی حاوی میکروب‌های زنده در دستگاه گوارش و تحریک انتخابی رشد و یا فعال کردن متابولیسم یک یا تعداد محدودی از باکتری‌های مؤثر در سلامت اعمال می‌نمایند و بدین ترتیب سبب رفاه میزبان می‌شوند. (۱۸،۵).

Gibson و همکارانش در سال ۲۰۰۶ و Oliver و همکارانش در سال ۲۰۱۴ به نقش مصرف تنهای پری‌بیوتیک‌ها که سبب رشد و فعالیت پروبیوتیک‌های بومی و نه تمام باکتری‌های گوارشی می‌شوند، اشاره کردند (۵،۲). Ping و همکارانش در سال

۲۰۰۷ به ترتیب اثر چند پری‌بیوتیک را برافزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک *L.plantarum*، *B.bifidium*، *L.acidophilus* LAFTI، *Bifidobacterium animalis* و *L.casei* نشان دادند (۲۰). تحقیقات بر روی عملکرد تخمیری درکشت بسته نشان داده است که پری‌بیوتیک‌هایی نظیر فروکتوالیگوساکاریدها (FOS) و کیتوزان قادرند پروفایل میکروفلور روده را تغییر داده و سبب افزایش تعداد *Bifidobacterium* و *Lactobacillus* و در برخی موارد سبب کاهش *کلستریدیم* و *باکتروئیدس* شود (۸). نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق بیانگر آن است که پری‌بیوتیک کیتوزان سبب افزایش رشد باکتری‌های پروبیوتیک می‌شود که مشابه تحقیقات این دانشمندان و Woo و همکارانش در سال ۲۰۰۳ است که اثر افزایش رشد *L.casei*، *B.infantis* و *B.bifidium* را در حضور کیتوزان اثبات کردند (۲۱).

به‌طورکلی اثر ضد میکروبی پری‌بیوتیک‌ها را بیشتر به علت تولید شرایط اسیدی، افزایش رشد پروبیوتیک‌ها که خود با مکانیسم‌های مختلف سبب حذف و مهار باکتری‌های بیماری‌زا می‌گردند، نسبت می‌دهند. پری‌بیوتیک کیتوزان علیه قارچ‌ها و باکتری‌هایی نظیر *آسپرژیلوس فومیگاتوس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، *فوزاریوم اگزوسپوروم*، *کاندیدا آلبیکنس*، *سالمونلا تیفی موریوم*، *اشرشیا کلی*، *ویبریو کلرا* و...، به‌تنهایی نیز دارای اثر ضد میکروبی است که مکانیسم اصلی این خاصیت ضد میکروبی را به واکنش یونی بین گروه‌های کاتیونی مولکول‌های کیتوزان و گروه‌های آنیونی غشاء سلولی میکروب نسبت داده‌اند (۲۲،۱۲). اثرات ضد میکروبی ترکیبات سین بیوتیکی (مخلوط پری‌بیوتیک‌ها و باکتری‌های پروبیوتیک) نیز از مسائل موردتوجه می‌باشد. در مطالعه‌ای مشخص شد که ترکیب سین بیوتیکی یک پری‌بیوتیک با *L. acidophillus*، *L.plantarum* و *B. bifidum*، سبب افزایش رشد آن‌ها شده و از رشد باکتری‌های بیماری زای انسانی نظیر *Campylobacter jejuni*، *Escherichia coli* و *Salmonella entritidis* در شرایط in vitro جلوگیری می‌کند (۱۹،۱۸).

Asahara و همکارانش در سال ۲۰۰۱ در تحقیقشان اثر ضد میکروبی پروبیوتیک *L.casei* سویه Shirota را برعلیه باکتری بیماری‌زا *E.coli* گزارش کردند (۲۳). بیشترین اثر ضد میکروبی مایع رویی *L.casei* به‌تنهایی علیه سویه*E.coli* جداشده از روده انسان حدود ۱۲/۵میلی‌متر به دست آمد. Heller و همکارانش در سال ۲۰۰۱ اعلام کردند که مایع رویی *L.casei* سبب مهار باکتری‌های *اشریشیاکلی* انتروهموراژیک (*EHEC*) و *اشریشیاکلی انتروتوکسیژنیک* (*ETEC*) می‌شود (۲۴). نتایج تحقیق حاضر در راستای تحقیقات دانشمندان ذکرشده به دست آمد که کشت کامل و مایع رویی دو باکتری پروبیوتیک این تحقیق دارای اثرات ضد میکروبی علیه *E.coli* بودند.

Fooks و Gibson در سال ۲۰۰۲ اثر پری بیوتیک را بر دو پروبیوتیک *L.plantarum* و *B.bifidium* بررسی کردند و نشان دادند که رشد دو باکتری پروبیوتیک و خاصیت ضد میکروبی آن‌ها علیه *E.coli* در حضور دو پری بیوتیک افزایش یافت (۲۵). Kermanshahi وGoudarzi در سال ۱۳۹۴ اثر پری‌بیوتیک ها را بر تولید ترکیبات ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد که قطر هاله عدم رشد باکتری بیماری‌زا در حضور ترکیب باکتری‌های پروبیوتیک و پری‌بیوتیک ها در مقایسه بازمانی که از باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی استفاده‌شده بود افزایش یافت (۲۶). Jehan وSalman در سال ۲۰۰۹ در طی تحقیقی نشان دادند که برخی از پری‌بیوتیک ها می‌توانند فعالیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس* ها را علیه باکتری‌های بیماری‌زا افزایش دهند. بر اساس یافته‌های این محققین تحریک و افزایش رشد *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی در حضور پری‌بیوتیک ها رخ می‌دهد که بر خاصیت ضد میکروبی آن‌ها اثر چشمگیری دارد (۲۷). Ravi و همکاران در سال ۲۰۱۳ نشان دادند که پری‌بیوتیک ها بر خاصیت ضد میکروبی و فعالیت آنزیمی پروبیوتیک ها اثر افزایشی دارند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که قطر هاله عدم رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور ترکیب باکتری‌های پروبیوتیک و پری‌بیوتیک حدود ۵ میلی‌متر نسبت به زمانی که باکتری‌های پروبیوتیک به‌تنهایی بررسی شدند، افزایش یافت (۲۸). در تحقیق حاضر آنالیز آماری مقایسه میانگین اثر ضد میکروبی کشت کامل و مایع رویی باکتری‌های پروبیوتیک به همراه کیتوزان تفاوت معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ و Pvalue =۰/۰۰۰۱ را نشان داد که در راستای تحقیقات محققین ذکرشده بود. بر اساس تحقیقات انجام‌شده و تحقیق حاضرمی توان گفت که دلیل احتمالی افزایش خاصیت ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی در حضور پری بیوتیک ها، افزایش رشد آن‌ها در حضور این ترکیبات است که با توجه به گونه‌های باکتری پروبیوتیکی افزایش رشد و درنتیجه خاصیت ضدمیکروبی آن‌ها متفاوت خواهد بود.

در این تحقیق مشخص شد، پری بیوتیک‌کیتوزان قادراست بر رشد باکتری‌های پروبیوتیک اثر مثبت داشته و خصوصیات ضد میکروبی آن‌ها را تقویت نماید، اما باید در انتخاب پری‌بیوتیک مناسب که بتواند اثر سینرژیک بر باکتری‌های پروبیوتیک داشته باشد، دقت کرد، چراکه هر پری‌بیوتیکی دارای چنین اثراتی نمی‌باشد. کاهش pH سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی کیتوزان می‌گردد که شاید به علت واکنش یونی بین گروه‌های کاتیونی مولکول‌های کیتوزان و گروه‌های آنیونی غشاء سلولی میکروب است. در این تحقیق میزان pH کشت حاوی پروبیوتیک‌ها و پری بیوتیک‌ها به علت تولید اسیدهای آلی که از متابولیت‌های باکتری‌های پروبیوتیک می‌باشد و مصرف پری بیوتیک‌ها توسط پروبیوتیک‌ها کاهش‌یافته و سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی ترکیب پروبیوتیک‌ها و کیتوزان شد.

تقدیر و تشکر

با تشکر و قدردانی از معاونت محترم پژوهش پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری که با در اختیار قرار دادن آزمایشگاه مجهز این تحقیق را موردحمایت قراردادند.

تعارض منافع

بین نویسندگان، هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Cardelle CA, Corzo N, Olano A, Peláez C, Requena T,Ávila M. Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: Influence of structure on Lactobacillus, Streptococcus and *Bifidobacterium* growth. Int J Food Microbiol 2011; 149: 81-87.
2. Gibson GR, Rastall RA. Prebiotics: Development & Application. John Wiley & Sons Ltd; 2006.
3. Kolida S, Tuohy K, Gibson GR. Prebiotic effects of inulin and oligofructose. British J of Nut 2002;87(2): 193–197
4. Rastall RA. Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture. Annu Rev Food Sci Tech 2010; 1: 305-339
5. Oliver L, Rasmussen H, Gregoire MB, Chen Y. Health care provider's knowledge, perceptions, and use of probiotics and prebiotics. Top Clin Nutr 2014; 29: 139–149
6. Wlodzimierz G, Olejnik A, Sip A. Probiotics, prebiotics and antioxidants as functional foods.Acta Biochimica polonica 2005; 52(3) 665–671
7. Martinez RCR, Aynaou AE, Albrecht S, Schols HA, Martinis ECP, Zoetendal EG, Venema K, Saad SMI, Smidt H. In vitro evaluation of gastrointestinal survival of *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 alone and combined with galactooligosaccharides, milk and/or *Bifidobacterium* animalis subsp. lactis Bb-12. Int J Food Microbiol 2011; 149: 152-158
8. Verse M, Marteau R P. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. The J of Nut 2007;137: 803–811.
9. Holscher J, Caporaso G, Hooda S, Brulc JM, Fahey GC, Swanson KS. Fiber supplementation influences phylogenetic structure and functional capacity of the human intestinal microbiome: follow-up of a randomized controlled trial. Am J Clin Nutr 2015; 101: 55–64.
10. Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. Inter. J. Food Microb 2010; 144: 51-63.
11. Simunek J, Tishchenko G, Hadrova B. Effect of chitosan on the growth of human colonic bacteria.Folia Microbiol 2006; 51 (4):306-308.
12. Tang H, Zhang P, Kieft T, Ryon S, Baker S, Wiesmann W, Rogelji S. Antibacterial action of anoval functionalized chitosan arginine against Gram- bacteria. Acta Biomaterialia 2010; 6: 2562-2571.
13. Rhoades J, Rastall Bob. Chitosan as an antimicrobial agent. Food Tech Int 2002; 31-33.
14. Brink M, Todoro SD, Martin JH, Senekal M, Dicks LMT. The effect of prebiotics on production of antimicrobial compounds, resistance to growth at low pH and in the presence of bile, and adhesion of probiotic cells to intestinal mucus. J of Microbiol 2006; 100: 813–821.
15. Maia OB, Duarte R, Silva AM. Evaluation of the components of a commercial probiotic in gnotobiotic mice experimentally challenged with Salmonella entrica subsp.entrica ser. Typhimurium. Vet. Microbiol 2001; 79: 183-189.

16. Jacobsen CN. Screening of probiotic activities of forty-seven strain lactobacillus ssp.by invitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in umans. Appl. Environ. Microbial 1999; 65: 4949-4956.

17. Costalos C, Kapiki A, Apostolou, M, Papathoma E. The effect of a prebiotic supplemented formula on growth and sool microbiology of term infants. Early Hum Dev 2007; 84: 45–49.

18. Caplan MS. Probiotic and prebiotic supplementation for the prevention of neonatal necrotizing enterocolitis. J of Perinatology 2009; 29: 2–6.

19. Martens EC, Kelly AG, Tauzin AS, Brumer H. The devil lies in the details: how variations in polysaccharide fine-structure impact the physiology and evolution of gut microbes. J Mol Biol. 2014; 426: 3851–3865.

20. Ping Su, Henriksson A, HazelMitchel l.Selected prebiotic support the growth of probiotic monocultures in vitro.Anaerob 2007; 13(3): 134-139.

21. Woo LH, Park YS, Jung JS, Shin WS.Chitosan oligosaccharides, dp2–8, have prebiotic effect on the *Bifidobacterium bifidium* and *Lactobacillus* sp. Anaerobe 2003; 8(6): 319-324.

22. Bindels LB, Delzenne NM, Cani PD, Walter J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2015; 12: 303–310.

23. Asahara T, Nomoto K, Watanuki M. Antimicrobial Activity of Intraurethrally Administered Probiotic *Lactobacillus casei* in a Murine Model of *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. Antimicro agents chemother 2001; 45(6): 1751–1760.

24. Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. Am J Clin Nutr 2001; 73: 374–379.

25. Fooks LJ, Gibson GR. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiol Ecol 2002; 39: 67–75.

26. Kasra Kermanshahi R, Goudarzi L. The Effect of Prebiotics on Production of Antimicrobial Compounds from Lactobacillus spp. Against Proteus mirabilis (ATCC 7002 and PTCC 1076). Iranian Food Sci Technol Res J 2015; 11 (1): 41-47. [in Persian]

27. Jehan A, Salman S. Synbiotic Effect of Probiotic (Bifidobacterium sp.) and Prebiotics (Chicory and Inulin) aganist some pathogenic bacteria. Um-Salama Sci J 2009; 6(2): 354-360.

28. Ravi D, Usha G, Parthasarathy R.Synthesis of Bacteriocin by Synbiotic Effect and Its Antibacterial Activity against Selected Respiratory tract Pathogens. Int J of Adv Res 2013; 1(10): 296-303.