



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

کرامت اله دری^{۱*}، دکتر وحید حمایت خواه جهرمی^۲، نجمه نامدار^۳، حسین کارگر جهرمی^۳

^۱ مربی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی، ^۲ استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه زیست شناسی، ^۳ 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 بیماری‌زا 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 ۲۴-۴۸ ساعت بررسی گردید.

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

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

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیاکلی، هلیکوباکتر پیلوری

پذیرش برای چاپ: مهر ۱۳۸۹

دریافت مقاله: تیر ۱۳۸۹

مقدمه

در دستگاه گوارش انسان بیش از ۵۰۰ گونه باکتری زیست می کند که دارای نقش مهمی در حفظ سلامت و پیشگیری از بیماری های میزبان می باشند. لاکتوباسیلوس ها دامنه وسیعی از ترکیبات ضد باکتریایی را تولید می کنند که شامل کاتابولیت های قندی نظیر اسیدهای آلی، کاتابولیت های اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین ها، سایر پپتیدها با وزن مولکولی پایین و پروتئین ها یا پپتیدهای ضد قارچی، متابولیت های آمینواسیدی و چربی نظیر اسیدهای چرب و اسید فیل لاکتیک می باشند. ترکیبات با وزن مولکولی پایین نظیر اسید لاکتیک در مقابل باکتری های بیماری زای گرم منفی اثر مهار کنندگی دارند (۱، ۲ و ۳).

لاکتوباسیلوس ها پراکندگی وسیعی در طبیعت دارند و بخش عمده ای از فلور طبیعی دهان، معده، روده کوچک و بزرگ را در انسان و سایر حیوانات خون گرم تشکیل می دهند. روده در زمان تولد استریل است اما به زودی از طریق مادر، مواد غذایی و محیط، انواع میکروارگانیسم ها در آن مستقر می شوند (۴ و ۵). لاکتوباسیل ها، حدود ۲ الی ۳ روز بعد از تولد در مجاری گوارشی نوزاد استقرار می یابند که احتمالاً این باکتری ها از واژن، دهان و روده مادر منتقل شده اند. لاکتوباسیلوس ها در روده کودکانی که از شیر مادر تغذیه می کنند به تعداد زیادی وجود دارند (۶).

امروزه با پیشرفت علم بیوتکنولوژی، توجه محققین به استفاده از متابولیت های طبیعی بازدارنده رشد میکروب های پاتوژن متمرکز گردیده است. این مواد طبیعی می توانند جایگزین مناسبی برای مواد نگهدارنده شیمیایی مانند نیتريت ها و نیترات های دارای اثرات جانبی باشند. قابلیت باکتری های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد میکروب های پاتوژن ناشی از عوامل متعدد می باشد. از جمله این عوامل می توان 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 بیوتیک ها و باکتریوسین ها اشاره نمود. به تمامی ترکیبات یاد شده اصطلاحاً بیوسیس می گویند (۷ و ۸).

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده و غیر پاتوژنی هستند

که موجب تحریک و یا حفظ تعادل مفید بین جمعیت های میکروبی بومی دستگاه گوارش می شوند. از پروبیوتیک ها به عنوان غذا یا مکمل های غذایی برای اهداف درمانی به ویژه مشکلات ناحیه ی معده ای- روده ای یا ادراری- تناسلی استفاده می گردد. مهمترین میکروارگانیسم های پروبیوتیک، باکتری های اسید لاکتیکی مانند لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس بولگاریس، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس هستند. باکتری های دیگری مانند گونه های باسیلوس و بیفیدوباکتریوم نیز در تعدادی از فرآورده های تجارتي به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده قرار گرفته اند. مکانیسم های متعددی برای عمل مهاري پروبیوتیک ها در مقابل پاتوژن ها پیشنهاد شده است که شامل کاهش pH محیط بوسیله تولید اسیدهای آلی، عمل مهاري مولکول های تجزیه نشده ی اسید آلی، رقابت بر سر مواد غذایی، رقابت برای دسترسی به محل های اتصال، تحریک سیستم ایمنی میزبان و تولید مواد ضد باکتریایی ویژه می باشد (۹).

عموماً برای تولید بهینه باکتریوسین، نیاز به محیط های کشت، شرایط پیچیده و کنترل بهینه شرایط فیزیکی مانند کنترل pH و دما و فعالیت فیزیولوژیک گونه های تولیدکننده آن بستگی دارد. باکتریوسین تولید شده توسط باکتری های اسید لاکتیک دارای اثر کشندگی و یا متوقف کنندگی رشد بروی باکتری های حساس هستند (۱۰).

با توجه به بیماری زایی سویه های باکتریایی در ناحیه گوارش و معده (اشریشیا کلی، سالمونلا و هلیکوباکتر پیلوری) و اغلب نداشتن درمان قطعی و همچنین اثرات نامناسب آنتی بیوتیک ها بر سلامت انسان، از جمله به هم زدن فلور طبیعی بدن و مقاوم بودن اکثر سویه های باکتریایی پاتوژن به آنتی بیوتیک ها، جستجوی راه های از بین بردن ارگانیسم های یاد شده اهمیت زیادی دارد. بنابراین با توجه به اهمیت باکتری های اسید لاکتیک در از بین بردن باکتری های پاتوژن، بی خطر 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 پاتوژن های روده و معده از جمله اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری می باشد.

مواد و روش ها

الف) سویه های میکروبی و شرایط رشد: سویه های 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.

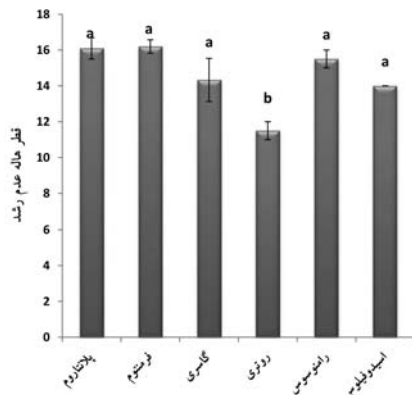
برای کشت باکتری های یاد شده از محیط کشت های محیط (TSB) Tryptone Soy Broth و (BHI) brain heart infusion Agar و حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد تا رسیدن به کدورت ۰/۵ مک فارلند ($1/5 \times 10^8$ cfu/ml) استفاده شد. با این تفاوت که تنها هلیکوباکتر پیلوری در شرایط میکروآتروفیل گرم خانه گذاری گردید.

ب) نمونه گیری و کشت لاکتوباسیلوس ها: نمونه گیری 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 (تارقت 10^{-6}) گردید. مقدار ۲ میلی لیتر 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 سانتی گراد و شرایط میکروآتروفیل گرم خانه 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 پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآتروفیل گرم خانه گذاری گردید.

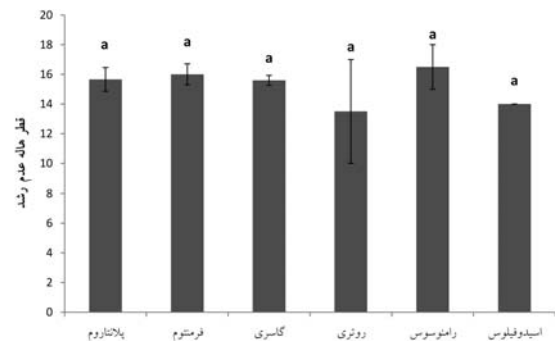
ج) شناسایی لاکتوباسیلوس ها: شناسایی لاکتوباسیلوس ها با استفاده از ویژگی های مرفولوژی، رنگ آمیزی گرم، اکسیداز و کاتالاز، تست های بیوشیمیایی، حرکت، تولید H_2S ، واکنش TSI، اندول، هیدرولیز اسکولین و آزمایش تخمیر قندهای ساکارز، مالتوز، لاکتوز، آرابینوز، گزیلوز، مانوز، مانیتول، رامنوز، سالیسین، رافینوز، گالاکتوز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

د) آماده سازی محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس ها: پس از کشت ۷۲-۴۸ ساعته از لاکتوباسیلوس ها در شرایط میکروآتروفیل، مقدار یک سی سی 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 باکتری های سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کلی و هلیکوباکتر پیلوری از روش های دیسک (Disk method) و چاهک (Well method) استفاده گردید. برای انجام روش دیسک، کشت چمنی باکتری های پاتوژن مورد بررسی در محیط BHI انجام شد. پس از ۶۰ دقیقه دیسک های 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 گرم خانه گذاری گردید. سپس اثر بازدارندگی رشد با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد ثبت شد. برای انجام روش چاهک،



نمودار ۲: میانگین قطر هاله عدم رشد گونه های لاکتوباسیلوس علیه باکتری سالمونلا تیفی موریوم.



نمودار ۱: میانگین قطر هاله عدم رشد گونه های لاکتوباسیلوس علیه باکتری اشریشیا کلی.

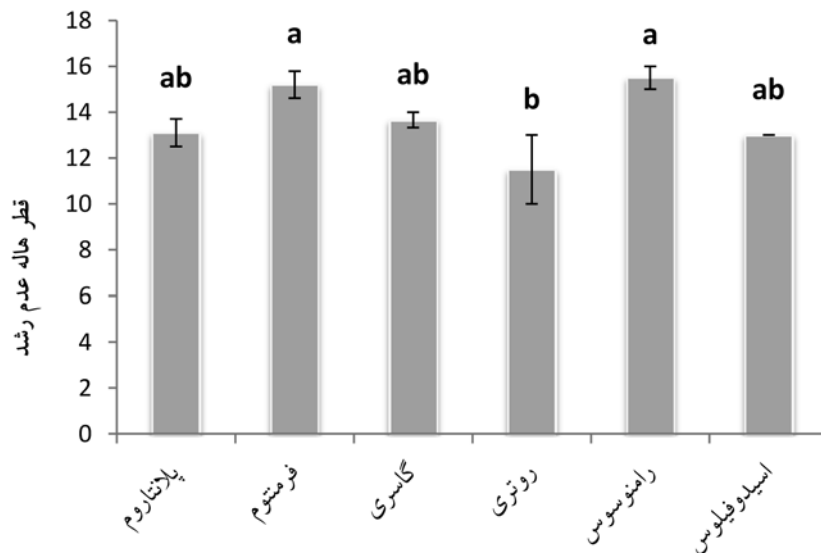
پس از کشت در محیط BHI، حفره هایی به قطر ۶ میلی متر و به فاصله معین بر روی سطح محیط کشت ایجاد و درون آن ۱۰۰ میکرولیتر از مایع رویی فیلتر شده لاکتوباسیلوس هاریخته شد و مانند روش چاهک نتایج آن ثبت گردید. تاثیر هر کدام از لاکتوباسیلوس های جدا شده از مدفوع بر باکتری های پاتوژن، با روش های یاد شده با سه تکرار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

(و) آنالیز آماری: نتایج با استفاده از نسخه هجدهم نرم افزار SPSS و آزمون دانکن آنالیز گردید. سطح معنی داری در $p < 0/05$ قرار داده شد.

نتایج

از ۵۰ نمونه مورد پژوهش، در ۴۰ نمونه لاکتوباسیلوس شناسایی شد. از باکتری های جدا شده، ۱۹ مورد (۴۷/۵۰٪) دارای اثر مهاري بر روی باکتری های پاتوژن مورد بررسی بودند. پس از تعیین هویت لاکتوباسیلوس های دارای اثر بازدارندگی، ۶ نمونه لاکتوباسیلوس پلانتروم (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 مهارکنندگی

علیه پاتوژن های مورد بررسی مربوط به لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پلانتروم به ترتیب با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۵/۸۳، ۱۵/۸ و ۱۴/۹۵ میلی متر بود. نتایج اثر بازدارندگی هر دو روش چاهک و دیسک تقریباً مشابه بود. اما با توجه به بالاتر بودن میانگین قطر هاله عدم رشد روش چاهک، نتایج آن ثبت گردید. همچنین اکثر جدایه ها روی اشیشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری اثر مهاری داشتند. بیشترین اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس هاعلیه اشیشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم و هلیکوباکتر پیلوری به ترتیب مربوط به جدایه های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس مشاهده گردید. در بررسی مقایسه اثر ضدباکتریایی لاکتوباسیلوس ها بر علیه باکتری های پاتوژن، اشیشیا 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 لاکتوباسیل ها از خود نشان دادند. اما اثر بازدارندگی تمامی لاکتوباسیلوس ها بر باکتری اشیشیا کلی تقریباً یکسان بود (نمودار ۱). همچنین تمامی جدایه ها به جز لاکتوباسیلوس روتری تاثیر بازدارندگی بر علیه باکتری سالمونلا تایفیموریوم داشتند (نمودار ۲). تاثیر بازدارندگی



نمودار ۳: میانگین قطر هاله عدم رشد گونه های لاکتوباسیلوس علیه باکتری هلیکوباکتر پیلوری.

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

بحث

باکتری های گرم منفی روده ای به ویژه سالمونلا و اشریشیا کلی از مهم ترین عوامل ایجاد مسمومیت های غذایی و اسهال به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشند. با توجه به مقاومت های دارویی در این باکتری ها، اثرات درمانی برای این دسته از عفونت ها کاهش یافته و نیاز به جایگزین نمودن روش های جدید می باشد. امروزه از خواص رقابتی باکتری ها در درمان عفونت های ناشی از باکتری های پاتوژن استفاده می شود که لاکتوباسیلوس ها یا باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک یکی از مهم ترین آن ها می باشند (۱۲).

کیم (Kim) و همکاران در سال ۲۰۰۶ با بررسی نمونه های 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 لاکتوباسیلوس های جدا شده از مدفوع اثر مهارتی روی رشد سالمونلا تیفی موریوم، اشریشیا کلی و هلیکوباکتر پیلوری داشت و این اثر باز دارندگی رشد روی اشریشیا کلی قوی تر از سایر باکتری ها بود. این تحقیق تأییدی بر بررسی های کوکونیر (Cocconier) و همکاران در سال ۱۹۹۸ بود. آن ها اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را علیه پاتوژن های 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 پلانتراروم را بر روی اشریشیا کلی،

سالمونلا تیفی موریوم و کلسترییدیوم پرفرنجنس ثابت نمودند (۱۵). در مطالعه جاری، با توجه به اثر باکتریوسین لاکتوباسیلوس ها، تاثیر محلول رویی حاصل از رشد لاکتوباسیلوس ها علیه رشد باکتری های پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت.

پژوهش های فورستیر (Forestier) و همکاران در سال ۲۰۰۱ و مانجل (Mangell) و همکاران در سال ۲۰۰۲ نشان داد که لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتراروم جدا شده از مدفوع، می تواند رشد و بیماری زایی اشریشیا کلی را در هر دو شرایط *in vitro* و *in vivo* متوقف نماید (۱۶ و ۱۷). همچنین زانتوپولوس (Xanthopoulos) و همکاران در سال ۲۰۰۰ توانستند گونه های مختلف لاکتوباسیلوس را از مدفوع نوزادان جدا و خاصیت پروبیوتیکی آن ها را تحت شرایط آزمایشگاهی بررسی نمایند (۱۸).

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

امین (Amin) و همکاران در سال ۲۰۰۹ تولید باکتریوسین توسط دو گونه لاکتوباسیلوس پلانتراروم و لاکتوباسیلوس کازنی را به روش نقطه گذاری علیه باکتری های پاتوژن و همچنین باکتری های فاسد کننده مواد غذایی بررسی نمودند. نتایج آن ها نشان داد که باکتریوسین تولید شده مانع رشد اشریشیا کلی، استافیلوکوکوس اورئوس و باسیلوس سرئوس گردید (۲۰). همچنین فرایبی فتح آباد (Gharaei Fathabad) و همکاران در سال ۲۰۱۱ تاثیر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتراروم را بر روی اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی موریوم، استافیلوکوکوس، انتروکوکوس فیکالیس و سیتروباکتر نشان دادند (۲۱).

نتیجه گیری

به دلیل اثر بازدارندگی باکتری های جدا شده در این پژوهش بر روی باکتری های پاتوژن، می توان با بررسی بیشتر و انتخاب سویه های مقاوم به اکسیژن، دما، pH و غیره از آن ها به عنوان پروبیوتیک به جای آنتی بیوتیک ها در درمان و حتی پیشگیری از بیماری ها 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.

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 گونه های مختلف لاکتوباسیلوس، توانستند از فعالیت و رشد هلیکوباکتر پیلوری در هر دو شرایط *in vivo* و *in vitro* 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 تیغی موریوم را به کمک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس پنتوسوس مهار کنند (۲۵ و ۲۶).

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

باکتریوسین ها با مکانیسم های متفاوتی مانند توقف بیوسنتز DNA در اشریشیا کلی اثر مهارتی خود را روی باکتری های پاتوژن اعمال می کنند. در اکثر موارد باکتریوسین های جدا شده از لاکتوباسیل های مدفوعی پروتئین هایی با وزن مولکولی پایین ۲ الی ۱۰ کیلو دالتون هستند که در برابر حرارت، شرایط اسیدی و سرما نیز مقاوم می باشند. باکتری های اسید لاکتیک با تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، آمینواسیدهایی از جمله سیستئین و گلوتامین نقش محافظتی خود را علیه پاتوژن های روده ای ایفا می کنند. همچنین لاکتوباسیل ها با تولید آنزیم های متفاوت از جمله پروتئازها و لیپازها اثر مهارتی خود را روی عوامل بیماری زا اعمال می نمایند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که اثر مهارتی لاکتوباسیلوس ها تنها مربوط به یک عامل مانند شرایط اسیدی محلول رویی یا باکتریوسین تولیدی نیست و عوامل بسیاری در آن موثرند (۲۸ و ۲۹).

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, Snyderman 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, nonsporulating 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, Nejdfor 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, Samarbazfzadeh 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.



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

Keramatollah Dorri¹, Vahid Hemayatkhah Jahromi², Najmeh Namdar³,
Hosein Kargar Jahromi³

¹M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Assistant Professor, Department of Biology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

³M.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