مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره بیست و هفتم، شماره چهار، تیر ۱۳۹۸
تاریخ دریافت:۱۳۹۷/۳/۲۱
تاریخ پذیرش:۱۳۹۷/۷/۷

خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر و ماست سنتی شهرستان بابل و اثر ضدمیکروبی آن‌ها علیه سالمونلااینتریتیدیس *H7*

حسین سلطانمرادی[۱]، ابوالفضل داودآبادی[*۲،۳]، الناز زارع میرزایی[۱]

مقاله پژوهشی

مقدمه: امروزه پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی شناخته شده‌اند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر مناسب استفاده شوند، برای سلامتی میزبان مفید خواهند بود. هدف این مطالعه بررسی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جداشده از شیر و ماست سنتی می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه که از نوع بنیادی-کاربردی می‌باشد. خواص پروبیوتیکی پنج سویه لاکتوباسیلوس جدا شده از شیر و ماست سنتی شامل *L. plantarum* M19-1، *L. paralimentarius M4-3*، *L. paracasei M18-1*، *L. paracasei* Y8-1، *L.paracasei* Y1-3 و *L. fermentum* Y2-2 مورد بررسی قرار گرفت. اثر مهاری این سویه‌ها علیه *Salmonella enteritidis* H7 سنجیده شد. این سویه‌ها هم‌چنین از نظر حساسیت آنتی‌بیوتیکی، مقاومت به شرایط اسیدی، نمک‌های صفراوی و دارا بودن همولیز بررسی شدند.

نتایج: بیشترین اثر مهاری مربوط به سویه Y1-3 با میانگین قطر هاله ۱۴ میلی‌متر بود. در تست تحمل اسید در pH ۲/۵ بیشترین مقاومت مربوط به سویه M18-1 بوده که پس از سه ساعت کلنی‌هایش قابل شمارش بود. سویه M19-1 با C_{inh}، ۰/۲۶ بیشترین مقاومت را به صفرا (MRS براث حاوی ۰/۳٪ صفرا) نشان داد. هیچ‌یک از سویه‌ها فعالیت همولیز نداشتند.

نتیجه‌گیری: سویه‌های لاکتوباسیلوس با اثر ضدمیکروبی خوب بر علیه *Salmonella enteritidis* از شیر و ماست قابل جداسازی هستند که می‌توانند به‌عنوان کاندید پروبیوتیک جهت پیشگیری و درمان عفونت این باکتری استفاده شوند، البته مطالعات بیشتری در این زمینه موردنیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک‌ها، سالمونلااینتریتیدیس، ضدمیکروبی

ارجاع: حسین سلطانمرادی، ابوالفضل داودآبادی، الناز زارع میرزایی. **خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر و ماست سنتی شهرستان بابل و اثر ضدمیکروبی آن‌ها علیه سالمونلا اینتریتیدیس** *H7*. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۸؛ ۲۷ (۴): ۳۵-۱۴۲۶.

۱- کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی ،کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۲- استادیار، مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
۳- استادیار،گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۲۰۸۴۴۳۱۴، پست الکترونیکی: davoodabadi89@gmail.com، کد پستی :۴۷۳۶۱۴۱۷۱۶

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

مقدمه

سالمونلا یکی از عوامل اصلی در ایجاد عفونت‌های روده‌ای و اسهال‌های ناشی از طغیان‌های منتقله از غذا بوده که به‌دلیل ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، به یک چالش مهم در درمان این قبیل بیماری‌ها تبدیل شده است (۱). سویه‌های مختلف سالمونلا باعث بیماری‌هایی مانند انتریت، عفونت‌های سیستمیک و تب روده می‌گردند (۲). در تحقیق آشتیانی و همکارانش از مجموع نمونه‌های کشت مدفوع که از بیماران مبتلا به اسهال جمع‌آوری گردید ۲۸/۱۴٪ گونه‌های سالمونلا جدا شده بود (۳). در مطالعات متعدد، شیوع سالمونلاها از ۲/۷۴ درصد در آمریکا تا ۸/۳ درصد در ایران گزارش شده است. این باکتری به‌طور میانگین، سالانه ۲۵ میلیون عفونت و حدود ۲۰۰ هزار مرگ را در سطح جهان، موجب می‌شود (۱). از طرفی افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها باعث شده است که تحقیقات فراوانی در جهت معرفی روش‌های جایگزین برای مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا صورت پذیرد (۴).

امروزه پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌های عفونی و سرطانی شناخته شده‌اند (۵). پروبیوتیک‌ها، میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در مقادیر کافی مورد استفاده قرار گیرند برای سلامتی میزبان مفید خواهند بود. پروبیوتیک‌ها خصوصیات ویژه‌ای دارند که سبب شده مورد توجه قرار گیرند، از جمله این‌که این میکروارگانیسم‌ها غیربیماری‌زا هستند و عوارضی مشابه عوارض آنتی‌بیوتیک‌ها را ندارند (۶). پروبیوتیک‌ها به اسید معده مقاوم بوده و حتی در برابر صفرا قابلیت رشد دارند (۷). با مطالعاتی که امروزه در سراسر جهان و ایران در حال انجام است، می‌توان انتظار داشت که با جایگزینی پروبیوتیک‌ها، مکانسیم‌های مقاومت میکروب‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها کاهش یافته و یا نهایتاً از بین برود (۸). پروبیوتیک‌ها از مکانیسم‌های متعددی مانند تولید ترکیبات مهار کننده، تعدیل pH روده، پرکردن جایگاه‌های اتصال، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی نقش پیشگیری و درمان در بیماری‌های انسان را ایفا می‌کنند (۹). برای مثال در تحقیقی، *L. plantarum* اثر مهاری بر سالمونلا را نشان داده بود (۱۰). هم‌چنین در تحقیق دیگری سه گونه *L. rhamnosus* L519، *L. acidophilus* SH5 و *L. plantarum* A7 اثر ضدمیکروبی چشمگیری بر باکتری‌های پاتوژن *Salmonella*، *E. coli* و *Shigella* داشتند (۱۱).

با این تفاسیر ما نیز برآن شدیم تا برخی از خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از شیر و ماست سنتی را از طریق آزمایش‌های تحمل اسید، تحمل صفرا، بررسی همولیز بر روی بلادآگار و آنتی‌بیوگرام مورد مطالعه قرار دهیم. هم‌چنین خواص ضدمیکروبی آن‌ها را بر علیه *Salmonella enteritidis* H7 بررسی نموده و در صورت وجود اثر ضدمیکروبی و تایید خواص پروبیوتیکی گامی مثبت در زمینه پیشگیری از عفونت‌های سالمونلایی بصورت استفاده از لاکتوباسیلوس‌های مذکور در رژیم غذایی، داشته باشیم و یا شاید بتوان از عصاره مذکور در جهت درمان و مهار رشد سالمونلا بهره برد.

روش بررسی

جمع‌آوری نمونه‌ها

در این مطالعه که از نوع بنیادی- کاربردی می‌باشد ۵ سویه *L. paralimentarius* M4-3، *L. plantarum* M19-1، *L. paracasei* M18-1، *L. paracasei* Y8-1، *L.paracasei* Y1-3 و *L. fermentum* Y2-2 که در مطالعه قبلی گروه میکروب‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل از نمونه‌های ماست و شیر سنتی شهرستان بابل جدا شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲). بررسی خاصیت مهاری لاکتوباسیلوس‌ها علیه سالمونلااینتریتیدیس ***H7*** جهت بررسی فعالیت ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس بر علیه *Salmonella enteritidis* H7 از روش انتشار از چاهک استفاده شد (۱۳). ابتدا *Salmonella enteritidis* بر سطح محیط نوترینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شده و یک سوسپانسیون با غلظت برابر 10^7 CFU/mL از آن در سرم فیزیولوژی استریل تهیه شد. سپس پلیت‌های نوترینت آگار تهیه شد و در داخل آگار آن‌ها چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر به کمک پیپت پاستور استریل ایجاد گردید.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

در نهایت باکتری پاتوژن بر روی سطح محیط نوترینت آگار به کمک سوآپ استریل، کشت چمنی داده شد. سپس محیط کشت مایع MRS براث سویه‌های لاکتوباسیلوس که به‌مدت ۲۴ ساعت در داخل جار شمع‌دار و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد کرده بودند، سانتریفیوژ شد (۱۳۰۰۰ RPM، ۱۰ دقیقه) و مایع روی آن‌ها جمع‌آوری و فیلتر شد. صد میکرولیتر از مایع رویی به هر چاهک پلیت نوترینت آگار اضافه شد و پلیت‌ها به‌مدت ۱۴ تا ۱۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از زمان انکوباسیون قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها اندازه گرفته شد. ایزوله‌های با قطر هاله عدم رشد کمتر از ۱۱mm به‌عنوان منفی، ۱۱-۱۶ mm به‌عنوان مهارکننده متوسط (+)، ۱۷-۲۲ mm به‌عنوان مهارکننده قوی (++) و بیشتر از ۲۳ mm به‌عنوان مهارکننده خیلی قوی (+++) تقسیم‌بندی شدند. از سویه *Lactobacillus Rhamnosus* GG به‌عنوان کنترل مثبت و از محیط MRS براث استریل به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (۱۴). جهت بررسی دقیق‌تر اثر ضدمیکروبی pH مایع رویی کشت (حاصل از سانتریفیوژ) سویه‌های لاکتوباسیلوس را به ۶/۵ رسانده (توسط NaOH ۵ نرمال) و دوباره اثر ضدمیکروبی آن‌ها بررسی شد.

تست آنتی‌بیوگرام

از ایزوله‌های لاکتوباسیلوس به کمک سرم فیزیولوژی استریل، کدورت نیم مک فارلند تهیه شد سپس توسط سواپ استریل بر روی پلیت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) حاوی ۱۰٪ MRS آگار کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپی‌سیلین (۳۷ µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، کلیندامایسین (۱۰µg)، اریترومایسین (۱۵ µg)، پنی‌سیلین (۱۰µg)، استرپتومایسین (۱۰ µg)، تتراسیکلین (۳۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg) و ونکومایسین (۳۰ µg) (ROSCO, Germany) بر روی سطح محیط قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در جار شمع‌دار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله مهاری دیسک‌ها اندازه گرفته شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده ایزوله‌ها به‌صورت مقاوم (≤ ۱۵ میلی‌متر)، حساسیت متوسط (۲۰-۱۶ میلی‌متر) و حساس (≤ ۲۱ میلی‌متر) گزارش شدند (۱۵).

تست مقاومت به اسید

برای بررسی مقاومت ایزوله‌های لاکتوباسیلوس به شرایط اسیدی ابتدا ایزوله‌ها در محیط MRS Broth (مرک، آلمان) کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در جار شمع‌دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس غلظت باکتری‌های موجود در این محیط کشت، حدود 10^9CFU/ml تنظیم شد و یک میلی‌لیتر از این محیط کشت که حاوی حدود 10^9CFU/ml باکتری بود به ۹ میلی‌لیتر PBS (phosphate-buffered saline) دارای pH برابر ۲.۵، اضافه شد. جهت تنظیم pH نیز از ۰/۱HCL نرمال (مرک، آلمان) استفاده گردید. در زمان صفر (کنترل) و پس از زمان‌های ۰/۵، ۱، ۲ و ۳ ساعت ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط‌ها را برداشته جهت شمارش تعداد باکتری‌های موجود (CFU) در PBS، با استفاده از روش رقت‌سازی کشت بر روی MRS آگار تهیه شد و پلیت‌های کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در جار شمع‌دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از زمان انکوباسیون، مقاومت به اسید از طریق شمارش باکتری‌های زنده مانده بر روی پلیت MRS آگار سنجیده شد. ایزوله‌هایی از لاکتوباسیلوس که در pH ۲/۵ زنده مانده و تعداد کلنی شمارش شده آن‌ها کمتر از 10^6CFU/ml نباشد، به‌عنوان مقاوم به اسید در نظر گرفته می‌شوند (۱۶).

تست تحمل صفرا

جهت انجام این تست از روش Gilliland and Walker استفاده شد (۱۷). برای هر ایزوله دو لوله، یکی حاوی ۹ میلی لیتر MRS Broth دارای ۰/۳ درصد (W/V) نمک صفراوی Oxgall (سیگما - آلدریچ، آلمان) و دیگری حاوی ۹ میلی‌لیتر MRS Broth بدون oxgall (کنترل) در نظر گرفته شد. به هر دو لوله مقدار ۱٪ (۹۰ میکرولیتر) از کشت تازه ایزوله لاکتوباسیلوس به هر لوله MRS broth، اضافه شد و لوله‌ها در جار شمع‌دار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان رشد ایزوله‌ها در زمان ۰ و ۸ و ۲۴ ساعت توسط اسپکروفتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گرفته شد (۱۸). میزان مهار رشد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

باکتری‌ها توسط نمک صفراوی بوسیله فرمول ضریب مهار (Cinh) ارائه شده توسط Gopal و دیگران محاسبه گردید (۱۹).

$$C_{inh} = \frac{(\Delta T_8 - T_0 \text{Control} - \Delta T_8 - T_0 \text{Treatment})}{\Delta T_8 - T_0 \text{Control}}$$

- **Cinh**: ضریب بازدارندگی
- **T_0 Treatment:** جذب نوری در محیط کشت حاوی نمک صفراوی، قبل از انکوبه شدن
- **T_0 Control**: جذب نوری در محیط کشت بدون نمک صفراوی، قبل از انکوبه شدن
- **T_8 Treatment** جذب نوری در محیط کشت حاوی نمک صفراوی، پس از ۸ ساعت انکوبه شدن
- **T8 Control**: جذب نوری در محیط کشت بدون نمک صفراوی، پس از ۸ ساعت انکوبه شدن

بر اساس ضریب مهار (Cinh) محاسبه شده ایزوله‌ها به سه گروه تقسیم می‌شوند (۱۹).

۱.ایزوله‌های غیرحساس (مقاوم) به نمک صفراوی: ($Cinh \approx ۰/۰$).

۲.ایزوله‌هایی که کاهش رشد دارند ($۰/۲ < Cinh < ۰/۴$).

۳.ایزوله‌هایی که مقاومت خیلی کمی دارند ($Cinh > ۰/۴$).

ایزوله‌هایی که در گروه یک و دو قرار گرفتند و دارای ضریب بازدارندگی (C_{inh}) کمتر از ۰/۴ بودند، به عنوان ایزوله‌های مقاوم به نمک صفراوی در نظر گرفته شدند (استاندارد پروبیوتیک‌های ایران: شماره ۲۳۲۵).

بررسی همولیز

جهت بررسی همولیز سویه‌های لاکتوباسیلوس بر روی محیط بلاد آگار حاوی خون گوسفندی کشت داده شده و پس از ۴۸ ساعت، از نظر ایجاد همولیز بتا بررسی شدند.

ملاحظات اخلاقی

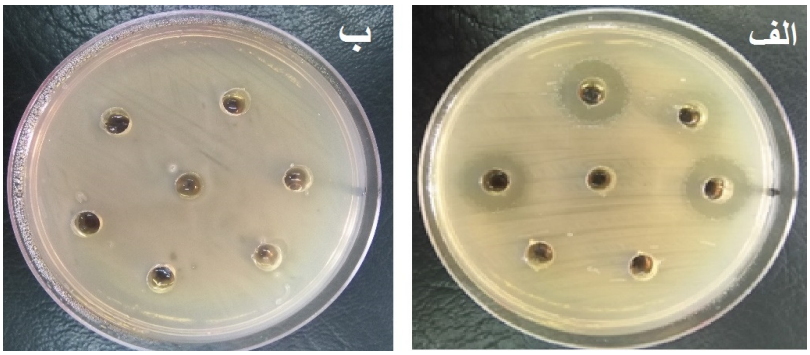
این طرح توسط کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل تصویب شده است

(کد اخلاق: MUBABOL.HRI.REC.1396.16).

نتایج

تست مهاری

از بین پنج سویه لاکتوباسیلوس مورد بررسی ۴ سویه شامل *L. plantarum* M19-1، *L. paracasei* M18-1، *L .paracasei* Y1-3 و *L. fermentum* Y2-2 اثر مهاری متوسط (قطر هاله عدم رشد ۱۱ -۱۶ mm) برعلیه *Salmonella enteritidis* H7 داشتند اما سویه *L. paracasei* Y8-1 اثر مهاری برعلیه این پاتوژن نداشت. معولاً اثر ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس به خاطر تولید اسیدهای می‌باشد. اسیدهای آلی باعث کاهش pH شده و مانع رشد باکتری‌های بیماری‌زا می‌شوند. البته اثر ضدمیکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس می‌تواند به‌خاطر تولید باکتریوسین‌ها و یا H_2O_2 نیز باشد. هیچ‌یک از سویه‌ها بعد از خنثی نمودن مایع روی آن‌ها اثر ضدمیکروبی برعلیه *Salmonella enteritidis* H7 از خود نشان ندادند (شکل ۱).



شکل ۱: اثر مهاری سویه‌های لاکتوباسیلوس برعلیه سالمونلا انتریتیدیس H7. الف) اثر مهاری قبل از خنثی نمودن pH مایع رویی سویه‌های لاکتوباسیلوس. ب) اثر مهاری بعد از خنثی نمودن pH مایع رویی سویه‌های لاکتوباسیلوس

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

پنج ایزوله شناسایی شده از نظر مقاومت به ۹ آنتی‌بیوتیک مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج به‌دست آمده تمام ایزوله‌ها نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم و نسبت به تتراسایکلین حساس، تمامی ایزوله‌ها به‌جز *L. paracasei* Y8-1 و *L. plantarum* M19-1 به اریترومایسین حساس بودند هم‌چنین تمام ایزوله‌ها به‌جز *L. paracasei* Y8-1 به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و کلرامفنیکل حساس بودند. ایزوله *L. plantarum* M19-1 به جنتامایسین حساس، *L.paracasei* Y1-3 حساسیت متوسط و بقیه ایزوله‌ها به آن مقاوم بودند. ایزوله *L. paracasei* Y8-1 نسبت به کلیندامایسین مقاوم، *L. plantarum* M19-1 حساسیت متوسط و بقیه ایزوله‌ها به آن حساس بودند. لازم به‌ذکر است که ایزوله *L. paracasei* Y8-1 نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به‌جز تتراسایکلین مقاوم بود (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج تست آنتی بیوگرام

نام سویه	نام آنتی‌بیوتیک	نتیجه (mm)	تفسیر	نام سویه	نام آنتی‌بیوتیک	نتیجه (mm)	تفسیر	نام سویه	نام آنتی‌بیوتیک	نتیجه (mm)	تفسیر
	Van30	۰	R		Van30	۰	R		Van30	۰	R
	CLI10	۴۲	S		CLI10	۰	R		CLI10	۱۶	I
	GEN10	۱۶	I		GEN10	۰	R		GEN10	۲۸	S
	CLR30	۳۶	S		CLR30	۱۵	R	۱-۱۹	CLR30	۲۸	S
۳-۱	PEN10	۳۵	S	۱-۸	PEN10	۰	R		PEN10	۲۳	S
	STR10	۰	R		STR10	۰	R		STR10	۱۲	R
	ERY15	۳۸	S		ERY15	۰	R		ERY15	۱۵	R
	TET30	۴۰	S		TET30	۳۰	S		TET30	۲۱	S
	AMP37	۳۷	S		AMP37	۱۵	R		AMP37	۳۸	S
	Van30	۰	R		Van30	۰	R				
	CLI10	۴۲	S		CLI10	۳۳	S				
	GEN10	۱۴	R		GEN10	۱۴	R				
	CLR30	۲۸	S		CLR30	۳۳	S				
۲-۲	PEN10	۳۰	S	۱-۱۸	PEN10	۳۰	S				
	STR10	۱۱	R		STR10	۰	R				
	ERY15	۳۰	S		ERY15	۴۰	S				
	TET30	۲۶	S		TET30	۴۰	S				
	AMP37	۴۰	S		AMP37	۳۶	S				

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

تست تحمل به اسید و صفرا

از بین ۵ سویه مورد بررسی، سویه *L. paracasei* M18-1 تحمل خوبی نسبت به شرایط اسیدی داشت و بعد از گذشت ۳ ساعت از مواجه با شرایط اسیدی همچنان زنده باقی ماند. بعد از گذشت یک ساعت تعداد باکتری‌های زنده قابل شماره این سویه همچنان بالای CFU 10^6 بود و بعد از این زمان تعداد باکتری‌ها کاهش و بعد از گذشت سه ساعت به تعداد CFU $1/2\times10^4$ رسید(جدول ۲). سویه *L. paracasei* Y8-1 نیز اگرچه با گذشت ۲/۵ ساعت از مواجه با شرایط اسیدی زنده باقی مانده بود، ولی در نیم ساعت ابتدای تست تعداد باکتری‌های قابل شمارش آن کمتر از بود CFU 10^6 (CFU $3/8\times10^5$). سایر سویه‌ها شامل *L. fermentum* Y2-2، *L. plantarum* M19-1 و *L.paracasei* Y1-3 تحمل خوبی نسبت به شرایط اسیدی نداشتند و تعداد قابل شمارش آن‌ها به ترتیب بعد از گذشت دو، یک و یک ساعت از مواجه با شرایط اسیدی به صفر رسید.

جدول ۲. نتایج آزمایش تحمل اسید

شماره سویه	زمان (ساعت)	تعداد باکتری	شماره سویه	زمان (ساعت)	تعداد باکتری	شماره سویه	زمان (ساعت)	تعداد باکتری
۱۸-۱	۰/۵	$1/7\times10^6$	۱۹-۱	۰/۵	$2/7\times10^7$	۳-۱	۰/۵	$8/3\times10^5$
	۱	$1/07\times10^6$		۱	1×10^4		۱	$2/2\times10^3$
	۲	$5/3\times10^5$		۲	۰		۲	۰
	۲/۵	$4/9\times10^4$		۲/۵	۰		۲/۵	۰
	۳	$1/2\times10^4$		۳	۰		۳	۰
۸-۱	۰/۵	$3/8\times10^5$	۲-۲	۰/۵	$4/5\times10^6$			
	۱	1×10^4		۱	$1/7\times10^5$			
	۲	5×10^4		۲	$3/6\times10^2$			
	۲/۵	9×10^2		۲/۵	۰			
	۳	۰		۳	۰			

در تست تحمل به صفرا، تنها سویه *L. plantarum* M19-1 دارای ضریب مهار رشد (C_{inh}) برابر ۰/۲۷ بود که کمتر از ۰/۴ می‌باشد و به‌عنوان مقاوم به صفرا در نظر گرفته شد، اما سایر سویه‌ها ضریب مهار رشد بالای ۰/۴ داشتند و نسبت به صفرا حساس بودند.

تست همولیز

در تست بررسی همولیز، هیچ‌یک از سویه‌ها بر روی محیط بلاد آگار همولیز ایجاد نکردند.

بحث

نتایج این مطالعه نشان داد که سویه های لاکتوباسیلوس جدا شده از شیر و ماست سنتی می‌توانند دارای اثر ضدمیکروبی برعلیه باکتری‌های عامل اسهال مانند *Salmonella enteritidis H7* باشند که ۴ سویه شامل *L. plantarum* M19-1، *L. paracasei* M18-1، *L.paracasei Y1-3* و *L. fermentum Y2-2* اثر مهاری متوسط (قطر هاله عدم رشد mm ۱۶- ۱۱) برعلیه *Salmonella enteritidis H7* داشتند. در مطالعات دیگر نیز نتایج مشابه مشاهده شده است مانند تحقیق ارشادیان و همکاران در سال ۹۴ در شهر سبزوار که لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی جدا شده از ماست این شهرستان را بررسی نمودند و مشخص شد که *L. casei* و *L. plantarum* بیشترین اثر مهاری را بر باکتری‌های بیماری‌زای *Pseudomonas aeruginosa* ، *E. coli* و *Staphylococcus aureus* دارند (۶). استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک باعث تغییر فلور روده و غالب شدن باکتری‌های فرصت‌طلب شود (۲۰).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

مقاومت آنتی‌بیوتیکی در سویه‌های پروبیوتیکی می‌تواند جلو این امر را بگیرد (۲۱). لازم به‌ذکر است که مقاومت‌های مناسب در پروبیوتیک‌ها باید کروموزومی باشند تا قابلیت انتقال نیز نداشته باشند (۲۲). در این مطالعه همانند مطالعه‌های مشابه تمام ایزوله‌ها نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم بودند. از آن‌جا که منشا این مقاومت‌ها کروموزومی می‌باشد نگرانی در مورد انتقال ژن آن‌ها به سایر باکتری‌ها وجود ندارد (۲۲). یکی از ویژگی‌های سویه‌های پروبیوتیک نداشتن توکسین‌هایی مانند همولیزین است. در این مطالعه هیچ‌یک از سویه‌های مورد بررسی دارای ویژگی همولیز نبودند.

بعضی از این سویه‌ها دارای ویژگی‌های پروبیوتیکی مانند مقاومت به شرایط اسیدی و صفرا هستند. سویه *L. paracasei* M18-1 از این بین بهترین تحمل را نسبت به شرایط اسیدی داشت و بعد از گذشت ۳ ساعت از مواجه با شرایط اسیدی هم‌چنان زنده باقی ماند. از بین این سویه‌ها تنها سویه *L. plantarum* M19-1 دارای ضریب مهار رشد (C_{inh}) برابر ۰/۲۷ بود که کمتر از ۰/۴ می‌باشد و به‌عنوان مقاوم به صفرا در نظر گرفته شد. داودآبادی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ مطالعه ای بر روی سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس انجام دادند که تعدادی از سویه‌ها به شرایط اسیدی و صفرا مقاومت نشان دادند (۲۳). مژگانی و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ از محصولات لبنی سنتی آذربایجان سویه‌های *Lactobacillus brevis* و *Lactobacillus pentosus* را جدا نمودند که به اسید و بایل مقاوم بوده و هم‌چنین از رشد *Listeria monocytogenes* ، *Staphylococcus aureus*، *Shigella dysenteriae*، *Salmonella enteritidis* و *Streptococcus pneumoniae* جلوگیری کردند و این دو سویه به ترتیب ۸۶٪ و ۶۹٪ خاصیت کاهش کلسترول داشتند (۲۴).

تاج آبادی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از پنیر و ماست سویه‌های *L. plantarum*، *Lactobacillus brevis* و *L.casei* را جدا نمودند که هر سه دارای خاصیت جذب کلسترول بالا و خاصیت مهاری بودند (۲۵). برخی دانشمندان بر این باورند که فلور طبیعی بدن هر جمعیت به طور چشمگیری با شرایط روده افراد آن جمعیت سازگار شده‌اند و این امر به‌علت تفاوت در عادات غذایی می‌باشد حال اگر یک پروبیوتیک خارجی وارد بدن شخص شود با واکنش شدید فلور آن فرد مواجه می‌شود به همین علت استفاده از پروبیوتیک‌های بومی ضرورت خواهد یافت (۲۶).

نتیجه گیری

با توجه به فواید بی‌شمار پروبیوتیک‌ها و استقبال روزافزون از این باکتری‌های سودمند، امروزه جداسازی سویه‌های جدید با خواص پروبیوتیکی بهتر مورد توجه می‌باشد. این مطالعه نشان داد که سویه‌های Y1-3 بیشترین اثر مهاری، M18-1 بیشترین مقاومت به اسید و M19-1 بیشترین مقاومت به بایل را داشته‌اند و هیچ‌کدام از سویه‌ها همولیز نیز نداشته‌اند. در نتیجه سویه‌های لاکتوباسیلوس با اثر مهاری خوب بر علیه سالمونلااینتریتیدیس از شیر و ماست سنتی قابل جداسازی هستند که می‌توانند به‌عنوان کاندید پروبیوتیک جهت پیشگیری و درمان عفونت این باکتری استفاده شوند، البته مطالعات بیشتری در این زمینه موردنیاز می‌باشد.

سپاس‌گزاری

این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی می‌باشد که مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل حامی مالی آن می‌باشد (۹۶۰۳۳۱۴). از کلیه افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری داشتند تشکرمی‌شود.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

References:

1- Mohammad Mehdi SoltanDallal, Samaneh Motalebi, HosseinMasoomiAsl, Abbas Rahimi Foroushani, Mohammad Kazem SharifiYazdi, Nooshin Aghili. ***Investigation Of The Frequency Of Salmonella Spp. In Foodborne Disease Outbreaks In Iran And Determination Of Their Antibiotic Resistance.*** Pajoohandeh J 2015; 19 (6): 341-7. [Persian]

2- Ashrafganjooyi SB, Saedadeli N, Rafehzadehshahi H. ***Isolation Of Salmonella Spp. And Drug Resistance To Tetracycline, Ampicillin And Cotrimoxazole In Kerman***. Iranian J Med Microbiol 2014; 8(2): 48-50. [Persian]

3- Ashtiani MT, Monajemzadeh M, Kashi L. ***Trends In Antimicrobial Resistance Of Fecal Shigella And Salmonella Isolates In Tehran, Iran.*** Indian J PatholMicrobiol 2009; 52 (1): 52-5. [Persian]

4- Golestani B, Jafari A, karimi f. ***An Investigation Of The Effect Of Copper Nanoparticles On Salmonella Tifimorum Genome By RAPD Molecular Markers***. JMBS 2016; 7(2): 80-90. [Persian]

5- Bonyadi F, Tukmechi A, Mohebalian H. ***An Overview Of Probiotics And Their Role In Cancer Management.*** J mazand Uni Med Sci 2014; 24(112): 128-0. [Persian]

6- Ershadian M, ArbabSoleimani N, Ajodani Far H, VaeziKhakhki MR. ***The Co-Aggregation Effects Of Probiotic Lactobacillus Against Some Pathogenic Bacteria***. Iran J MedMicrobiol 2015; 9(3): 14-22. [Persian]

7- Mosafa N. ***Probiotics, A New Generation Of Live Medicines In Medical Research.*** Shahid Beheshti Uni Medical Sci 2008. [Persian]

8- Kasra-Kermanshahi R, Rezai P. ***Probiotics And Prebiotics In Medicine And Dentistry***. Iranian J Medical Microbiology 2015; 9(3): 1-13. [Persian]

9- Vojdani R, Zali M. ***Probiotics And Their Mechanism Of Action In The Prevention And Treatment Of Human Diseases***. Pejouheshdar Pezeshki 2003; 27(4): 319-30. [Persian]

10- Hirano S, Yokota Y, Eda M, Kuda T, Shikano A, Takahashi H, et al. ***Effect Of Lactobacillus Plantarum Tennozu-SU2 On Salmonella Typhimurium Infection In Human Enterocyte-Like HT-29-Luc Cells And BALB/C Mice.*** Probiotics Antimicrobial Proteins 2017; 9 (1): 64-70.

11- Fazeli H, Sameti A. ***Antimicrobial Effect Of Lactic Probiotics Isolated From Intestinal Flora Of Children In Isfahan Against Common Pathogens Of The Digestive System***. Iranian J Infectious Diseases and Tropical 2008; 13(42): 25-9. [Persian]

12- ZareMirzaei E, Lashani E, Davoodabadi A. ***Antimicrobial Properties Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Traditional Yogurt And Milk Against Shigella Strains***. GMS Hyg Infect Control 2018; 13: Doc01.

13- Rammelsberg M, Radler F. ***Antibacterial Polypeptides Of Lactobacillusspecies***. J Applied Bacteriology 1990; 69(2): 177-84.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

14- Pan X, Chen F, Wu T, Tang H, Zhao Z. **The Acid, Bile Tolerance And Antimicrobial Property Of *Lactobacillus Acidophilus*.** Food Control 2009; 20(6): 598-602.

15- Hashemi SM, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Eshaghi Z. ***Potentially Probiotic Lactobacillus Strains From Traditional Kurdish Cheese.*** Probiotics Antimicrobial Proteins 2014; 6(1): 22-31.

16- Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM. ***Three Lactobacillus Strains From Healthy Infant Stool Inhibit Enterotoxigenic Escherichia Coli Grown In Vitro***. Anaerobe 2008: 14(2): 61-7.

17- Gilliland SE, Walker DK. ***Factors To Consider When Selecting A Culture Of Lactobacillus Acidophilus As A Dietary Adjunct To Produce A Hypocholesterolemic Effect In Humans***. J Dairy Sci 1990; 73(4): 905-11.

18- Belviso S, Giordano M, Dolci P, Zeppa G. ***In Vitro Cholesterol-Lowering Activity Of Lactobacillus Plantarum And Lactobacillus Paracasei Strains Isolated From The Italian Castelmagno PDO Cheese.*** Dairy SciTechnology 2009; 89(2):169-76.

19- Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. ***In Vitro Adherence Properties Of Lactobacillus Rhamnosus DR20 And Bifidobacteriumlactis DR10 Strains And Their Antagonistic Activity Against An Enterotoxigenic Escherichia Coli***. Int J Food Microbiol 2001;67(3): 207-16.

20- Bacha K, Mehari T, Ashenafi M. ***In-Vitro Probiotic Potential Of Lactic Acid Bacteria Isolated From Wakalim, A Traditional Ethiopian Fermented Beef Sausage***. Ethiopian J Health Sci 2009; 19(1): 21-9.

21- Willing BP, Russell SL, Finlay BB. ***Shifting The Balance: Antibiotic Effects On Host-Microbiota Mutualism***. Nat Rev Microbiol 2011; 9(4): 233-43.

22- de LeBlanc Ade M, Castillo NA, Perdigon G. ***Anti-Infective Mechanisms Induced By A Probiotic Lactobacillus Strain Against Salmonella Enterica Serovar Typhimurium Infection***. Int J Food Microbiol 2010; 138(3): 223-31.

23- DavoodabadiA, SoltanDallal MM, Rahimi Foroushani A, Douraghi M, SharifiYazdi Mk, Amin Harati F. ***Antibacterial Activity Of Lactobacillus Spp. Isolated From The Feces Of Healthy Infants Against Enteropathogenic Bacteria***. Jundishapur J Microbiol 2015; 8(12): e27852.

24- Mojgani N, Hussaini F, Vaseji N. ***Characterization Of Indigenous Lactobacillus Strains For Probiotic Properties.*** JundishapurJ Microbial 2015; 8(2): e17523. [Persian]

25- Ebrahimi M, Ouwehand A, Hejazi M, Jafari P. ***Traditional Iranian Dairy Products: A Source Of Potential Probiotic Lactobacilli.*** African J Microbiol Res 2011; 5(1): 20-7.

26- RaazMaheshwari BR, Verma D, Yadav RK. ***Indigenous Probiotics & Health Benefits***. Bull Env Pharmacol Life Sci 2012; 2: 83-6.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]

Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol 27| NO 4 | July 2019

Received: 11 Jun 2018
Accepted: 29 Sep 2018

Probiotic properties of lactobacillus isolated from traditional milk and yoghurt of Babol and their antimicrobial effects against *Salmonella enteritidis H7*

Hossein Soltanmoradi[1], Abolfazl Davoodabadi [*2,3], Elnaze Zare Mirzaei[1]

Original Article

Introdution: Today, probiotics are known to be effective in preventing the spread of many infectious diseases. Probiotic are living microorganisms that will be beneficial for the health of the host when used in adequate amounts. The purpose of this study was to investigate the probiotic properties of *Lactobacillus* isolated from traditional milk and yogurt.

Methods: Probiotic properties of five *Lactobacillus* strains isolated from traditional milk and yoghurt of Babol including *L. plantarum* M19-1, *L. paralimentarius* M4-3, *L. paracasei* M18-1, *L. paracasei* Y8-1, *L.paracasei* Y1-3 and *L. fermentum* Y2-2 were studied. The inhibitory effect of these strains against *Salmonella enteritidis* H7 was measured. These strains also investigated for antibiotic susceptibility, resistance to acidic conditions, resistance to bile salts, and hemolysis.

Results: The highest inhibitory effect was observed by Y1-3 strain with a mean diameter of 14 mm. In acid tolerance test at pH 2.5, M18-1 strain had the highest resistance, which its colonies were countable after three hours. Strains M19-1 showed the highest resistance to bile (MRS broth contains 0.3% bile) with Cinh 0.26. None of the strains had hemolysis activity.

Conclusion: *Lactobacillus* strains with good inhibitory effects against *Salmonella enteritidis* could be isolated from milk and yogurt, which can be used as a probiotic candidate for the prevention or treatment of this bacterial infection, but further studies are needed.

Keywords: *Lactobacillus*, Probiotic, *Salmonella enteritidis*, Antimicrobial

Citation: soltanmoradi H, Davoodabadi A, Zare Mirzaei E. **Probiotic properties of lactobacillus isolated from traditional milk and yoghurt of Babol and their antimicrobial effects against *Salmonella enteritidis H7*.** J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2019; 27(4): 1426-35.

[1]Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.
[2]Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
[3]Department of Microbiology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran
***Corresponding author: Tel:** 01132199592-6, **email:** davoodabadi89@gmail.com

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-12-23]

[DOI: 10.18502/ssu.v27i4.1353]