مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره چهارم (پیاپی ۹)، زمستان ۱۳۸۹
صفحات ۲۳۷ ـ ۲۲۹

Original Article

# بررسی اثر بازدارندگی گونه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از مدفوع کودکان بر رشد برخی از باکتری‌های بیماریزای روده و معده

کرامت اله دری*[1]، دکتر وحید حمایت خواه جهرمی[2]، نجمه نامدار[3]، حسین کارگر جهرمی[3]

[1]مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، [2]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی،
[3]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

## چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های اسید لاکتیک گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، غیر متحرک و بدون اسپور می‌باشند که با تولید محصولات تخمیری و اسید لاکتیک اثرات مفیدی بر سلامت میزبان ایجاد می‌کنند. هدف از این پژوهش، جداسازی سویه‌های لاکتوباسیلوس از نمونه‌های مدفوعی کودکان و بررسی خاصیت ضد میکروبی آن‌ها علیه برخی از باکتری‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش از جمله اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری بود.

مواد و روش‌ها: به منظور جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از محیط MRS Agar استفاده شد. شناسایی لاکتوباسیلوس‌ها بر اساس مرفولوژی، خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیک صورت گرفت. اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده بر رشد باکتری‌های بیماری زا با دو روش چاهک و دیسک صورت گرفت. سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده پس از کشت در محیط MRS broth سانتریفیوژ گردید. در پلیت‌های MRS Agar پس از کشت چمنی باکتری‌های پاتوژن، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رویی حاصل از رشد لاکتوباسیلوس‌ها به چاهک‌ها تلقیح و هاله عدم رشد پس از ۴۸-۲۴ ساعت بررسی گردید.

یافته‌ها: از ۴۰ نمونه لاکتوباسیلوس جداشده، ۱۹مورد (۴۷/۵۰٪) دارای اثر بازدارندگی رشد علیه باکتری‌های بیماری‌زا بود. بیشترین سویه‌های شناسایی شده دارای اثربازدارندگی، شامل لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس بود. بیشترین اثربازدارندگی جدایه‌های لاکتوباسیلوس علیه اشریشیا کلی و سالمونلا مشاهده گردید. در تمامی نمونه‌ها، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس فرمنتوم بیشترین اثربازدارندگی رشد را روی سویه‌های پاتوژن داشتند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از مدفوع برای درمان اسهال و سایر بیماری‌های گوارشی می‌تواند مناسب باشد. از این‌رو به نظر می‌رسد که استفاده از این باکتری‌ها در محصولات لبنی می‌تواند در پیشگیری و درمان سودمند باشد.

واژه های کلیدی: لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیاکلی، هلیکوباکتر پیلوری

دریافت مقاله: تیر ۱۳۸۹ پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۹

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی
تلفن: ۰۹۱۷۷۹۱۹۹۵۲،
پست الکترونیک: s.dorri@jia.ac.ir

**مقدمه**

در دستگاه گوارش انسان بیش از ۵۰۰ گونه باکتری زیست می‌کند که دارای نقش مهمی در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماری‌های میزبان می‌باشند. لاکتوباسیلوس ها دامنه وسیعی از ترکیبات ضد باکتریایی را تولید می‌کنند که شامل کاتابولیت‌های قندی نظیر اسیدهای آلی، کاتابولیت‌های اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین‌ها، سایر پپتیدها با وزن مولکولی پایین و پروتئین‌ها یا پپتیدهای ضد قارچی، متابولیت های آمینواسیدی و چربی نظیر اسیدهای چرب و اسید فنیل لاکتیک می‌باشند. ترکیبات با وزن مولکولی پایین نظیر اسید لاکتیک در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی اثر مهار کنندگی دارند (۱، ۲ و ۳).

لاکتوباسیلوس ها پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند و بخش عمده‌ای از فلور طبیعی دهان، معده، روده کوچک و بزرگ را در انسان و سایر حیوانات خون‌گرم تشکیل می‌دهند. روده در زمان تولد استریل است اما به زودی از طریق مادر، مواد غذایی و محیط، انواع میکروارگانیسم‌ها در آن مستقر می شوند (۴ و ۵). لاکتو باسیل‌ها، حدود ۲ الی ۳ روز بعد از تولد در مجاری گوارشی نوزاد استقرار می‌یابند که احتمالاً این باکتری ها از واژن، دهان و روده مادر منتقل شده‌اند. لاکتوباسیلوس ها در روده کودکانی که از شیر مادر تغذیه می‌کنند به تعداد زیادی وجود دارند (۶).

امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی، توجه محققین به استفاده از متابولیت‌های طبیعی بازدارنده رشد میکروب‌های پاتوژن متمرکز گردیده است. این مواد طبیعی می‌توانند جایگزین مناسبی برای مواد نگهدارنده شیمیایی مانند نیتریت‌ها و نیترات‌های دارای اثرات جانبی باشند. قابلیت باکتری‌های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد میکروب‌های پاتوژن ناشی از عوامل متعدد می‌باشد. از جمله این عوامل می‌توان به اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک، پروپیونیک و فرمیک و یا اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، پراکسید هیدروژن، کاهش پتانسیل احیا و به ویژه سنتز آنتی بیوتیک‌ها و باکتریوسین‌ها اشاره نمود. به تمامی ترکیبات یاد شده اصطلاحا بیوسیس می‌گویند (۷ و ۸).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر پاتوژنی هستند که موجب تحریک و یا حفظ تعادل مفید بین جمعیت‌های میکروبی بومی دستگاه گوارش می‌شوند. از پروبیوتیک‌ها به عنوان غذا یا مکمل‌های غذایی برای اهداف درمانی به ویژه مشکلات ناحیه‌ی معده‌ای-روده‌ای یا ادراری-تناسلی استفاده می‌گردد. مهمترین میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک، باکتری‌های اسید لاکتیکی مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس هستند. باکتری‌های دیگری مانند گونه‌های باسیلوس و بیفیدیوباکتریوم نیز در تعدادی از فرآورده‌های تجارتی به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته‌اند. مکانیسم‌های متعددی برای عمل مهاری پروبیوتیک‌ها در مقابل پاتوژن ها پیشنهاد شده است که شامل کاهش pH محیط بوسیله تولید اسیدهای آلی، عمل مهاری مولکول‌های تجزیه نشده‌ی اسید آلی، رقابت بر سر مواد غذایی، رقابت برای دسترسی به محل‌های اتصال، تحریک سیستم ایمنی میزبان و تولید مواد ضد باکتریایی ویژه می‌باشد (۹).

عموماً برای تولید بهینه باکتریوسین، نیاز به محیط‌های کشت، شرایط پیچیده و کنترل بهینه شرایط فیزیکی مانند کنترل pH و دما و فعالیت فیزیولوژیک گونه‌های تولیدکننده آن بستگی دارد. باکتریوسین تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک دارای اثر کشندگی و یا متوقف‌کنندگی رشد برروی باکتری‌های حساس هستند (۱۰).

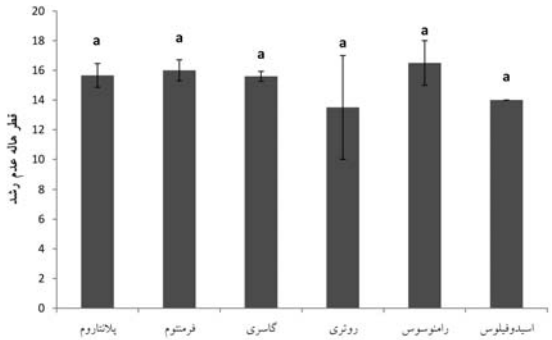
با توجه به بیماری‌زایی سویه‌های باکتریایی در ناحیه گوارش و معده (اشریشیا کلی، سالمونلا و هلیکوباکتر پیلوری) و اغلب نداشتن درمان قطعی و همچنین اثرات نامناسب آنتی بیوتیک‌ها بر سلامت انسان، از جمله به هم زدن فلور طبیعی بدن و مقاوم بودن اکثر سویه‌های باکتریایی پاتوژن به آنتی بیوتیک‌ها، جستجوی راه‌های از بین بردن ارگانیسم‌های یاد شده اهمیت زیادی دارد. بنابراین با توجه به اهمیت باکتری‌های اسید لاکتیک در از بین بردن باکتری‌های پاتوژن، بی‌خطر بودن، تهیه ارزان و آسان و مفید بودن آنها در حفظ سلامت میزبان، هدف از مطالعه حاضر جداسازی و شناسایی لاکتوباسیلوس های مدفوعی و اثر آنها علیه پاتوژن‌های روده و معده از جمله اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

الف) سویه‌های میکروبی و شرایط رشد: سویه‌های سالمونلا تیفی موریوم (ATCC1596)، اشریشیا کلی (PTCC 1595) از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و هلیکوباکتر پیلوری از کشت نمونه بیوپسی بیماران تهیه گردید.

برای کشت باکتری‌های یاد شده از محیط کشت های محیط brain heart infusion Agar(BHI) و Tryptone Soy Broth (TSB) و حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به کدورت ۰/۵ مک فارلند ($1/5\times10^{8}$cfu/ml) استفاده شد. با این تفاوت که تنها هلیکوباکتر پیلوری در شرایط میکروآئروفیل گرم‌خانه‌گذاری گردید.

ب) نمونه‌گیری و کشت لاکتوباسیلوس ها: نمونه‌گیری مدفوع انسانی از دو جنس مذکر و مونث به تفکیک هر جنس ۲۵ نمونه (جمعاً ۵۰ نمونه) از کودکان زیر ۲/۵ سال شیر خوار (تغذیه از شیر مادر) بیمارستان و بخش اطفال شبکه بهداشت شهرستان جهرم انجام گردید. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه ابتدا یک گرم مدفوع را وزن نموده و از آن تهیه رقت (تا رقت $10^{-6}$) گردید. مقدار ۲ میلی‌لیتر از سه رقت انتهایی به محیط کشت MRS broth (De Man- Rogosa- Sharp) انتقال داده، pH محیط ۶/۲ الی ۶/۴ تنظیم گردید و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و شرایط میکروآئروفیل گرم‌خانه گذاری گردید. سپس سوسپانسیون باکتریایی را با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و از رسوبات ته لوله یک لوپ پر به محیط MRS agar منتقل (کشت streak) و پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیل گرم خانه‌گذاری گردید.

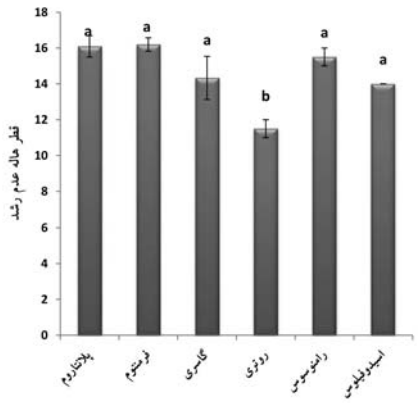



**نمودار ۱:** میانگین قطر هاله عدم رشد گونه های لاکتوباسیلوس علیه باکتری اشریشیاکلی.

ج) شناسایی لاکتوباسیلوس ها: شناسایی لاکتوباسیلوس ها با استفاده از ویژگی‌های مرفولوژی، رنگ آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز، تست‌های بیوشیمیایی، حرکت، تولید $H_2S$، واکنش TSI، اندول، هیدرولیز اسکولین و آزمایش تخمیر قندهای ساکارز، مالتوز، لاکتوز، آرابینوز، گزیلوز، مانوز، مانیتول، رامنوز، سالیسین، رافینوز، گالاکتوز و تری هالوز در محیط Phenol Red Bass Broth مطابق با جداول کتاب برگی انجام شد (۱۱).

د) آماده‌سازی محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس ها: پس از کشت ۷۲-۴۸ ساعته از لاکتوباسیلوس ها در شرایط میکروآئروفیل، مقدار یک سی‌سی از سوسپانسیون را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ rpm سانتریفیوژ و محلول رویی را به یک لوله استریل منتقل گردید و محلول رویی دو بار از فیلتر ۰/۲ میکرومتر عبور داده شد. در نهایت برای اطمینان از عدم وجود باکتری در محلول رویی، یک قطره از آن بر روی محیط کشت MRS Agar کشت داده شد (۱۰-۸).

ه) ارزیابی اثر آنتاگونیسمی: به منظور بررسی فعالیت باز دارندگی لاکتوباسیلوس ها علیه باکتری‌های سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کلی و هلیکوباکتر پیلوری از روش‌های دیسک (Disk method) و چاهک (Well method) استفاده گردید. برای انجام روش دیسک، کشت چمنی باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی در محیط BHI انجام شد. پس از ۶۰ دقیقه دیسک‌های استریل پانچ شده آغشته به مایع رویی فیلتر شده (به میزان تقریبی ۱۰۰ میکرولیتر) روی محیط کشت قرار داده شد و به مدت ۴۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس اثر بازدارندگی رشد با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد ثبت شد. برای انجام روش چاهک،



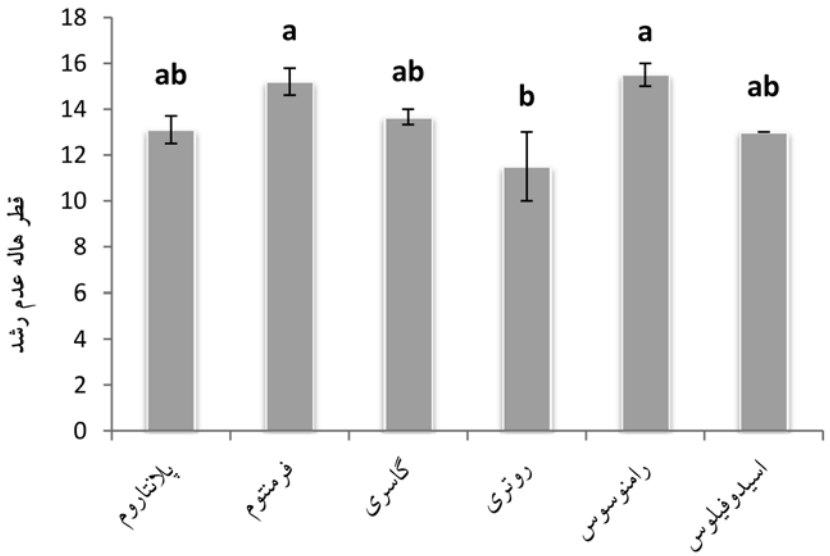

**نمودار ۲:** میانگین قطر هاله عدم رشد گونه‌های لاکتوباسیلوس علیه باکتری سالمونلا تیفیموریوم.

پس از کشت در محیط BHI، حفره هایی به قطر ۶ میلی‌متر و به فاصله معین برروی سطح محیط کشت ایجاد و درون آن ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی فیلتر شده لاکتوباسیلوس ها ریخته شد و مانند روش چاهک نتایج آن ثبت گردید. تاثیر هر کدام از لاکتوباسیلوس های جدا شده از مدفوع بر باکتری‌های پاتوژن، با روش‌های یاد شده با سه تکرار بررسی گردید.

و) آنالیز آماری: نتایج با استفاده از نسخه هجدهم نرم افزار SPSS و آزمون دانکن آنالیز گردید. سطح معنی داری در $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

## نتایج

از ۵۰ نمونه مورد پژوهش، در ۴۰ نمونه لاکتوباسیلوس شناسایی شد. از باکتری‌های جدا شده، ۱۹مورد (۴۷/۵۰٪) دارای اثر مهاری بر روی باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی بودند. پس از تعیین هویت لاکتوباسیلوس های دارای اثر بازدارندگی، ۶ نمونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۳۱/۵۷٪)، ۵ نمونه لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۲۶/۳۱٪)، ۳ نمونه لاکتوباسیلوس گاسری (۱۵/۷۸٪)، ۲ نمونه لاکتوباسیلوس رامنوسوس (۱۰/۵۲٪)، ۲ نمونه لاکتوباسیلوس روتری (۱۰/۵۲٪) و ۱ نمونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۵/۹٪) شناسایی گردید. بیشترین اثر مهار کنندگی علیه پاتوژن‌های مورد بررسی مربوط به لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پلانتاروم به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۸۳، ۱۵/۸ و ۱۴/۹۵ میلی‌متر بود. نتایج اثر بازدارندگی هر دو روش چاهک و دیسک تقریبا مشابه بود. اما با توجه به بالاتر بودن میانگین قطر هاله عدم رشد روش چاهک، نتایج آن ثبت گردید. همچنین اکثر جدایه‌ها روی اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری اثر مهاری داشتند. بیشترین اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس ها علیه اشریشیا کلی، سالمونلاتیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب مربوط به جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس مشاهده گردید. در بررسی مقایسه اثر ضدباکتریایی لاکتوباسیلوس ها بر علیه باکتری‌های پاتوژن، اشریشیا کلی با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۲۱ میلی متر، سالمونلا تیفی موریوم با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴/۶ میلی متر و هلیکوباکتر پیلوری با میانگین ۱۳/۶۶ میلی متر بیشترین حساسیت را نسبت به لاکتوباسیل‌ها از خود نشان دادند. اما اثر بازدارندگی تمامی لاکتوباسیلوس ها بر باکتری اشریشیا کلی تقریبا یکسان بود (نمودار ۱). همچنین تمامی جدایه‌ها به جز لاکتوباسیلوس روتری تاثیر بازدارندگی برعلیه باکتری سالمونلا تایفیموریوم داشتند (نمودار ۲). تاثیر بازدارندگی




**نمودار ۳:** میانگین قطر هاله عدم رشد گونه‌های لاکتوباسیلوس علیه باکتری هلیکوباکتر پیلوری.

لاکتوباسیلوس های جدا شده بر روی هلیکوباکتر پیلوری متفاوت بود (نمودار ۳). در نمودارهای ۱ تا ۳ ستون‌هایی دارای حرف a، ab و b به ترتیب نشان‌دهنده حداکثر تا حداقل اثر بازدارندگی هستند. همچنین ستون‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم ندارند.

## بحث

باکتری‌های گرم منفی روده‌ای به ویژه سالمونلا و اشریشیا کلی از مهم‌ترین عوامل ایجاد مسمومیت‌های غذایی و اسهال به خصوص در کشورهای در حال توسعه می‌باشند. با توجه به مقاومت‌های دارویی در این باکتری‌ها، اثرات درمانی برای این دسته از عفونت‌ها کاهش یافته و نیاز به جایگزین نمودن روش‌های جدید می‌باشد. امروزه از خواص رقابتی باکتری‌ها در درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های پاتوژن استفاده می‌شود که لاکتوباسیلوس ها یا باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک یکی از مهم‌ترین آن‌ها می‌باشند (۱۲).

کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی نمونه‌های مدفوعی کودکان، چندین نمونه لاکتوباسیلوس از جمله لاکتوباسیلوس گاسری، لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس رامینوس جدا نمودند که نتایج محققین یاد شده مشابه تحقیق حاضر بود (۱۳).

در این بررسی لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از مدفوع اثر مهاری روی رشد سالمونلا تیفی‌موریوم، اشریشیا کلی و هلیکوباکتر پیلوری داشت و این اثر باز دارندگی رشد روی اشریشیا کلی قوی تر از سایر باکتری‌ها بود. این تحقیق تائیدی بر بررسی‌های کوکونیر (Cocconier) و همکاران در سال ۱۹۹۸ بود. آن‌ها اثر ضدمیکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را علیه پاتوژن‌های گرم مثبت، گرم منفی و بسیاری از جمله استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، شیگلا، اشریشیا کلی، کلبسیلا نمونیه، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئروجینوزا و انتروباکتر نشان دادند (۱۴). همچنین مورای (Murry) و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر باز دارندگی رشد لاکتوباسیلوس سالیواریوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم را بر روی اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و کلستریدیوم پرفرنجنس ثابت نمودند (۱۵).

در مطالعه جاری، با توجه به اثر باکتریوسین لاکتوباسیلوس‌ها، تاثیر محلول رویی حاصل از رشد لاکتوباسیلوس‌ها علیه رشد باکتری‌های پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت.

پژوهش‌های فورستیر (Forestier) و همکاران در سال ۲۰۰۱ و مانجل (Mangell) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتاروم جداشده از مدفوع، می‌تواند رشد و بیماری‌زایی اشریشیا کلی را در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* متوقف نماید (۱۶ و ۱۷). همچنین زانتوپولوس (Xanthopoulous) و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس را از مدفوع نوزادان جدا و خاصیت پروبیوتیکی آن‌ها را تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی نمایند (۱۸).

جاکوبسن (Jacobsen) و همکاران در سال ۱۹۹۹ نیز با بررسی اثر مهاری محلول رویی چندین جدایه لاکتوباسیلوس بر برخی از سویه‌های بیماریزا مثل لیستریا مونوسیتوژنز، استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کلی و سالمونلاتیفی‌موریوم نشان دادند که لاکتوباسیلوس روتری دارای فعالیت ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به بقیه لاکتوباسیلوس‌ها بود. در این بررسی توانایی رشد لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس پلانتاروم جدا شده از مدفوع در شرایط مختلف مانند pH پایین، غلظت زیاد اکسیژن، بهتر از بقیه لاکتوباسیلوس‌ها بود. همچنین بیشتر سویه‌های جدا شده از این دو نوع لاکتوباسیلوس ها بودند (۱۹).

امین (Amin) و همکاران در سال ۲۰۰۹ تولید باکتریوسین توسط دو گونه لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس کازئی را به روش نقطه گذاری علیه باکتری‌های پاتوژن و همچنین باکتری‌های فاسد کننده مواد غذایی بررسی نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که باکتریوسین تولید شده مانع رشد اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس گردید (۲۰). همچنین قرایی فتح‌آباد (Gharaei Fathabad) و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم را بر روی اشریشیاکلی، سالمونلا تیفی موریوم، استافیوکوکوس، انتروکوکوس فیکالیس و سیتروباکتر نشان دادند (۲۱).

کوی (Cui) و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی اثر آنتاگونیسمی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس فرمنتی بر علیه هلیکوباکتر پیلوری در محیط کشت جامد نشان دادند که در شرایط اسیدی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر روی این باکتری اثر بازدارندگی دارد (۲۲). همچنین ریان (Ryan) و همکاران در سال ۲۰۰۸ و کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۰۸ به کمک گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس، توانستند از فعالیت و رشد هلیکوباکتر پیلوری در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* ممانعت نمایند (۲۳ و ۲۴).

کوکونیر (Coconnier) و همکاران در سال ۲۰۰۰ و تاکایوکی (Takayuki) و همکاران در سال ۲۰۱۱ موفق شدند فعالیت و رشد سالمونلا تیفی موریوم را به کمک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پنتوسوس مهار کنند (۲۵ و ۲۶).

بسیاری از محققان اثر مهاری لاکتوباسیلوس‌های مختلف جدا شده از مدفوع را علیه بسیاری از پاتوژن‌های گرم مثبت و گرم منفی نشان دادند. در پژوهش حاضر نیز اثر ترکیبات ضدمیکروبی تولید شده توسط لاکتوباسیلوس‌های مختلف روی سالمونلا، اشریشیا کلی و هلیکوباکتر پیلوری مشاهده شد که نتایج بدست آمده با نتایج محققان ذکر شده در بالا همخوانی دارد.

باکتریوسین‌ها با مکانیسم‌های متفاوتی مانند توقف بیوسنتز DNA در اشریشیا کلی اثر مهاری خود را روی باکتری‌های پاتوژن اعمال می‌کنند. در اکثر موارد باکتریوسین‌های جدا شده از لاکتوباسیل‌های مدفوعی پروتئین‌هایی با وزن مولکولی پایین ۲ الی ۱۰کیلو دالتون هستند که در برابر حرارت، شرایط اسیدی و سرما نیز مقاوم می‌باشند. باکتری‌های اسید لاکتیک با تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، آمینواسیدهایی از جمله سیستئین و گلوتامین نقش محافظتی خود را علیه پاتوژن‌های روده‌ای ایفا می‌کنند. همچنین لاکتوباسیل‌ها با تولید آنزیم‌های متفاوت از جمله پروتئازها و لیپازها اثر مهاری خود را روی عوامل بیماری‌زا اعمال می‌نمایند. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که اثر مهاری لاکتوباسیلوس‌ها تنها مربوط به یک عامل مانند شرایط اسیدی محلول رویی یا باکتریوسین تولیدی نیست و عوامل بسیاری در آن موثرند (۲۸ و ۲۹).

## نتیجه گیری

به دلیل اثر بازدارندگی باکتری‌های جدا شده در این پژوهش بر روی باکتری‌های پاتوژن، می‌توان با بررسی بیشتر و انتخاب سویه‌های مقاوم به اکسیژن، دما، pH و غیره از آن‌ها به عنوان پروبیوتیک به جای آنتی‌بیوتیک‌ها در درمان و حتی پیشگیری از بیماری‌ها استفاده کرد.

## تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، پرسنل بیمارستان شهید استاد مطهری و بخش اطفال شبکه بهداشت شهرستان جهرم به دلیل حمایت مالی و اجرایی کمال امتنان را دارند.

## References


1. Ghanbari M, Rezaei M, Jami M, Nazari RM. Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from intestinal contents of beluga (*Huso huso*) and Persian sturgeon (*Acipenser persicus*). Iran J Vet Res. 2009; 10(2): 152-157.
2. Bucio G, Hartemink A,Schrama R,Verreth JW and Rombouts FM. Presence of *Lactobacilli* in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiol. 2006; 23(5): 476-482.
3. Ringo E, Bendiksen HR, Wesmajervi MS, Olsen RE, Jansen PA, Mikkelsen H. Lactic acid bacteria associated with the digestive tract of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). J Appl Microbiol. 2000; 89(2): 317-322.
4. Thapa N, Pal J, Tamang JP. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. Int J Food Microbiol. 2006; 107(1): 33-38.
5. Doron S, Snydman DR, Gorbach SL. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical application. Gastroenterol Clin North Am. 2005; 34(3): 483-498.
6. Fayol-Messaoudi D, Berger CN, Coconnier-Polter MH, Liévin-Le Moal V, Servin AL. pH-, Lactic acid-, and non-lactic acid-dependent activities of probiotic *Lactobacilli* against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Appl Environ Microbiol. 2005; 71(10): 6008-6013.
7. Klaenhammer TR. Probiotic bacteria: today and tomorrow. J Nutr. 2000; 130(2): 415-416.
8. Reid G, Bruce AW. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. J Infect Dis. 2001; 183 (1): 77-80.
9. Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. Microbes Infect. 2002; 4(3): 319-324.
10. Servin AL. Antagonistic activities of *Lactobacilli* and *Bifidobacteria* against microbial pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2004; 28(4): 405-440.
11. Kandler O, Weis N. Regular, nonsporing gram- positive rods. In PHA Sneath, N Mair, ME Sharpe, JG Holt (Eds). Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. 1984; Vol. 2: 1220-1232. William and Wilkins, Baltimore.
12. Tahamtan Y, Kargar M, Namdar N, Rahimian A, Hayati M, Namavari MM. Probiotic inhibits the cytopathic effect induced by *Escherichia coli* O157:H7 in vero cell line model. Lett Appl Microbiol. 2011; 52(5): 527-531.
13. Kim HS, Jeong SG, Ham JS, Chae HS, Lee JM, Ahn CN. Antioxidative and probiotic properties of *Lactobacillus gasseri* NLRI-312 isolated from Korean infant feces. Asian-Aust J Anim Sci. 2006; 19(9) : 1335-1341.
14. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Appl Environ Microbiol. 1998; 64(11): 4573-4580.
15. Murry Jr AC, Hinton Jr A, Morrison H. Inhibition of growth of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Clostridia perfringenes* on chicken feed media by *Lactobacillus salivarius* and *Lactobacillus plantarum*. Int J Poultry Sci. 2004; 3 (9): 603-607.
16. Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* rhamnosus: *in vitro* adherence to intestinal cells and *antimicrobial* properties. Res Microbiol. 2001; 152(2): 167-173.
17. Mangell P, Nejdfors P, Wang M, Ahrne S, Westrom B, Thorlacius H, Jeppsson B. *Lactobacillus plantarum* 299v inhibits *Escherichia coli* induced intestinal permeability. Dig Dis Sci. 2002; 47(3): 511-516.
18. Xanthopoulos V, Litopoulou-Tzanetaki E, Tzanetakis N. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant feces as dietary adjuncts. Food Microbiol. 2000; 17(2): 205-215.
19. Jacobsen CN, Rosenfeldt Nielsen V, Hayford AE, Moller PL, Michaelsen KF, Paerregaard A, Sandstrom B, Tvede M, Jakobsen M. Screening of probiotic activities of forty- seven strain of *Lactobacillus* spp by invitro techniques and evaluation of colonization ability of five selected strain in humans. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(11): 4949-4956.
20. Amin M, Jorfi M, Khosravi AD, Samarbafzadeh AR, Farajzadeh Sheikh A. Isolation and identification of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* from plants by PCR and detection of their antibacterial activity. J Biol Sci. 2009; 9(8): 810-814.

21. Gharaei Fathabad E, Eslamifar M. Isolation and applications of one strain of *Lactobacillus paraplantarum* from tea leaves. Am J Food Technol. 2011; 6 (5): 429-434.
22. Cui Y, Wang CL, Liu XW, Wang XH, Chen LL, Zhao X, Fu N, Lu FG. Two stomach- originated *Lactobacillus* strains improve *Helicobacter pylori* infected murine gastritis. World J Gastroenterol. 2010; 16(4): 445-452.
23. Ryan KA, Darly P, Li Y, Hooton C, O'Toole PW . Strain -specific inhibition of Helicobacter pylori by *Lactobacillus salivarius* and other *Lactobacilli.* J Antimicrob Chemother. 2008; 61(4): 831-834.
24. Kim MN, Kim N, Lee SH, Park YS, Hwang JH, Kim JW, Jeong SH, Lee DH, Kim JS, Jung HC, Song IS. The effects of probiotics on PPI -triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. Helicobacter. 2008; 13(4): 261-268.
25. Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M, Servin AL. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enteric* a serovar Typhimurium infecting human enterocyte- like Caco-2/TC-7 cells. Appl Environ Microbiol. 2000; 66(3): 1152-1157.
26. Takayuki I, Fumi I, Ichiro N, Yoshinori K, Hiroshi S, Yoshinobu K. Influence of *Lactobacillus pentosus* S-PT84 ingestion on the mucosal immunity of healthy and *Salmonella typhimurium* -infected mice. Biosci Microflora. 2011; 30 (2): 27-35.
27. Cebeci A, Guracan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strain. Food Microbiol. 2003; 20(5): 511-518.
28. Chang YH, Kim JK, Kim HJ, Kim WY, Kim YB, Park YH. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent in vivo studies. Antonie Van Leeuwenhoek. 2001; 80(2): 193-199.

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 4, January 2011

# Inhibitory Effect of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of children on the pathogenic bacteria of the intestines and stomach

Keramatollah Dorri[1], Vahid Hemayatkhah Jahromi[2], Najmeh Namdar[3], Hosein Kargar Jahromi[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[3]M.Sc., Young Researcher's Club, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

**Abstract**

*Background and Objective:* Lactic acid bacteria are characterized as gram positive, usually non motile, non-spore forming bacteria that affect the health conditions of their hosts due to production of lactic acid and other fermentative yields. The aim of this study was to isolate *Lactobacillus* strains from stool sample of children and to determine their antimicrobial activity against common pathogenic bacteria such as *Escherichia coli*, Salmonella typhimurium and *Helicobacter pylori*.

*Material and methods:* The bacteria were isolated from the stool samples via cultivation on MRS agar media. Identification of the lactobacilli was performed based on their morphological, physiological and biochemical characteristics. Inhibitory effect of isolated *lactobacilli* on pathogenic bacteria was assessed by well diffusion and disk diffusion methods. After centrifuging the cultured bacteria and their sedimentation in the tubes, the pathogenic bacteria were plated on MRS agar. Following adding 100µl **lactobacillus** supernatant to the wells, the results were interpreted after 24-48 h.

*Result:* 19 samples out of 40 samples (47.5 %) had inhibitory effect on the studied pathogenic bacteria. *L. plantarum*, *L. fermentum* and *L. rhamnosus* were isolated more than other species. Maximum inhibitory effects of *lactobacilli* were observed against *Escherichia coli* and Salmonella. The widest antimicrobial hollow were obtained when the pathogenic bacteria were exposed to the supernatants of *L. rhamnosus* and *L.fermentum*.

*Conclusion:* In conclusion, the result showed that *Lactobacillus* strains are useful for treatment of persistent diarrhea and gastrointestinal disease and their consumption as dairy products would be effective for both prevention and treatment.

*Keywords: Lactobacillus*, Probiotics, Salmonella typhimurium, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*

Correspondence to: Keramatollah Dorri
E-mail: S.dorri@jia.ac.ir
Tel:+989177919952
Journal of Microbial World 2011 3(4): 229-237