

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

حسین سلطانمرادی^۱، ابوالفضل داودآبادی^{۲,*}، الناز زارع میرزا^۱

مقاله پژوهشی

مقدمه: امروزه پروبیوتیک‌ها به عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلاء به بیماری‌های عفونی شناخته شده‌اند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زندگی‌داری هستند که وقتی در مقدار مناسب استفاده شوند، برای سلامتی میزبان مفید خواهند بود. هدف این مطالعه بررسی خواص پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده 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.paracasei* M1-1 *L.paracasei* Y8-1 *L.paracasei* M18-1 *L.paralimentarius* M4-3 *L.plantarum* M19-3 *L. fermentum* 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 صفراء 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 بود که پس از سه ساعت کلنی‌هایش قابل شمارش بود. سویه M19-1 با C_{inh} ۰/۲۶، سویه ۰/۲۶ بیشترین مقاومت را به صفت MRS (براث حاوی ۳٪ صفر) 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 به عنوان کاندید پروبیوتیک جهت پیشگیری و درمان عفونت این باکتری استفاده شوند، البته مطالعات بیشتری در این زمینه موردنیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک‌ها، سالمونلا اینتریتیدیس، ضدمیکروبی

ارجاع: حسین سلطانمرادی، ابوالفضل داودآبادی، الناز زارع میرزا^۱. 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 صدوqi بزد ۱۳۹۸؛ ۲۷(۴): ۳۵-۴۲۶.

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

مهاری بر سالمونلا را نشان داده بود (۱۰). همچنین در تحقیق دیگری سه گونه L. acidophilus SH5 L. rhamnosus L519 و L. plantarum A7 اثر ضد میکروبی چشمگیری بر باکتری های *L. plantarum* و *E. coli* و *Shigella Salmonella* داشتند (۱۱).

با این تفاسیر ما نیز برآن شدیم تا برخی از خواص پروپیوتیکی لاکتوباسیلوس های جدا شده از شیر و ماست سنتی را از طریق آزمایش های تحمل اسید، تحمل صفراء، بررسی همولیز بر روی بلاد آگار و آنتی بیوگرام مورد مطالعه قرار دهیم. همچنین خواص ضد میکروبی آن ها را بر علیه *Salmonella enteritidis* H7 بررسی نموده و در صورت وجود اثر ضد میکروبی و تایید خواص پروپیوتیکی گامی مثبت در زمینه پیشگیری از عفونت های سالمونلایی بصورت استفاده از لاکتوباسیلوس های مذکور در رژیم غذایی، داشته باشیم و یا شاید بتوان از عصاره مذکور در جهت درمان و مهار رشد سالمونلا بهره برد.

روش بررسی

جمع آوری نمونه ها

در این مطالعه که از نوع بنیادی - کاربردی می باشد ۵ سویه *L. paralimentarius* M4-3 *L. plantarum* M19-1 *L. paracasei* Y1-3 *L. paracasei* Y8-1 *L. paracasei* M18-1 و *L. fermentum* Y2-2 که در مطالعه قبلی گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی بابل از نمونه های ماست و شیر سنتی شهرستان بابل جدا شده بودند، مورد بررسی قرار گرفتند (۱۲). بررسی خاصیت مهاری لاکتوباسیلوس ها علیه سالمونلاینتریتیدیس *H7* جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه های لاکتوباسیلوس بر علیه *Salmonella enteritidis* H7 ابتدا از روش انتشار از چاهک استفاده شد (۱۳). ابتدا *Salmonella enteritidis* بر سطح محیط نوتربینت آگار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شده و یک سوسپانسیون با غلظت برابر 10^7 CFU/mL از آن در سرم فیزیولوژی استریل تهیی شد. سپس پلیت های نوتربینت آگار تهیی شد و در داخل آگار آن ها چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر به کمک پیپت پاستور استریل ایجاد گردید.

مقدمه

سالمونلا یکی از عوامل اصلی در ایجاد عفونت های روده ای و اسهال های ناشی از طغیان های منتقله از غذا بوده که به دلیل ایجاد مقاومت های آنتی بیوتیکی، به یک چالش مهم در درمان این قبیل بیماری ها تبدیل شده است (۱). سویه های مختلف سالمونلا باعث بیماری هایی مانند انتریت، عفونت های سیستمیک و تب روده می گردند (۲). در تحقیق آشتیانی و همکارانش از مجموع نمونه های کشت مدفوع که از بیماران مبتلا به اسهال جمع آوری گردید ۲۸/۱۴٪ گونه های سالمونلا جدا شده بود (۳). در مطالعات متعدد، شیوع سالمونلها از ۲/۷۴ درصد در آمریکا تا ۸/۳ درصد در ایران گزارش شده است. این باکتری به طور میانگین، سالانه ۲۵ میلیون عفونت و حدود ۲۰۰ هزار مرگ را در سطح جهان، موجب می شود (۱). از طرفی افزایش مقاومت آنتی بیوتیکی در باکتری ها باعث شده است که تحقیقات فراوانی در جهت معرفی روش های جایگزین برای مقابله با باکتری های بیماری زا صورت پذیرد (۴).

امروزه پروپیوتیک ها به عنوان عاملی برای پیشگیری از ابتلاء به بسیاری از بیماری های عفونی و سرطانی شناخته شده اند (۵). پروپیوتیک ها، میکرووار گانیسم های زنده ای هستند که وقتی در مقادیر کافی مورد استفاده قرار گیرند برای سلامتی میزان مفید خواهند بود. پروپیوتیک ها خصوصیات ویژه ای دارند که سبب شده مورد توجه قرار گیرند، از جمله این که این میکرووار گانیسم های غیر بیماری زا هستند و عوارض مشابه عوارض آنتی بیوتیک ها را ندارند (۶). پروپیوتیک ها به اسید معده مقاوم بوده و حتی در برابر صفر اقبالیت رشد دارند (۷). با مطالعاتی که امروزه در سراسر جهان و ایران در حال انجام است، می توان انتظار داشت که با جایگزینی پروپیوتیک ها، مکانسیم های مقاومت میکروب ها به آنتی بیوتیک ها کاهش یافته و یا نهایتاً از بین برود (۸). پروپیوتیک ها از مکانسیم های متعددی مانند تولید ترکیبات مهار کننده، تعديل pH روده، پرکردن جایگاه های اتصال، رقابت برای جذب مواد غذایی و تقویت سیستم ایمنی نقش پیشگیری و درمان در بیماری های انسان را ایفا می کنند (۹). برای مثال در تحقیقی، *L. plantarum* اثر

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 شمع دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس غلظت باکتری‌های موجود در این محیط کشت، حدود 10^9 CFU/ml تنظیم شد و یک میلی‌لیتر از این محیط کشت که حاوی حدود phosphate- 10^9 CFU/ml باکتری بود به ۹ میلی‌لیتر PBS (buffered saline) دارای pH برابر ۲.۵، اضافه شد. جهت تنظیم pH نیز از ۱۰٪ HCL (مرک، آلمان) استفاده گردید. در زمان صفر (کنترل) و پس از زمان‌های ۰/۵، ۰/۱، ۰/۳ و ۰/۶ 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 ۳۷ کشت شده به مدت ۴۸ ساعت در جار شمع دار و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. بعد از زمان انکوباسیون، مقاومت به اسید از طریق شمارش باکتری‌های زنده مانده بر روی پلیت آگار سنجیده شد. ایزوله‌هایی از لاکتوباسیلوس که در ۰/۵ pH زنده مانده و تعداد کلی شمارش شده آن‌ها کمتر از 10^9 CFU/ml نباشد، به عنوان 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 میلی‌لیتر MRS Broth دارای ۰/۳ درصد (W/V) نمک صفرایی Oxgall (سیگما - 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 شمع دار در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. میزان رشد ایزوله‌ها در زمان ۰ و ۸ و ۲۴ ساعت توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه گرفته شد (۱۸). میزان مهار رشد

در نهایت باکتری پاتوژن بر روی سطح محیط نوترینت آگار به کمک سواپ استریل، کشت چمنی داده شد. سپس محیط کشت مایع MRS براث سویه‌های لاکتوباسیلوس که به مدت ۲۴ ساعت در داخل جار شمع دار و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد رشد کرده بودند، سانتریفیوژ شد (RPM ۱۳۰۰۰، 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 به مدت 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 به عنوان منفی، ۱۶-۱۱ mm به عنوان مهارکننده متوسط (+)، ۲۲-۱۷ mm به عنوان مهارکننده قوی (++) و بیشتر از ۲۳ mm به عنوان مهارکننده خیلی قوی (+++) تقسیم‌بندی شدند. از سویه Lactobacillus Rhamnosus GG به عنوان کنترل مثبت و از محیط MRS براث استریل به عنوان 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 ۵ NaOH 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 (Merck, Germany) استریل بر روی پلیت مولر هینتون آگار (Merck, Germany) حاوی ۱٪ MRS آگار کشت داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی آمپیسیلین (μg ۳۷)، کلرامفنیکل (μg ۳۰)، کلیندامایسین (μg ۱۰)، اریترومایسین (μg ۱۵)، پنی‌سیلین (μg ۱۰)، استرپتومایسین (μg ۱۰)، تتراسیکلین (μg ۳۰)، ROSCO, (۰-۳۰ μg) جنتامایسین (μg ۱۰) و ونکومایسین (μg ۱۰) بر روی سطح محیط قرار داده شدند و پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در جار شمع دار و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس قطر هاله مهاری دیسک‌ها اندازه گرفته شد. بر اساس نتایج به دست آمده ایزوله‌ها به صورت مقاوم (≥ ۱۵ میلی‌متر)، حساسیت متوسط (۱۶-۲۰ میلی‌متر) و حساس (≤ ۲۱ میلی‌متر) گزارش شدند (۱۵).

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



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

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

$$\Delta T_8 - T_0 \text{ Control}$$

$$\text{ضریب بازدارندگی Cinh} \blacktriangleright$$

Treatment T_0 : جذب نوری در محیط کشت حاوی نمک

صفوایی، قبل از انکوبه شدن

Control T_0 : جذب نوری در محیط کشت بدون نمک

صفوایی، قبل از انکوبه شدن

Treatment T_8 : جذب نوری در محیط کشت حاوی نمک

صفوایی، پس از ۸ ساعت انکوبه شدن

Control T_8 : جذب نوری در محیط کشت بدون نمک

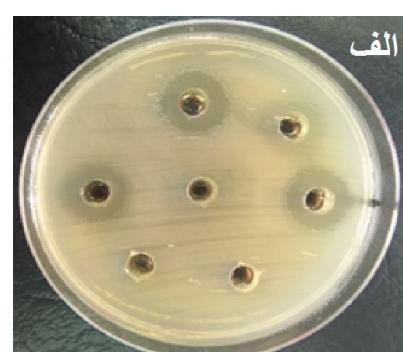
صفوایی، پس از ۸ ساعت انکوبه شدن

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

۱. ایزوله‌های غیرحساس (مقاوم) به نمک صفوایی ($Cinh \approx 0/0$).

۲. ایزوله‌هایی که کاهش رشد دارند ($0/2 < Cinh < 0/4$).

۳. ایزوله‌هایی که مقاومت خیلی کمی دارند ($Cinh > 0/4$). ایزوله‌هایی که در گروه یک و دو قرار گرفتند و دارای ضریب بازدارندگی (Cinh) کمتر از $0/4$ بودند، به عنوان ایزوله‌های مقاوم به نمک صفوایی در نظر گرفته شدند (استاندارد پروبیوتیک‌های ایران: شماره ۲۳۲۵).



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

مقاومت آنتی‌بیوتیکی

L.paracasei plantarum M19-1 Y1-3 حساسیت متوسط و بقیه ایزوله‌ها به آن مقاوم بودند. *L. paracasei* Y8-1 نسبت به کلیندامایسین مقاوم، ایزوله 1 *L. paracasei* Y8-1 حساسیت متوسط و بقیه ایزوله‌ها به آن *L. paracasei* Y8-1 لازم به ذکر است که ایزوله 1 *L. paracasei* Y8-1 نسبت به تمام آنتی‌بیوتیک‌ها به جز تتراسایکلین مقاوم بود (جدول ۱).

پنج ایزوله شناسایی شده از نظر مقاومت به ۹ آنتی‌بیوتیک مختلف مورد بررسی قرار گرفتند. طبق نتایج به دست آمده تمام ایزوله‌ها نسبت به ونکومایسین و استرپتومایسین مقاوم و نسبت به تتراسایکلین حساس، تمامی ایزوله‌ها به جز *L. paracasei* Y8-1 و *L. plantarum* M19-1 به اریترومایسین حساس بودند همچنین تمام ایزوله‌ها به جز *L. paracasei* Y8-1 به پنی‌سیلین و آمپی‌سیلین و کلامافنیکل حساس بودند. ایزوله *L.*

جدول ۱. نتایج تست آنتی‌بیوگرام

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

اگرچه با گذشت ۲/۵ ساعت از مواجهه با شرایط اسیدی زنده باقی مانده بود، ولی در نیم ساعت ابتدای تست تعداد باکتری-های قابل شمارش آن کمتر از بود CFU) 10^6 L. *L. fermentum* Y2-2 $Y2-2 \times 10^5$. سایر سویه‌ها شامل *L.paracasei* Y1-3 و *plantarum* M19-1 تحمل خوبی نسبت به شرایط اسیدی نداشتند و تعداد قابل شمارش آن‌ها به ترتیب بعد از گذشت دو، یک و یک ساعت از مواجهه با شرایط اسیدی به صفر رسید.

تست تحمل به اسید و صفراء

از بین ۵ سویه مورد بررسی، سویه ۱ L. *paracasei* M18-1 تحمل خوبی نسبت به شرایط اسیدی داشت و بعد از گذشت ۳ ساعت از مواجهه 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 $1/2 \times 10^4$ رسید(جدول ۲). سویه ۱ *L. paracasei* Y8-1 نیز

جدول ۲. نتایج آزمایش تحمل اسید

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

L. plantarum M19-1 باشند که ۴ سویه شامل *enteritidis* H7 L. *paracasei* Y1-3 L. *paracasei* M18-1، ۱ *fermentum* Y2-2 اثر مهاری متوسط (قطره هاله عدم رشد mm ۱۶-۱۱) برعلیه *Salmonella enteritidis* H7 مطالعات دیگر نیز نتایج مشابه مشاهده شده است مانند تحقیق ارشادیان و همکاران در سال ۹۴ در شهر سبزوار که لاكتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی جدا شده از ماست این *L. casei* و *L. plantarum* بیشترین اثر مهاری را بر باکتری‌های بیماری‌زای *Staphylococcus aureus* دارند (۶). استفاده مکرر از آنتی‌بیوتیک باعث تغییر فلور روده و غالب شدن باکتری‌های فرصت‌طلب شود (۲۰).

در تست تحمل به صفراء، تنها سویه ۱ *L. plantarum* M19-1 دارای ضریب مهار رشد (C_{inh}) برابر ۰/۲۷ بود که کمتر از ۰/۴ می‌باشد و به عنوان مقاوم به صفراء در نظر گرفته شد، اما سایر سویه‌ها ضریب مهار رشد بالای ۰/۴ داشتند و نسبت به صفراء 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 سویه‌های لاكتوباسیلوس جدا شده از شیر و ماست سنتی می‌توانند دارای اثر ضدمیکروبی برعلیه باکتری‌های عامل اسهال مانند *Salmonella*

تاج آبادی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰ از پنیر و ماست سویه‌های *Lactobacillus brevis* *L. plantarum* و *L.casei* را جدا نمودند که هر سه دارای خاصیت جذب کلسیترول 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 به علت 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).

نتیجہ گیری

با توجه به فواید بی شمار پروبیوتیک ها و استقبال روزافزون از این باکتری های سودمند، امروزه جداسازی سویه های جدید با خواص پروبیوتیکی بهتر مورد توجه می باشد. این مطالعه نشان داد که سویه های Y1-3 بیشترین اثر مهاری، M18-1 بیشترین مقاومت به اسید و M19-1 بیشترین مقاومت به بایل را داشته اند و هیچ کدام از سویه ها همولیز نیز نداشته اند. در نتیجه سویه های لاکتوباسیلوس با اثر مهاری خوب بر علیه سالمونلا اینتریتیدیس از شیر و ماست سنتی قابل جداسازی هستند که می توانند به عنوان کاندید پروبیوتیک جهت پیشگیری و درمان عفونت این باکتری استفاده شوند، البته مطالعات بیشتری، دامنه محدود، مدت زمانی کوتاه و نسبتاً محدود می باشد.

سالہ ۱۹۷۰ء

این مطالعه حاصل یک طرح تحقیقاتی می‌باشد که مرکز تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی بابل حامی مالی آن می‌باشد (۹۶۳۳۱۴). از کلیه افرادی که در اجرای این مطالعه همکاری، داشتند تشکر مم شود.

تعارض در منافع: وجود ندارد.

مقاومت آنتیبیوتیکی در سویه‌های پروبیوتیکی می‌تواند جلو این امر را بگیرد (۲۱). لازم به ذکر 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، مود، دا، س، دا، ونیگ، همولین نمودند.

بعضی از این سویه‌ها دارای ویژگی‌های پریوپیوتیکی 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 برابر ۰/۲۷ C_{inh} ضریب مهار رشد (۰/۴ می‌باشد و به عنوان مقاوم به صفرا در نظر گرفته شد. داوودآبادی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای 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 مخصوصات لبنی سنتی آذربایجان سویه‌های *Lactobacillus pentosus* و *Lactobacillus brevis* را جدا نمودند که به اسید *Listeria* و *Bacillus* مقاوم بوده و همچنین از رشد *Shigella*، *Staphylococcus aureus*، *monocytogenes* و *Streptococcus* و *Salmonella enteritidis* *dysenteriae* و *pneumoniae* جلوگیری کردند و این دو سویه به ترتیب ۸۶٪ و ۶۹٪ خاصیت کاهش کلسترو-دیاستنید (۲۴).

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.* Pajohandeh 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.

- 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.

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

Hossein Soltanmoradi¹, Abolfazl Davoodabadi *^{2,3}, Elnaze Zare Mirzaei¹

Original Article

Introduction: 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: sultamoradi 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.

¹Student Research Committee, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran.

²Cellular and Molecular Biology Research Center, Health Research Institute, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

³Department of Microbiology, School of Medicine, Babol University of Medical Sciences, Babol, Iran

*Corresponding author: Tel: 01132199592-6, email: davoodabadi89@gmail.com