Archive of SID

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۷۰- ۱۵۹
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

بررسی اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی بر باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک (UPEC)

مهسا صدری: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، maah.sa1846@yahoo.com
نازیلا اربابسلیمانی *: استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، nazilaarbab@yahoo.co.uk
محمد مهدی فرقانی فرد: استادیار علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، forghanifard@gmail.com

چکیده

مقدمه: یکی از عوامل مهم در عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از *اشریشیاکلای* یوروپاتوژنیک، چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان است. بنابراین، مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب برای مهار و پیشگیری از عفونت است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص ضد میکروبی و به ویژه ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها بر روی پاتوژن شایع دستگاه ادرای (*اشریشیاکلی*)، با استفاده از روش‌های میکروبی است.

مواد و روش‌ها: در پژوهش حاضر از دو سویه *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC 1643 و *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* PTCC 1608 استفاده شد. تعداد ۴۰ باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک از بیمارستان‌های استان سمنان جمع‌آوری شد. ۲۰ نمونه با بیش‌ترین توانایی در تولید بیوفیلم، برای انجام آزمون‌های میکروبی انتخاب شدند. به منظور بررسی آثار ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس*ها در حالت کشت کامل و مایع رویی کشت (سوپرناتانت)، به ترتیب از روش‌های کشت دولایه اصلاح شده و رقت‌سازی سوپرناتانت استفاده شد. مکانیسم تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس*ها با پاتوژن مورد نظر بررسی شد. تشخیص فعالیت ضد اتصالی سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس*ها، با استفاده از روش میکروتیترپلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد.

نتایج: در تمامی آزمون‌های میکروبی به‌کار رفته اثر ضد میکروبی و اثر ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس*ها بر باکتری‌های *اشریشیاکلی* یوروپاتوژنیک تایید شد. *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* با اثر مهاری رشد (۴۲/۷ میلی‌متر) و ضد اتصالی (۴۶/۷ درصد) به‌عنوان باکتری پروبیوتیک مناسب‌تر در این پژوهش گزارش شد.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج به دست آمده *لاکتوباسیلوس*های پروبیوتیکی در جلوگیری از اتصال، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی باکتری *اشرشیاکلی* یوروپاتوژنیک دارای آثار چشمگیری هستند. بنابراین، استفاده از آن‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت دستگاه ادرای به‌عنوان راهکاری مهم و عملی، منطقی و قابل قبول است.

واژه‌های کلیدی: یوروپاتوژنیک *اشریشیاکلی*، *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی، عفونت دستگاه ادراری، اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی

* نویسنده مسؤول مکاتبات

Copyright © 2016, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی[1] عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری[2] در کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود (۱). در ایالات متحده امریکا سالانه ۱/۶ میلیارد دلار هزینه صرف درمان این بیماری می‌شود و تخمین زده می‌شود ۴۰ تا ۵۰ درصد از زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یک‌بار عفونت دستگاه ادراری را تجربه می‌کنند (۲). این بیماری ابتدا با عفونت مثانه شروع می‌شود، بیشتر با فرا گرفتن کلیه‌ها توسعه پیدا کرده و سرانجام ممکن است به نارسایی کلیوی منجر شود و حتی به خون هم راه یابد (۱). توانایی این باکتری برای اتصال به بافت‌های میزبان یکی از برترین عامل‌هاست که کلونیزاسیون را در دستگاه ادراری تسهیل می‌کند و اجازه پایداری باکتری در برابر جریان ادراری و هجوم آن به اپیتلیال مثانه را می‌دهد. پدیده اتصال، ورود باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال را تحریک می‌کند (۲).

یکی از راه‌های کنترل عفونت‌های حاد ادراری استفاده از آنتی‌بیوتیک است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش هستند. در سال‌های اخیر مطالعات انجام گرفته، تأیید کننده آثار ضد بیماری‌زایی پروبیوتیک‌هاست. به علت تولید عامل‌های ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری کننده از بیماری‌های عفونی ایجاد شده با پاتوژن‌های دهانی، روده‌ای و ادراری- تناسلی مطرح شده‌اند (۳). ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک، توانایی این باکتری‌ها به منظور مهار اقزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز مهار قدرت بیماری‌زایی آن‌ها است. باکتری‌های اسید لاکتیک از قبیل جنس *لاکتوباسیلوس*، با تولید عامل‌های ضد میکروبی و نیز به‌کارگیری مکانیسم‌های مختلف، دارای عملکرد بسیار موثری در این راستا هستند (۴- ۶).

به‌طور کلی نحوه عملکرد *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی در تداخل با بیماری‌زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به علت چهار ویژگی اصلی این باکتری‌ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن‌هاست (۷). همچنین، باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی[3] با میکروب‌های بیماری‌زا مجتمع می‌شوند و با آثار ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول هدف در میزبانشان می‌شوند (۸). بنابراین، پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار ضد میکروبی و ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس*‌های پروبیوتیکی بر باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* و نیز معرفی و پیشنهاد این باکتری‌ها در پیشگیری و درمان عفونت‌های ادراری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری و تهیه نمونه‌ها: ابتدا تعداد ۴۰ نمونه ادرار از افراد مبتلا به عفونت ادراری از بیمارستان‌های استان سمنان (بیمارستان امام حسین و خاتم الانبیا در شهرستان شاهرود و بیمارستان امام رضا در شهرستان دامغان) جمع‌آوری شد. پس از کشت روی محیط ائوزین متیلن بلو[4] و مشاهده کلونی‌های دارای جلای فلزی، آزمون‌های بیوشیمیایی متداول، رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی، حضور ۳۰ ایزوله *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* در بین نمونه‌ها تایید شد. دو سویه[5] *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[6] PTCC 1643 و *لاکتوباسیلوس کازه‌ای*[7] PTCC 1608 از مرکز کلکسیون میکروبی علمی صنعتی ایران خریداری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

سپس، به منظور فعال‌سازی، سویه‌ها در محیط MRS براث[8] و MRS آگار[9] در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. *اشرشیاکلی* PTCC1399 که در این پژوهش به عنوان شاهد به‌کار رفت از مرکز کلکسیون میکروبی علمی صنعتی ایران خریداری شد.

بررسی چگونگی تشکیل بیوفیلم باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* با استفاده از روش میکروتیتر پلیت[10] ۹۶ خانه‌ای: ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تازه کشت یافته به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل لوریا برتانی[11] تلقیح شد. سپس، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی‌لیتری به داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل لوریا برتانی ریخته شد. پس از گذاشتن درب پلیت، گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت این مدت، محتویات چاهک‌ها خالی و با سرم فیزیولوژی استریل ۳ بار شستشو داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد برای تثبیت سلول‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت خشک شد. در مرحله بعد، هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته و با استیک‌اسید ۳۳ درصد به عنوان حلال پر شدند. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌ها در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر مدل[12] (اسات فاکس ۳۲۰۰) ساخت شرکت آمریکا خوانده شد (۹).

بررسی اثر ضد میکروبی کشت کامل پروپیوتیک‌ها با روش کشت دولایه[13] اصلاح شده: برای بررسی آثار ضد میکروبی پروبیوتیک ها، تعداد ۲۰ ایزوله *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* که دارای قدرت بالا در تشکیل بیوفیلم و در نتیجه دارای توانایی اتصال و بیماری‌زایی بالا نیز بودند، انتخاب شدند. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی تازه رشد یافته، در مرکز پلیت MRS آگار قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری و رشد *لاکتوباسیلوس*، محیط مولر هینتون آگار[14] مذاب بر روی آن ریخته و اجازه داده شد تا ببندد. سپس، از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری پاتوژن بر روی این محیط، کشت متراکم داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد. این آزمایش برای ۲۰ نمونه باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* و نمونه شاهد در حضور هر دو *لاکتوباسیلوس* به‌طور جداگانه انجام و نمونه‌ها از لحاظ هاله عدم رشد ایجاد شده، بررسی شدند (۱۰).

بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت پروبیوتیک‌ها با روش رقت‌سازی: به منظور تهیه مایع رویی کشت سلولی[15] از *لاکتوباسیلوس*ها، ابتدا کشت تازه از آن‌ها در محیط MRS براث تهیه شد. سپس، محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور[16] ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و برای اطمینان از عدم وجود هرگونه سلول میکروبی از فیلتر (۰/۲۲ میکرون) عبور داده شد (۲). سپس، ۱۰ لوله محتوی ۵ میلی‌لیترمحیط مولر هینتون براث[17] تهیه واز هر کدام از لوله‌های ۱ تا ۱۰ به ترتیب ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت خارج و به همان میزان سوپرناتانت اضافه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری پاتوژن به لوله‌ها اضافه و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگزاری شد.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش برای ۲۰ نمونه پاتوژن در حضور سوپرناتانت هر دو *لاکتوباسیلوس* و نیز هر نمونه به تنهایی به عنوان شاهد، به شکل جداگانه انجام و لوله‌ها از برای کدورت محیط کشت حاصل از رشد بررسی شدند (۱۱).

بررسی تجمع‌پذیری پروبیوتیک‌ها با باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی*: ابتدا کشت تازه از باکتری‌های پاتوژن و *لاکتوباسیلوس‌های* پروبیوتیکی در محیط مایع تهیه و از رسوب باکتریایی سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند در بافر فسفات سالین[۱۸] تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک و باکتری‌های پاتوژن در یک اپندورف استریل با یکدیگر مخلوط و بلافاصله جذب نوری آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه گیری شد. اپندورف‌های حاوی مخلوط باکتری‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از مدت زمان یاد شده، مایع رویی هر اپندورف از نظر میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی و میزان تجمع یافتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد تجمع یافتن} = \frac{A1 - A2}{A1} \times ۱۰۰$$

A1 میزان جذب نوری بلافاصله پس از مخلوط کردن باکتری‌ها و A2 میزان جذب نوری پس از ۴ ساعت است. آزمون برای ۲۰ نمونه باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* و نمونه شاهد در حضور هر دو *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی به شکل جداگانه انجام شد (۱۲).

بررسی اثر ضد اتصالی سوپرناتانت پروبیوتیک‌ها با استفاده از میکروتیترپلیت ۹۶ خانه ای: به منظور بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها از میکروتیتر پلیت پلی‌استیرنی ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا ۷۵ میکرولیتر از سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک و سپس، ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند نمونه باکتری پاتوژن به چاهک‌ها اضافه شد.

میکروتیترپلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد. در چاهک‌های شاهد تنها باکتری‌های پاتوژن و محیط کشت استریل ریخته شد. سپس، محتویات چاهک‌ها خارج و هر چاهک سه بار توسط بافرفسفات شستشو داده شد. برای تثبیت سلول‌ها از اتانل ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و به منظور رنگ‌آمیزی از کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس، میکروتیترپلیت با جریان ملایم آب شیر شسته شد. پس از خشک شدن چاهک‌ها در معرض هوا، استیک‌اسید ۳۳ درصد به عنوان حلال به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر برای هر چاهک اندازه‌گیری شد. آزمایش برای هرکدام از نمونه‌های پاتوژن در مجاورت هردو پروبیوتیک ۲ بار تکرار و به‌طور جداگانه انجام شد. در نهایت، میزان کاهش اتصال از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کاهش اتصال} = \frac{ODa - ODb}{ODa} \times ۱۰۰$$

ODa بیانگر جذب نوری چاهک کنترل و ODb جذب نوری چاهک مورد آزمایش است (۳).

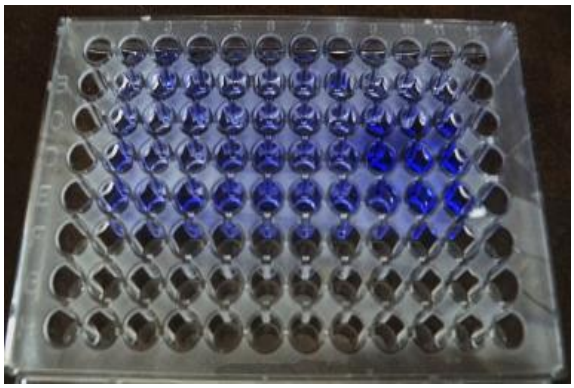
مقایسه عملکرد ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها در آزمون‌های میکروبی انجام شده، با استفاده از روش‌های آماری و به کمک نرم افزار SPSS بررسی و نتایج گزارش شد.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج

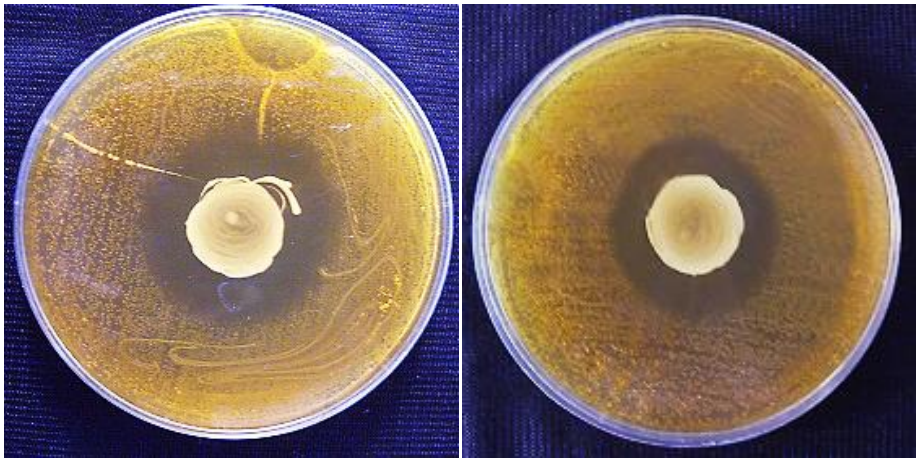
نتایج ارزیابی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *اشریشیاکلای* یوروپاتوژنیک نشان داد که از میان ۳۰ باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم، ۲۵ درصد قدرت ضعیف، ۴۲/۵ درصد قدرت متوسط و ۵۰ درصد دارای قدرت بسیار بالا برای اتصال و تشکیل بیوفیلم بودند که آزمون‌های میکروبی در حضور باکتری‌های پروبیوتیک روی آن‌ها انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱- تشکیل بیوفیلم *اشریشیاکلای* یوروپاتوژنیک در میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای براساس شدت رنگ کریستال ویوله در چاهک‌ها

در آزمون کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک، میانگین قطرهاله عدم رشد *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن توسط *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* ۴۲/۷ میلی‌متر و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۲۹/۵ میلی‌متر بود ومیانگین قطرهاله عدم رشد *اشرشیاکلی* شاهد در حضور *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* به ترتیب ۳۴ و ۲۲ میلی‌متر به‌دست آمد (شکل ۲).

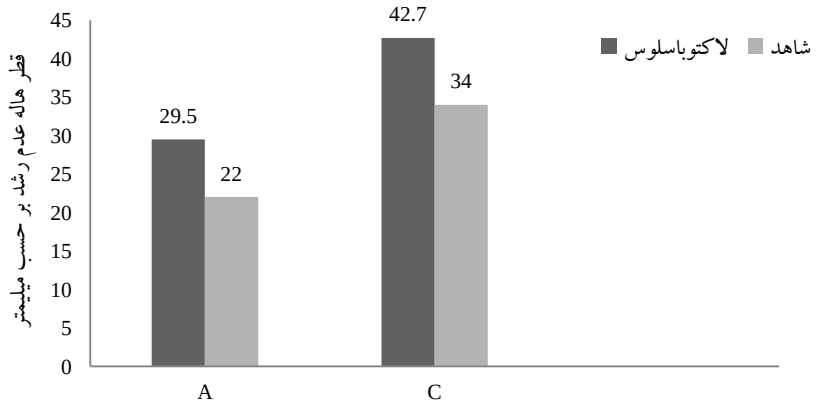
همچنین، بررسی نتایج آزمون تی مستقل (T test) نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* وجود دارد. نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* برروی *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن در حالتی که از کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک استفاده می‌شود، به مراتب بیشتر از حالت مشابه در *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بود (شکل ۳).



شکل ۲- هاله عدم رشد *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن در حضور *لاکتوباسیلوس کازه ای* (سمت راست) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (سمت چپ)

www.SID.ir

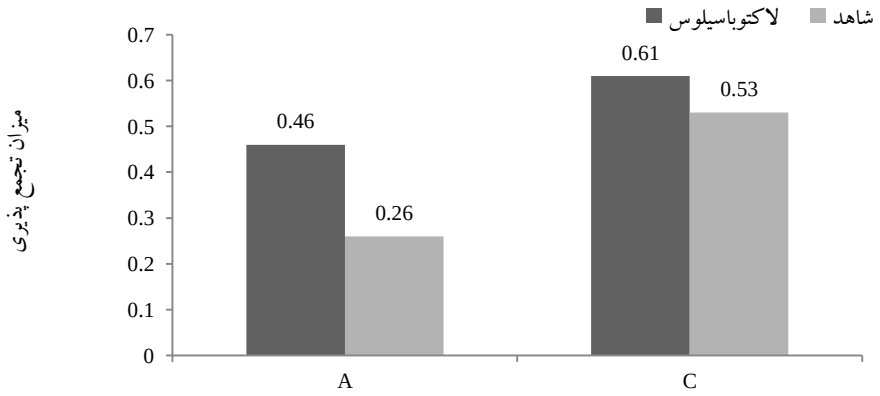
Archive of SID



شکل ۳- نمودار میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیاکلی* یوروپاتوژن و شاهد *اشرشیاکلی* (PTCC1399)در حضور *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (A) و *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* (C) بر حسب میلی‌متر

در آزمون بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت، بررسی کدورت لوله‌ها در نمونه‌های *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* نشان داد، میانگین حداقل غلظت مهارکننده رشد سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* ۱۲ درصد و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* ۱۸ درصد است. بنابراین، اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* در مقایسه با *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*در حالتی که از سوپرناتانت پروبیوتیکی استفاده می‌شود نیز بیشتر بود.

نتایج آزمایش بررسی تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس‌ها* نشان داد که هر دو باکتری پروبیوتیک قادر به تجمع با باکتری‌های *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* با درصد بالایی بودند که از این میان *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* با میانگین ۶۱/۹ درصد نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با میانگین ۴۶/۷ درصد، دارای تجمع‌پذیری بیشتری با *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* بود. میزان تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با *اشرشیاکلی* شاهد به ترتیب ۵۳ و ۲۶ درصد به‌دست آمد. همچنین، نتایج بررسی آزمون تی مستقل نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین دو *لاکتوباسیلوس* وجود دارد (شکل ۴).

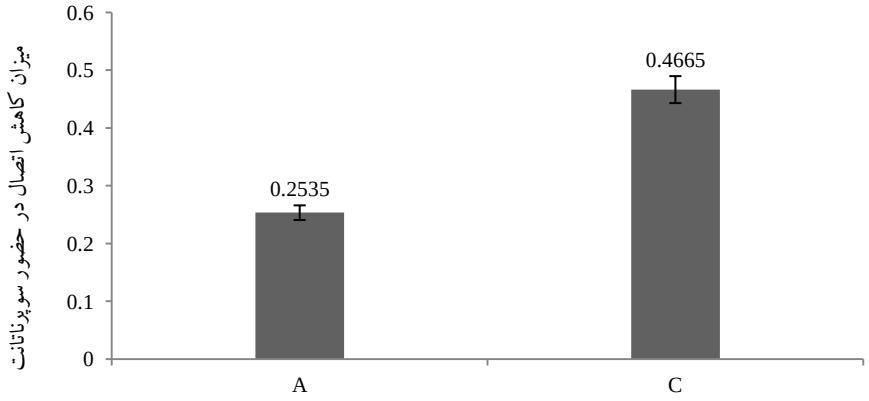


شکل ۴- نمودار میانگین درصد تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* (C) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (A) با باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* و شاهد *اشرشیاکلی* (PTCC1399)

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها بر باکتری بیماری‌زا، از این جهت که سبب جلوگیری از شروع بیماری می‌شود دارای اهمیت است. نتایج نشان داد که سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* با میانگین ۴۶/۷ درصد دارای اثر ضد اتصالی بیشتری نسبت به سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با میانگین ۲۵/۶ درصد است. همچنین، نتایج بررسی آزمون تی مستقل نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین دو *لاکتوباسیلوس* وجود دارد (شکل ۵).



شکل ۵- نمودار میانگین کاهش اتصال باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* در حضور سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازه ای* (C) و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (A)

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت دستگاه ادراری یکی از متداول‌ترین عفونت‌های انسانی است. باکتری *اشریشیاکلی* یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری در افراد با دستگاه ادراری سالم است و مسؤول ۹۰ درصد از کل عفونت مجاری ادراری باکتریال اکتسابی از جامعه است (۱۳). از آنجا که این باکتری مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی شده است، روش‌های ضد میکروبی غیر آنتی‌بیوتیکی نظیر پروبیوتیک‌ها بسیار مورد توجه است. پژوهش حاضر به منظور بررسی خواص ضد میکروبی و ضد اتصالی باکتری‌های پروبیوتیک (*لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) بر پاتوژن شایع دستگاه ادرای (*اشریشیاکلی*)، انجام شد.

روش‌های متعددی برای بررسی ویژگی ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا با استفاده از کشت کامل و سوپرناتانت آن‌ها وجود دارد. بهترین روش برای بررسی اثر کشت کامل پروبیوتیک‌ها روشی است که توسط مک گیون و تگ[19] در سال ۱۹۷۱ با عنوان Spot on – lawn method ارایه شد که در سال ۲۰۰۱ مایا[20] نام آن را به روش کشت دو لایه[21] تغییر داد و در سال ۲۰۱۰ ارباب سلیمانی[22] و همکاران این روش را با کمی اصلاح با نام روش کشت دو لایه اصلاح شده[23] عنوان کردند. در این روش اثر ضد میکروبی کشت کامل پروبیوتیک با وجود هاله عدم رشد باکتری‌های *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* در لایه دوم محیط کشت به خوبی قابل مشاهده بود (۱۰). درپژوهش حاضر نیز از روش کشت دولایه اصلاح شده استفاده شد و نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* بر روی *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشتر

www.SID.ir

Archive of SID

بود. در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازه‌ای سویه شیروتا* علیه *اشرشیاکلی* توسط آساهارا[۲۴] گزارش شد (۷). در سال ۲۰۰۸ آناس[۲۵] و همکارانش اعلام کردند کشت کامل باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*[۲۶] دارای آثار ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*[۲۷] است (۱۴). ارباب سلیمانی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰، نشان دادند کشت کامل *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی بر روی *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* در میان سایر باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمایش بود. (۱۰).

اثر ضد میکروبی سوپرناتانت حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان به تولید اسید لاکتیک نسبت داد زیرا در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدیته محیط به شدت اسیدی شده و باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس بوده و در اسیدیته پایین از بین می‌روند (۱۵ و ۱۶). در این مطالعه بررسی حداقل غلظت بازدارنده از سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد که سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازه ای* در غلظت پایین تر (۱۲ درصد) دارای اثر ضد میکروبی بیشتر بر باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱۸ درصد) بود. در سال ۲۰۰۳ اگانبانو[۲۸] و همکاران نشان دادند سوپرناتانت حاصل از دو پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس برویس*[۲۹] دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *باسیلوس سرئوس*[۳۰] و *یرسینیا انتروکلی تیکا*[۳۱] بوده و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۷). ارباب سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ غلظت ۵ درصد از سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* را برای مهار رشد باکتری‌های *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* جدا شده از ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری، گزارش کردند (۱۰).

توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تجمع با باکتری‌های روده‌ای در شرایط *in vitro* و *in vivo* از دیرباز بسیار مورد توجه بوده و به عنوان مکانیسم کارامدی برای جلوگیری از عفونت مطرح شده است (۱۸). در پژوهش حاضر، اثر مهاری این مکانیسم بر باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* آزمایش شد. درصد تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* به ترتیب در حدود ۶۰ و ۴۵ درصد به‌دست آمد که *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* دارای اثر بهتری بود. رایدا[۳۲] و همکارانش در سال ۱۹۸۸ اثر مهاری *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*[۳۳] سویه *GR-1* و اثر تجمع‌پذیری این باکتری‌ها را با *اشرشیاکلی* جدا شده از دستگاه ادراری گزارش کردند (۱۹). در سال ۲۰۰۲، ساسکوویچ[۳۴] قابلیت تجمع یافتن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را با باکتری‌های پاتوژن *اشرشیاکلی* حدود ۱۹/۴ درصد بیان کرد. همچنین، در سال ۲۰۱۰ ارباب سلیمانی و همکارانش در پژوهشی اثر تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازه‌ای با اشرشیاکلی* را بیش از سایر پروبیوتیک‌ها اعلام کردند (۱۰ و ۲۰).

با بررسی اثر ضد اتصالی سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک بر باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* در این مطالعه، این نتیجه حاصل شد که هر دو *لاکتوباسیلوس* دارای اثر ضد اتصالی مناسبی بودند که از این میان *لاکتوباسیلوس کازه‌ای* اثر ضد اتصالی (۴۶/۷ درصد) بیشتری را نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۲۵/۶ درصد)، بر باکتری *یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی* اعمال کرد. عابدی[۳۵] و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اعلام کردند

www.SID.ir

Archive of SID

کـه لاکتوباسـیلوس‌هـای پروبیـوتیکی دارای اثـر ضـد اتصالی هستند. بر اسـاس گـزارش آن‌هـا *لاکتوباسـیلوس دلبروکی* قادر بود حدود ۸۰ درصد از اتصال *اشرشیاکلی* به سلول‌هـای Caco-2 جلـوگیری کنـد و مکانیسـم آن‌را جـایگزینی رقـابتی دانسـتند. یکـی از علـت‌هـای تفـاوت نتیجه به‌دست آمده در پژوهش حاضر بـا نتیجـه بـه‌دسـت آمـده از پـژوهش عابـدی و همکـارانش تفـاوت سـطوح اتصال است. در کشت سـلولی Caco-2 در رقابـت میـان *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی و بـاکتری *اشرشـیاکلی* بـرای اتصال به گیرنده سلولی لاکتوباسیلوس موفق‌تر بوده و بـا اشغال این جایگاه از اتصال باکتری بیمـاری‌زا جلـوگیری می‌کند اما در میکروتیتر پلیت پلی استیرنی شرایط کشـت سلولی محیا نیست (۲۱). به‌طور کلی در مطالعـات انجـام شده نشان داده شده است، درشرایطی که از کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک استفاده می‌شود نسبت به اسـتفاده از سـوپرناتانت آن‌هـا، اثـر ضـد اتصـالی بیشـتری بـر باکتری‌های بیمـاری‌زا اعمـال مـی‌شـود. مـی‌تـوان چنـین اسـتنباط کـرد کـه در کشـت کامـل اثـر ضـد اتصـالی پروبیوتیک به علت تولید متابولیت‌های ضـد میکروبـی و در برخی موارد به واسطه رقابت مستقیم بـا پـاتوژن بـرای جایگاه اتصـال، عـلاوه بـر ایجـاد شـرایط اسـیدی اسـت. چنانچه اینگراسیا[۳۶] و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثـر ضـد اتصـالی کشـت کامـل *لاکتوباسـیلوس کـازه‌ای سـویه DN-114001* را بـر *اشرشـیاکلی* در شـرایط *in vitro* بررسی و حدود ۵۷ درصد گزارش کردند (۱۰ و ۲۲).

بـر اسـاس یافتـه‌هـای ایـن مطالعـه مـی‌تـوان چنـین نتیجه‌گیری کرد که کشت کامل و سوپرناتانت حاصـل از *لاکتوباسـیلوس کـازه‌ای* و *لاکتوباسـیلوس اسـیدوفیلوس* دارای آثار مهاری علیه *اشرشیاکلی* یوروپاتوژنیک هستند و ایـن بـاکتری‌هـای پروبیوتیـک قادرنـد از اتصـال و در نهایت، تشکیل بیوفیلم این باکتری جلوگیری کنند. یکی از مکانیسـم‌هـایی کـه امـروزه بـه عنـوان برتـری *لاکتوباسیلوس*های پروبیوتیکی مطـرح اسـت قـدرت بـه دام انداختن بـاکتری بیمـاری‌زا بـر اسـاس تجمع‌پـذیری است. اگر چه در گذشته پژوهشگران بر این بـاور بودنـد کـه تجمع‌پـذیری بـاکتری‌هـای پروبیوتیـک بـا عوامـل بیماری‌زا به ویژگی ضد میکروبی آن‌ها مربوط اسـت امـا در سال‌های اخیر ارتباط میان تجمع‌پذیری این باکتری‌هـا و قـدرت ضـد اتصـالی مطـرح شـده اسـت. بـر اسـاس یافته‌های پژوهش حاضر مشخص شد هـر چقـدر قـدرت ضـد میکروبـی و تجمـع‌پـذیری *لاکتوباسـیلوس‌هـای* پروبیوتیکی بیشتر می‌شود قدرت ضد اتصـالی آن‌هـا نیـز افزایش می‌یابد و شاید بتوان ایـن فرضـیه را مطـرح کـرد که تجمع‌پذیری می‌تواند در ارتباط با هـر دو عامـل ضـد میکروبی و ضد اتصـالی باشـد. امیـد اسـت کـه بتـوان بـا پژوهش‌های بیشتر و درک بهتر از مکانیسم ضـد اتصـالی بـاکتری‌هـای پروبیوتیـک بتـوان از آن‌هـا در درمـان و پیشگیری از عفونـت دسـتگاه ادراری اسـتفاده کـرد و از پیدایش سویه‌ای مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری کرد.

References

(1) Matiuzzi da Costa M., Drescher G., Maboni F., Weber Sh dABS., Henning Vainstein M., Schrank I., et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of brazile. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39: 741- 3.

(2) Snyder JA., Haugen BJ., Lockatell CV., Maroncle N., Hagan EC., Johnson DE., et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 2005; 73 (11): 7588- 96.

www.SID.ir

Archive of SID

(3) Spinler JK., Taweechotipatr M., Rognerud CL., Ou CN., Tumwasorn S., Versalovic J. Human- derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14 (3): 166- 71.

(4) Darsanaki RK., Rokhi ML., Aliabadi MA., Issazadeh K. Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. *Middle- east Journal of Scientific Research* 2012; 11 (9): 1216- 19.

(5) Fracchia L., Cavallo M., Allegrone G., Martinotti M. A Lactobacillus- derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic Candida albicans biofilm producers. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2010; 2: 827- 837.

(6) Servin AL. Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28 (4): 405- 40.

(7) Asahara T., Nomoto K., Watanuki M., Yokokura T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (6): 1751- 60.

(8) Collado MC., Meriluoto J., Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens. *Journal of Microbiological methods* 2007; 71 (1): 71- 4.

(9) Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura GD., Djukić S., Ćirković I., et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2007; 115 (8): 891- 9.

(10) Soleimani NA., Kermanshahi RK., Yakhchali B., Sattari TN. Antagonistic activity of probiotic *lactobacilli* against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (20): 2169- 73.

(11) Kasra Kermanshahi R., Beheshti Maal K., Mobini Dehkordi M. *Cellular and Molecular Biology of Bacterial Structure.* 2nd Ed. Esfahan: University of Esfahan; 2008.

(12) Todorov SD., Von Mollendorff JW., Moelich E., Muller N., Witthuhn RC., Dicks LM. Evaluation of Potential Probiotic Properties of Enterococcus mundtii., Its Survival in Boza and in situ Bacteriocin Production. *Food Technology & Biotechnology* 2009; 47 (2): 178- 91.

(13) Mandell GL. Mandell., Douglas., Bennett's. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2005.

(14) Anas M., Eddine HJ., Mebrouk K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal Dairy Food Science* 2008; 3 (2): 39- 49.

(15) Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American journal of Clinical Nutrition* 2001; 73 (2): 374s- 379.

(16) Elham Sarmast Ghahfarokhi., Mohsen Mobini Dehkordi., Keyvan Beheshtimaal. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (3): 41- 52.

(17) Ogunbanwo ST., Sanni AL., Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Jurnal of Biotechnology* 2003; 2 (8): 219- 27.

www.SID.ir

Archive of SID

(18) Kolenbrander PE., Ganeshkumar N., Cassels F., Hughes C. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *The FASEB Journal* 1993; 7 (5): 406- 13.

(19) Reid G., McGroarty JA., Angotti R., Cook RL. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and co aggregation ability with uropathogens, *Canadian Journal of Microbiology* 1988; 34: 344- 51.

(20) Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 2003; 94 (6): 981- 7.

(21) Abedi D., Feizizadeh., Jafarian Dehkordi A. In vitro anti- bacterial and anti- adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2013; 8 (4): 260- 8.

(22) Ingrassia I., Leplingard A., Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei DN- 114 001* inhibits the ability of adherent- invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71 (6): 2880- 8.

[1]- Uropathogenic *Escherichia coli*
[2]- Urinary Tract Infection
[3]- Coaggregation
[4]- Eosin Methylene Blue
[5]- Persian Type Culture Collection
[6]- *Lactobacillus acidophilus*
[7]- *Lactobacillus casei*
[8]- Man Rogasa Sharp Broth
[9]- Man Rogasa Sharp Agar
[10]- Microtiter Plate
[11]- Luria Bertani
[12]- Stat Fax 3200
[13]- Modified Double Layer Method
[14]- Muller Hinton Agar
[15]- Cell Free Supernatant
[16]- RPM
[17]- Muller Hinton Broth
[18]- Phosphate Buffer Saline
[19]- Mc given and Tagg
[20]- Maya
[21]- Double layer method
[22]- Arbab Soleimani
[23]- Modified double layer method
[24]- Asahara
[25]- Anas
[26]- *Lactobacillus plantarum*
[27]- *Staphylococcus aureus*
[28]- Ogunbanwo
[29]- *Lactobacillus brevis*
[30]- *Bacillus cereus*
[31]- *Yersinia enterocolitica*
[32]- Reid
[33]- *Lactobacillus rhamnosus*
[34]- Šušković
[35]- Abedi
[36]- Ingrassia

www.SID.ir

Archive of SID

www.SID.ir

Archive of SID

The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of Probiotic*Lactobacilli* on Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)

Mahsa Sadri
M.Sc. of Microbiology, Department of Micribiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, maah.sa1846@yahoo.com
Nazila Arbab Soleimani *
Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, nazilaarbab@yahoo.co.uk
Mohammad Mahdi Forghanifard
Assistant Professor of Cell and molecular biology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, forghanifard@gmail.com

Abstract

Introduction: One of the most important factors in Urinary Tract Infection caused by Uropathogenic *Escherichia coli*, is the attachment of bacteria to the host cell surface. Thus, inhibition of bacterial attachment is the appropriate action to prevent infection. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and especially anti adhesive characteristics of probiotic bacteria against *Escherichia coli* by using microbial techniques.

Materials and methods: In this study two strains of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 were used .40 Uropathogenic *Escherichia coli* were collected from Semnan province hospitals.20 samples with the more capability of biofilm production were selected for microbial tests. To evaluate the antimicrobial activity of complete culture and supernatant of probiotic *lactobacilli*, modified double layer method and dilution of supernatant were used, respectively. The mechanism of co- aggregation of *lactobacilli* with pathogens was examined. The microtitre plate method was used to detect anti-adhesive activity of *Lactobacilli* supernatant.

Results: The antimicrobial and anti-adhesive effects of probiotic *lactobacilli* on Uropathogenic *Escherichia coli* were confirmed in all tests. In this study, *Lactobacillus casie* with the growth inhibitory (42/7 mm) and anti-adhesive (46/7mm) effects were reported as a proper probiotic bacterium.

Discussion and conclusion: According to the results, the probiotic *lactobacilli* have spectacular effects to prevent attachment, biofilm formation and pathogenicity of UPEC, so using them to prevent and treat Urinary tract infection is a practical, reasonable and acceptable method.

Key words: Uropathogenic *Escherichia coli*, Probiotic *lactobacilli*, Urinary tract infection, Antimicrobial and Antiadhesive Effect

* Corresponding author
Received: May 17, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014

www.SID.ir