

بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس بر علیه میکروارگانیزم‌های شایع در عفونت‌های بیمارستانی

امیر امامی* زهرا هاشمی زاده** رأفت نوعی اقدام***

*دانشجوی دکتری میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
**کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی شیراز
***دانشجوی پزشکی دانشگاه آزاد اردبیل

آدرس مکاتبه: شیراز، میدان امام حسین، دانشکده پزشکی شیراز، ساختمان شماره ۳، بخش باکتری شناسی و ویروس شناسی
تلفن تماس: ۰۹۱۷۳۱۶۸۶۴۰
mail:emami.microbia@gmail.com

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۳/۲۴

* چکیده

زمینه: بحث مقاومت آنتی بیوتیکی در درمان عفونت‌های بیمارستانی یکی از مباحث مطرح دنیاست که سالانه گزارش‌های متعددی از روند صعودی آن منتشر می‌شود. امروزه، استفاده از ترکیب‌های مترشحه از باکتری‌های پروبیوتیک به عنوان مهار کننده و ضد باکتری مطرح است. دو سویه لاکتوباسیل کازئی و اسیدوفیلوس مؤثرترین سویه‌ها در جذب و حذف کلسترول در شرایط آزمایشگاهی و نمک صفاوی کولیک اسید هستند و فعالیت ضد میکروبی دارند.

هدف: مطالعه به منظور تعیین فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیل کازئی و اسیدوفیلوس بر علیه برخی از باکتری‌های معمول در عفونت‌های بیمارستانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه در سال ۱۳۸۷ در بخش باکتری شناسی دانشکده پزشکی شیراز انجام شد. پس از جداسازی لاکتوباسیل‌ها از لبنیات محلی در استان فارس، شناسایی اولیه آنها از طریق آزمایش‌های معمول میکروب شناسی و بیوشیمیایی انجام شد. مقاومت آنتی بیوتیکی هر دو سویه با استفاده از روش انتشار دیسک بررسی شد. سپس از محلول رویی کشت ۷۲ ساعته هر دو باکتری، برای بررسی فعالیت مهارکنندگی آنها بر علیه سویه‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی، کلبسیلا پنومونیا و پseudomonas آئروژینوزا و باکتری اسپورداریوس سابتیلیس در دو حالت فعال و غیر فعال به روش انتشار در آگار، استفاده شد.

یافته‌ها: لاکتوباسیلوس کازئی به تمام آنتی بیوتیک‌ها و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به تمام آنتی بیوتیک‌ها به جز توبرامایسین و وانکومایسین مقاوم بودند. در بررسی خاصیت ضد باکتریایی دو سویه لاکتوباسیل، در اطراف تمام سویه‌های پاتوژن مورد آزمایش به جز باسیلوس سابتیلیس هاله عدم رشد قابل توجهی مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، دو سویه لاکتوباسیل مورد آزمایش مقاومت زیادی در مقابل آنتی بیوتیک‌های معمول خوراکی دارند و محلول رویی کشت آنها نیز فعالیت چشم‌گیری بر علیه پاتوژن‌های بیمارستانی به ویژه تحت شرایط اسیدی و تولید آب اکسیژنه دارد. این در حالی است که محلول غیر فعال شده آن فعالیت ضد باکتریایی محدودتری دارد.

کلید واژه‌ها: لاکتوباسیل، آنتی بیوتیک، عفونت بیمارستانی

* مقدمه

در سال‌های اخیر، ضرورت توجه به مقاومت‌های دارویی در درمان عفونت‌های بیمارستانی مطرح شده است.^(۱) بر پایه گزارش‌های سازمان نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی (NNIS)، گسترش پاتوژن‌های عامل عفونت‌های بیمارستانی در زمان و مکان‌های مختلف، متفاوت است.^(۲) مهم‌ترین باکتری‌های این رده در سال ۲۰۰۸، استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، اتروکوکوس‌های مقاوم به ونکومایسین، اشرشیاکلی

در سال‌های اخیر، ضرورت توجه به مقاومت‌های دارویی در درمان عفونت‌های بیمارستانی مطرح شده است.^(۱) بر پایه گزارش‌های سازمان نظارت بر عفونت‌های بیمارستانی (NNIS)، گسترش پاتوژن‌های عامل

حالی است که متابولیت‌های ضد میکروبی اولیه و ثانویه به غیر از متابولیت‌های فرار که در مراحل مختلف رشد باکتری تولید می‌شوند، نیز مانع از رشد باکتری‌های فاسد کننده و مولد مواد سمی می‌شوند. حتی در برخی از موارد، این ترکیب‌ها باعث دفع و خنثی شدن ترکیب‌های مضر گیاهی در برخی از محصولات می‌شوند.^(۱۰۹) بیشترین عامل مؤثر در خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک مربوط به تولید اسید و کاهش pH است،^(۶) اما در این میان ترکیب‌های ضد میکروبی دیگر مانند دی اکسید کربن، آب اکسیژنه و ۲،۳- بوتانیدیول در دسته ترکیبات‌های با جرم مولکولی پایین (LMM) و باکتریوسین‌ها در دسته ترکیب‌های با جرم مولکولی بالا (HMM) قرار می‌گیرند.^(۸۷) تمام ترکیب‌های ذکر شده در از بین بردن باکتری‌های فاسد کننده مواد غذایی و برخی از پاتوژن‌های غذایی (گوارشی) مؤثر هستند.^(۵۳) اکثر لاکتوباسیل‌ها که در مواد غذایی به ویژه مواد لبنی مثل ماست و پنیر به کار می‌روند، میزان بالایی معادل ۱۰^{۱۰} باکتری در هر گرم از ماده غذایی دارند.^(۷)

این مطالعه با هدف تعیین فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس بر علیه میکروارگانیزم‌های شایع در عفونت‌های بیمارستانی انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه در سال ۱۳۸۷ در بخش باکتری شناسی دانشکده پزشکی شیراز انجام شد. در این مطالعه از دو گونه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی که در مطالعه قبلی^(۴) از میان نمونه‌های به دست آمده از ماست‌های محلی و معمولی موجود در بازار تهیه و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی و قندی شناسایی شده بودند، استفاده شد. در ابتدا حساسیت این دو باکتری به آنتی بیوتیک‌های معمول خوراکی به روش انتشار دیسک بررسی شد تا مقاومت نسبی و ماندگاری آنها تحت شرایط مصرف آنتی بیوتیک از جانب بیمار، ارزیابی شود.^(۸) شش دیسک آنتی بیوتیکی مورد استفاده عبارت بودند از:

مقاوم به سفالوسپورین‌های نسل سوم، پسودوموناس آئروژینوزا مقاوم به ایمی پنم و کوئینولون‌ها و کلبسیلا پنومونیا دارای مقاومت‌های چندگانه بودند.^(۳)

دسته‌ای از باکتری‌ها تولید کننده اسید لاکتیک هستند و به طور معمول به عنوان مایه در تهیه ماست (لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و اسیدوفیلوس)، شیرهای تخمیری (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) و دیگر غذاهای تخمیری استفاده می‌شوند و نقش مهار کننده بر روی برخی از پاتوژن‌ها دارند.^(۴-۶) تاکنون نقش‌های متعددی از این باکتری‌ها شناسایی شده است که برخی از اثرات سودمند آنها عبارتند از: بهبود و حفظ سلامتی مجاری گوارش، افزایش قدرت سیستم ایمنی، تولید و افزایش میزان دسترسی به مواد مغذی مورد نیاز بدن به صورت طبیعی، کاهش علائم مربوط به عدم تحمل لاکتوز و کاهش شیوع بیماری‌های آلرژیک در بین افراد حساس، پیشگیری یا مقابله با سرطان، تولید طعم‌های مختلف مثل استالدئید در ماست و پنیر و دیگر متابولیت‌ها در محصول‌های تخمیری، افزایش ارزش غذایی مثل کاهش اسیدهای آمینه آزاد یا تولید ویتامین‌ها در محصول تخمیر شده به ویژه تولید ترکیب‌هایی مثل نایسین که فعالیت‌های ضد باکتریایی دارد.^(۸۷)

اکثر محصول‌های تخمیری که در حال حاضر در کشور ایران استفاده می‌شوند، شامل باکتری‌های بیفیدو و سویه‌های مختلفی از لاکتوباسیلوس هستند.^(۷۴) البته در محصول‌های لبنی مانند ماست سویه‌هایی مثل لاکتوباسیلوس رامنوسوس و پاراکازئی نیز استفاده می‌شوند.^(۵۴) در حال حاضر باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک به عنوان مؤثرترین باکتری‌ها با کمترین ضررهای جانبی جهت درمان اسهال‌های آنتی بیوتیکی، اسهال‌های حاد دوران کودکی و جلوگیری از آلودگی‌های مجدد کلوستریدیوم دیفیسیل و دیگر بیماری‌های گوارشی استفاده می‌شوند.^(۸۶) از جمله توانایی‌های خاص که به عملکرد پروبیوتیکی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک نسبت داده می‌شود، ایجاد محیط اسیدی است. این در

محیط هم با استفاده از کاتالاز (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) خنثی شد. سپس به میزان ۵۰۰ میکرولیتر از هر دو محلول به داخل چاهک‌های ایجاد شده در پلیت‌های حاوی باکتری‌های مورد آزمایش ریخته شد. برای جذب محلول به داخل محیط، پلیت‌ها به مدت ۲ ساعت در داخل یخچال قرار گرفتند. پس از مرحله جذب، پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام این زمان، اندازه‌هاله‌های مهاری تشکیل شده با استفاده از خط‌کش بر اساس میلی-متر اندازه‌گیری شد.^(۱۰) داده‌ها با استفاده از آمار توصیفی ارائه شدند.

* یافته‌ها:

سویه لاکتوباسیلوس کازئی در برابر تمام آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده در این مطالعه مقاوم بود. سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نیز به جز وانکومايسين و توبرامایسین نسبت به بقیه آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم بود. سویه‌های پاتوژن مورد مطالعه نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول استفاده شده حساس بودند (جدول شماره ۱).

جدول ۱- مقاومت آنتی‌بیوتیکی انتروپاتوژن‌های مورد مطالعه به آنتی‌بیوتیک‌های معمول

نام باکتری	نام آنتی‌بیوتیک	اشرشیاکلی ATCC35218	کلسیلا پنومونیا ATCC 18833	باسیلوس سابتیلیس ATCC6633	پسودوموناس آئروژینوزا ATCC27853	استافیلوکوکوس آئروئوس ATCC25923
آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)	S	S	S	IM	---	S
جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)	S	S	---	S	S	S
سیپرو فلوکساسین (۵ میکروگرم)	S	S	S	S	S	S
تتراسایکلین (۳۰ میکروگرم)	S	S	S	S	---	S
سفترایکسون (۳۰ میکروگرم)	S	S	S	S	IM	S

S: حساس
IM: نیمه حساس
.....: به کار برده نمی‌شود

وانکومايسين (۳۰ میکروگرم)، آمپی‌سیلین (۱۰ میکروگرم)، سفالوتین (۳۰ میکروگرم)، اگزاسیلین (۱ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم) و توبرامایسین (۱۰ میکروگرم). برای اجرای این روش سوسپانسیون باکتریایی با غلظت ۰/۵ مک فارلند برای هر کدام از سویه‌های پروبیوتیک تهیه و به محیط کشت مولر هینتون آگار اضافه شد.^(۱۱)

حساسیت سویه‌های پاتوژن مورد استفاده یعنی اشرشیاکلی (ATCC35218)، استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC25923)، پَسودوموناس آئروژینوزا (ATCC27853)، باسیلوس سابتیلیس (ATCC6633) و کلسیلا پنومونیا (ATCC18833) نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های معمول مورد استفاده در این دسته از عفونت‌ها با استفاده از روش انتشار دیسک تعیین شد.^(۶) فعالیت ضد میکروبی سویه‌های لاکتوباسیل بر روی پاتوژن‌های مذکور نیز با استفاده از روش آگار دیفیوژن بررسی شد. باکتری‌های پاتوژن ابتدا در محیط مایع تربیتون - سویا و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از محیط مایع حاوی باکتری‌های مورد نظر که دارای کدورتی حدود ۱ مک فارلند (3×10^8 cfu/ml) بودند، برداشته و با استفاده از روش Pour Plate به پلیت ۱۰ سانتی‌متری حاوی محیط کشت نوترینت آگار با دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه شدند. پس از سرد شدن محیط، در داخل آن چاهک‌هایی با قطر ۵ میلی‌متر و با فاصله ۳۰ میلی‌متر از یکدیگر و از بدنه پلیت ایجاد شد.^(۶) برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی سویه‌های لاکتوباسیل، سویه‌های مورد نظر به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط ام-آر-اس حاوی ۰/۲ درصد گلوکز تلقیح و ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از سپری شدن این زمان، سلول‌های باکتریایی با استفاده از سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه رسوب داده شدند و سپس برای اطمینان از عدم وجود سلول در محلول به دست آمده، دوباره با استفاده از فیلتر باکتریولوژیکی تصفیه شدند. برای انجام مراحل بررسی، pH نیمی از محلول با استفاده از هیدروکسید ۱ نرمال به ۶/۵ افزایش پیدا کرد و آب اکسیژنه موجود در

تحت چنین شرایطی قرار گیرد، می‌تواند به طور چشمگیری میزان این دسته از باکتری‌ها را کاهش دهد. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که خاصیت ضد میکروبی باکتری‌های تولید کننده اسید لاکتیک، مربوط به تولید ترکیب‌هایی مثل اسید لاکتیک و اسید استیک دی استیل، هیدروژن پراکسید، اسیدهای چرب و آلدئیدها و کاهش pH است (۷ و ۱۰) که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت دارد. طی گزارش‌های ارائه شده می‌توان دریافت که برخی از لاکتوباسیل‌ها مانند پلانناروم (*L. plantarum*) و سیک (*L. Sake*) که از گوشت و محصول‌های گوشتی جداسازی می‌شوند، بر علیه بسیاری از باکتری‌ها نقش مهار کننده دارند. (۱۲) تحقیق گزانتوپولوس بر روی لاکتوباسیلوس پاراکازئی و اسیدوفیلوس جدا شده از مدفوع بچه‌های زیر ۷ سال نشان داد که این سویه‌ها فعالیت ضد باکتریایی محدودی نسبت به باکتری‌های اشرشیاکلی و یرسینیا انتروکلیتیکا دارند. (۱۳) در تحقیق الکساندر و همکاران بر روی سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از نوعی پنیر (*Artisanal minas cheese*) مشخص شد که آنها می‌توانند رشد باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا منوسیتوزنز، که به طور معمول به عنوان شاخص‌های آلودگی مطرح هستند، را مهار کنند. (۱۴)

با توجه به این که تحقیق حاضر بیش تر با هدف تعیین فعالیت ضد باکتریایی سویه‌هایی از لاکتوباسیل که نقش آنها در کاهش موارد مضرى مثل کلسترول به اثبات رسیده است (۴)، انجام شد؛ نتایج حاصل می‌تواند گویای این امر باشد که در صورت استفاده از این دسته از باکتری‌ها به صورت زنده که قادر به ایجاد ترکیب‌های اسیدی و آب اکسیژنه هستند، می‌توان در امر بهینه سازی محیط بیولوژیکی پاتوژن‌های عفونی و برخی از عوامل عفونی سیستم گوارشی مثل اشرشیاکلی سود برد. برای این که بتوان نتایج حاصل از این مطالعه را به طیف گسترده‌تری از عملکرد پروبیوتیک‌ها نسبت داد، توصیه می‌شود بررسی بر روی گستره وسیع‌تری از سویه‌های

محلول‌هایی از لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس که آب اکسیژنه در آنها غیر فعال نبود و تغییری نیز در pH آنها اعمال نشده بود، خاصیت ضد باکتریایی بیش‌تری نسبت به محلول‌های غیر فعال شده داشتند (جدول شماره ۲).

جدول ۲- مقایسه اندازه (میلی‌متر) هاله عدم رشد سویه های انتروپاتوژن مورد مطالعه توسط لاکتوباسیل

محلول باکتری مورد استفاده	نوع محلول مورد استفاده	محلول خنثی شده	محلول اولیه	محلول خنثی شده	محلول اولیه
اشرشیاکلی ATCC 35218	۸	۱۶	۸	۱۵	۱۵
کلسیلا پنمونیا ATCC 18833	۷	۱۴	۷	۱۸	۱۸
باسیلوس سابتیلیس ATCC 6633	*	۶	-	۹	۹
پسودوموناس آرتوژینوزا ATCC 27853	۸	۱۶	۸	۱۷	۱۷
استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923	۹	۱۸	۸	۱۵	۱۵

* : عدم وجود هاله عدم رشد

* بحث و نتیجه گیری:

این مطالعه نشان داد که دو باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و اسیدوفیلوس تقریباً نسبت به آنتی بیوتیک‌های معمول مقاوم بودند. بنابراین، در زمان مصرف این دسته از داروها، میزان این باکتری‌های فلور طبیعی دستگاه گوارش کاهش چشمگیری پیدا نمی‌کند و طی دوره درمان، این باکتری‌ها تا حد زیادی قادر به ادامه عملکرد خود هستند.

از سوی دیگر، دو سویه لاکتوباسیل مورد آزمایش در شرایط غیر فعال (کازئی و اسیدوفیلوس) دارای فعالیت ضد باکتریایی محدودی (هاله عدم رشد کم‌تر از ۱۲ میلی‌متر) بر علیه باکتری‌های اشرشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، پسودوموناس آرتوژینوزا، باسیلوس سابتیلیس و کلسیلا پنمونیا بودند. این در حالی است که در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیب‌هایی نظیر آب اکسیژنه و اسید را داشته و یا

- May 1999. Am J Infect Control 1999 Dec; 27(6): 520-32
3. Rosenthal VD, Maki DG, Mehta A, et al. International Nosocomial Infection Control Consortium report, data summary for 2002-2007. Am J Infect Control 2008 Nov; 36(9): 627-37
4. Emami A, Noei-aghdam R, hashemizadeh Z. Cholesterol assimilation with isolated lactobacilli strains from Fars native dairy product. Armaghan Danesh Medical Journal 2009; 51-52: 45 [In Persian]
5. Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. J Am Coll Nutr 1999 Feb; 18: 43-50
6. Erdogru O, Erbilir F. Isolation and Characterization of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* from Various Foods. Turk J Biol 2006; 30: 39-44
7. Sanders ME. Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. J Nutr 2000 Feb; 130 (25 Suppl): 384S-390S
8. Brashears MM, Gilliland SE, Buck LM. Bile salt deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus casei*. J Dairy Sci 1998 Aug; 81(8): 2103-10
9. Kurdi P, van Veen HW, Tanaka H, et al. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane delta PH in many lactobacilli. J Bacteriol 2000 Nov; 182(22): 6525-8
10. Corzo G, Gilliland SE. Measurement of bile salt hydrolase activity from *Lactobacillus acidophilus* based on disappearance of conjugated bile salts. J Dairy Sci 1999 Mar; 82(3): 466-71
11. Alexandre DP, Silva MR, Souza MR, et al. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from artisanal minas cheese against

پروبیوتیک انجام گیرد. همچنین پیشنهاد می‌شود که این مطالعه بر روی فرآورده‌های دیگر نیز انجام شود تا ضمن بررسی دیگر سویه‌های پروبیوتیک بتوان سویه‌های مؤثرتری از آنها را مورد شناسایی قرار داد. همچنین از آنجا که احتمال کاهش فعالیت ضد باکتریایی محلول لاکتوباسیل‌ها با حرارت و گذشت زمان وجود دارد، می‌بایست از محلول‌های به دست آمده به صورت تازه استفاده شود. با توجه به نتایج مطالعه حاضر می‌توان محلول را به صورت تغلیظ شده نیز مورد استفاده قرار داد که در این صورت با افزایش ترکیب‌های مؤثر در محیط، احتمالاً فعالیت ضد باکتریایی نیز افزایش خواهد یافت. همچنین می‌توان از روش‌هایی مثل کروماتوگرافی نیز برای شناسایی ترکیب‌های مؤثر مترشحه از این دسته از باکتری‌ها استفاده نمود تا در صورت امکان با خلص سازی و تغلیظ آنها، بتوان راه حل زیست شناختی مؤثری نسبت به کاربرد مواد شیمیایی و بروز افزایش مقاومت دارویی در باکتری‌ها به ویژه سویه‌های پاتوژن ارائه نمود.

* سپاس‌گزاری:

از همکاری بخش باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی دانشکده پزشکی شیراز و حمایت مالی دفتر باشگاه پژوهش‌گران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم در انجام این طرح قدردانی می‌شود.

* مراجع:

1. Archibald L, Phillips L, Monnet D, et al. Antimicrobial resistance in isolates from inpatients and outpatients in the United States: increasing importance of the intensive care unit. Clin Infect Dis 1997 Feb; 24(2): 211-5
2. CDC NNIS System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-

12. Daeschel MA. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology* 1989; 43: 64-166
13. Jay JM. Antimicrobial properties of

- diacetyl. *Appl Environ Microbiol* 1982 Sep; 44(3): 525-32
14. Schillinger U, Lucke FK. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989 Aug; 55(8): 1901-06