

## بررسی خاصیت ضد باکتریایی و پروبیوتیکی یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02، جدا شده از دهان بر روی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

### باکتری شایع در بیماران با التهاب لثه

ندا ساجدی نژاد<sup>۱\*</sup>، حکیمه شرفی<sup>۳\*</sup>، مژگان پاک نژاد<sup>۱</sup>، یدالله سلیمانی شایسته<sup>۱</sup>، بهزاد هوشمند<sup>۲</sup>، سیما مدیری<sup>۳</sup>، حسین شهبانی ظهیری<sup>۳</sup> و کامبیز اکبری نوقابی<sup>۳\*</sup>

<sup>۱</sup> تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دندانپزشکی

<sup>۲</sup> تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده دندانپزشکی

<sup>۳</sup> تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۰/۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۵

### چکیده

بیماری‌های لثه به دلیل مجموعه‌ای از شرایطی ایجاد می‌گردد که موجب التهاب لثه و دیگر ساختارهای نگهدارنده دندان می‌شود. هدف این مطالعه بررسی خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس‌های بومی با خصوصیات پروبیوتیک بر روی باکتری بیماری‌زای شاخص در بیماری‌های التهاب لثه، *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* می‌باشد. از میان ۴۰ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از نمونه‌های گرفته شده از دهان افراد سالم و بیمار، سویه منتخب با بالاترین خاصیت ضد باکتریایی انتخاب، با استفاده از تست‌های بیوشیمیایی و مولکولی (۱۶S rRNA) تعیین هویت و تحت عنوان لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02 نامگذاری گردید. در ادامه خصوصیات پروبیوتیکی باکتری منتخب مورد مطالعه دقیق قرار گرفت. بررسی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری مذکور نشان داد که لاکتوباسیلوس جدا شده به میزان ۹۲٫۳۴ درصد به لیزوئیم مقاوم بوده و توانایی رشد در حضور نمک‌های صفرای به میزان ۷۹٫۲۳ درصد را دارا می‌باشد. درصد زنده ماندن جدایه منتخب در شرایط شبیه سازی شده شیره معده قابل توجه بود. پس از ۹۰ دقیقه میزان بقای جدایه مورد نظر،  $7 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$  تعیین گردید. لاکتوباسیلوس جدا شده به اکثر آنتی بیوتیک‌ها حساس بوده و خاصیت ضد باکتریایی قابل توجه‌ای علیه تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای مورد استفاده در این مطالعه نشان داد. حداقل غلظت مهار (MIC) و حداقل غلظت باکتری‌سیدال (MBC) سویه NK02 بر علیه *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* معادل  $512 \text{AUml}^{-1}$ ، MIC:  $1250 \text{AUml}^{-1}$ ، MBC تعیین گردید که در مقایسه با سایر لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده قابل توجه بود. سویه NK02 به عنوان کاندید مناسبی برای درمان بیماری‌های لثه و پس از آزمایشات تأییدی بیشتر در آینده می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: لاکتوباسیلوس پروبیوتیک، *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*، بیماری‌های لثه، حداقل غلظت مهاري رشد

\* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱۴۴۷۸۷۳۵۲، پست الکترونیکی: Akbari@nigeb.ac.ir

\* نویسنده اول و دوم در تحقیق حاضر مشارکت یکسان داشته‌اند.

### مقدمه

بسیار کم بود. لاکتوباسیل‌های مورد آزمایش مانع رشد ۶۹ درصد *P. intermedia* شدند. بیشترین میزان فعالیت ضد میکروبی به *L. salivarius*، *L. plantarum* و *L. paracasei* میکروبی به *L. rhamnosus* مربوط بود. گونه‌های جدا شده از افراد سالم کمترین فعالیت ضد میکروبی را دارا بودند (۴).

Manjunath و همکاران در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثرات مفید پروبیوتیکها در سلامت پریدونتال پرداختند. در این مطالعه پیشنهاد شده که پروبیوتیکها برای پیشگیری از بیماریهای پریدونتال ۳ مکانیسم دارند: اثر مستقیم، اثر رقابتی و تغییر سیستم ایمنی میزبان، پروبیوتیکها باعث کاهش pH، جلوگیری از تولید آنتی اکسیدان‌ها و جلوگیری از شکل‌گیری پلاک با خنثی کردن الکترونها آزاد در شکل‌گیری مواد معدنی می‌گردند. پروبیوتیکها به صورت سنتی برای پیشگیری از سرطان کولون، پایین آوردن کلسترول، پایین آوردن فشار خون، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، کاهش التهاب و... نیز استفاده می‌شوند (۶).

Teughel و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای به بررسی نقش پروبیوتیکها در فلور میکروبی دهان پرداختند. نتایج مشاهدات و مطالعات موجود نشان دهنده اثر مشخص پروبیوتیکها بر روی فلور میکروبی دهان و اثر آن بر روی پارامترهای کلینیکی پریدونتال می‌باشد. به هر حال نیاز به تحقیقات جدیدی که در آن استفاده از پروبیوتیکها به عنوان درمان مکمل در کنار درمانهای اصلی استاندارد پریدونتال، برای بررسی اثر آنها احساس می‌شود (۱۱). در تحقیق حاضر از میان سویه‌های متعدد لاکتوباسیلوس جداسازی شده از نمونه‌های گرفته شده از دهان افراد سالم و بیماران با التهاب و عفونت لثه، یک سویه از لاکتوباسیلوس سالیواریوس با پتانسیل بالای ضد باکتریایی بر علیه یکی از شایعترین عوامل ایجادکننده التهابات لثه یعنی باکتری *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* انتخاب و پس از شناسایی

بیماریهای پریدونتال بیماریهای شایع در جوامع با اتیولوژی چند عاملی هستند. یکی از فاکتورهای مهم در ایجاد این بیماریها عدم توازن در فلور میکروبی و برهم خوردن بالانس میکروبی دهان است. با توجه به اینکه در انواع مختلف بیماریهای التهاب لثه از بین بردن سوشهای پاتوژن اهمیت زیادی دارد روشهای درمانی کنونی شامل آنتی بیوتیک تراپی و جراحیهای معمول می‌باشد. آنتی بیوتیک تراپی علی‌رغم مزایای مختلف سبب ایجاد سوشهای مقاوم شده و در صورت انتخاب آنتی بیوتیک نامناسب عود بیماری دور از انتظار نخواهد بود. روشهای جراحی نیز علی‌رغم مزایای مشخص هزینه بر بوده و موفقیت آنها بستگی به کنترل باکتریهای پاتوژن و عوامل محیطی دارد. با توجه به معایب درمانهای رایج و از سوی دیگر کاربرد روزافزون پروبیوتیکها در درمان بیماریهای مختلف پیش از پیش احساس می‌شود.

پروبیوتیکها باکتریهای زنده‌ای هستند که با بهبود بالانس میکروبی داخل بدن بر روی میزبان تأثیر دارند. بر اساس اعلام سازمان غذای آمریکا، پروبیوتیکها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که وقتی در میزان کافی استفاده شوند فواید بهبود سلامتی برای میزبان دارند (۱۴).

Koll-Kiais و همکاران در سال ۲۰۰۵ در سوئد در مطالعه‌ای به بررسی مقایسه‌ای لاکتوباسیل‌های دهان در افراد سالم و بیماران پریدونتیت مزمن پرداختند. در این مطالعه میزان ۲۳۸ لاکتوباسیل از بزاق و نواحی زیر لثه ۲۰ بیمار پریدونتیت مزمن و ۱۵ فرد سالم جدا شد. از بین ۲۳۸ لاکتوباسیل جدا شده آنها به بررسی فعالیت ضد میکروبی ۱۱۵ جدایه بر علیه *Porphyromonas gingivalis* و *Streptococcus mutans* پرداختند. از بین ۱۱۵ جدایه، ۱۰ گونه لاکتوباسیل شناسایی شدند. گونه‌های شایع در افراد سالم *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus fermentum* و در افراد با پریدونتیت مزمن *Lactobacillus plantarum* بود. همچنین گونه *L. gasseri* در افراد با پریدونتیت مزمن

زای دهانی مذکور در محیط غنی شده اشاره شده در بالا با کدورت ۰/۲ - ۰/۱ تلقیح و سپس بر روی محیط MRS که باکتری لاکتوباسیلوس بر روی آن رشد داده شده بود ریخته شد. پلیتها در ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس ها علیه *A. actinomycetemcomitans* براساس ایجاد هاله عدم رشد بررسی شد (۱).

**تعیین هویت مولکولی:** برای شناسایی مولکولی سویه برگزیده، از روش توالی یابی ژن rRNA ۱۶S استفاده گردید. بدین ترتیب که نخست (DNA) دی.ان.آ باکتریایی از دو میلی لیتر کشت تازه باکتری (فاز نیمه لگاریتمی رشد) با استفاده از کیت اختصاصی شرکت روشه استخراج و سپس ناحیه ژنی مربوطه به طول تقریبی ۱۵۰۰ جفت‌باز با استفاده از دو سری پرایمر یونیورسال 27F و 1492R تکثیر گردید.

**بررسی خصوصیات پروبیوتیکی جدایه منتخب:** بررسی حضور ژن *bsh* با واکنش زنجیره ای پلیمرز: واکنش زنجیره ای پلیمرز جهت بررسی وجود ژن *bsh* که کد کننده فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی می باشد در لاکتوباسیلوس های جداسازی شده انجام شد (جدول ۲). پرایمرهای مورد نظر بر اساس توالی ژن *bsh* موجود در بانک ژنی تهیه شد. توالی پرایمر های استفاده شده در جدول ۱ نشان داده شده است:

بیوشیمیایی و مولکولی، ویژگیهای پروبیوتیکی آن به دقت مورد مطالعه قرار گرفت.

### مواد و روشها

**جداسازی لاکتوباسیلوس ها و شناسایی اولیه:** نمونه های جمع آوری از دهان پس از انتقال به آزمایشگاه رقت سازی و در محیط اختصاصی MRS کشت داده شد و در ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸-۷۲ ساعت تحت شرایط هوازی قرار داده شد. سپس کلنهای شیری رنگ گرم مثبت و کاتالاز منفی، به عنوان لاکتوباسیلوس انتخاب و به صورت کلنی تک، کشت و نگهداری شدند.

**انتخاب سویه منتخب:** سویه منتخب جداشده از دهان فرد سالم براساس خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری *A. actinomycetemcomitans* انتخاب گردید. در این تست پس از رشد لاکتوباسیلوس ها در شرایط هوازی از روش deferred antagonism استفاده شد (۸). محیطی که به عنوان محیط لایه زیرین انتخاب شد MRS آگار ۱/۴ درصد فاقد سدیم استات و تری آمونیوم سولفات با pH:7.1 بود. محیط استفاده شده در لایه بالایی هم شامل Brain Heart Infusion (BHI) حاوی ۰/۷ درصد آگار بود که با ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۰/۰۰۰۵ همین برای رشد اختصاصی باکتری *A. actinomycetemcomitans* به محیط اضافه گردید. برای انجام تست ابتدا لاکتوباسیلوس ها بر روی محیط زیرین تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده شده تا رشد کنند. باکتری بیماری

جدول ۱- توالی پرایمر های استفاده شده

پرایمرها	5'-CGTATCCAAGTGCTCATGGTTTAA-3 '5'-ATGTGTACTGCCATAACTTATCCAATCT-3'	Forward Reverse
----------	--	--------------------

ژل آگاروز لود شد و الکتروفورز انجام گرفت (۱).

برای بررسی نتایج، ۴ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده مخلوط شده و در چاهکهای

جدول ۲- برنامه واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) استفاده شده در این مرحله

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
واسرشته سازی اولیه	94°C	4 min	1
واسرشته سازی	94°C	30 S	30
اتصال	64°C	30 S	
طویل شدن	72°C	1 min	
طویل شدن نهایی	72°C	7 min	

**سنجش فعالیت هیدرولیزی نمکهای صفراوی:** برای انجام این تست، کشت ۲۴ ساعته باکتری منتخب بر روی محیط MRS آگار حاوی sodium salt of glycodeoxycholic acid (MRS-GDCA) به میزان ۵ درصد تلقیح و پلیتها به صورت بی هوازی در ۳۷ درجه به مدت ۷۲ ساعت نگهداری، سپس ایجاد هاله یا پلاکهای سفید موجود در اطراف کلنی باکتری مورد بررسی قرار گرفت (۳).

**تحمل شیره معده:** برای انجام این تست کشت شبانه لاکتوباسیلوس منتخب را پس از سانتریفیوژ و جداسازی توده باکتری از سوپ رویی دو بار با بافر فسفات (0.1 M, pH 7.0) شستشو داده و سپس در محلول الکترولیتی استریل (SES) حل و بلافاصله به محلول هم حجم شیره معده [0.6% (w/v) pepsin, 1% (w/v) NaCl] افزوده شد. سوسپانسیون میکروبی حاصل بلافاصله در ۳۷ درجه قرار داده شد و به آرامی اسیدی شده و در بازه زمانی ۹۰ دقیقه pH آن از ۵ به ۲/۲ رسانده شد (۱۰). شمارش سلولهای زنده مانده پس از ۹۰-۸۰-۷۰-۶۰-۳۰-۰ دقیقه بر روی محیط MRS آگار بررسی شد.

**سنجش مقاومت به لیزوزیم:** برای انجام این تست کشت شبانه لاکتوباسیلوس منتخب را پس از سانتریفیوژ و جداسازی توده باکتری از سوپ رویی دو بار با بافر فسفات (0.1 M, pH 7.0) شستشو و در ۲ میلی لیتر محلول رینگر (Sigma Aldrich) حل گردید. سپس ۱۰ درصد از سوسپانسیون باکتری حاصل در محلول

**سنجش تحمل pH اسیدی:** برای بررسی این تست لاکتوباسیلوس جدا شده در MRS broth اسیدی شده از pH ۹-۲ در دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۲۰ دقیقه قرار داده می شوند سپس درصد زنده ماندن آنها با کنترل مقایسه گردید (۵).

**سنجش تحمل نمک صفراوی:** توانایی رشد باکتری جدا شده در ۱-۳-۵ درصد نمکهای صفراوی با تلقیح باکتری در محیط MRS حاوی مقادیر مختلف نمکهای مذکور بعد از ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه بررسی گردید (۱۲).

**فعالیت ضد باکتریایی:** بررسی خاصیت ضدباکتریایی بر علیه پاتوژن اصلی در بیماران با التهاب و عفونت لته (پریودنتیت) یعنی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* و همچنین باکتریهای بیماری زای دیگر اشاره شده در جدول ۳ با روش Well diffusion assay (Minimum Inhibitory Concentration) سنجش گردید. همچنین MIC (Minimum Bactericidal Concentration) آنها نیز تعیین گردید. میزان تولید ماده ضد باکتریایی تولید شده توسط لاکتوباسیلوس جدا شده به صورت (AU) arbitrary units محاسبه گردید. یک (AU) arbitrary units به صورت عکس بالاترین رقتی از ترکیب ضد باکتریایی، نشان دهنده هاله شفاف عدم رشد سویه شاخص یا اندیکاتور، تعیین و محاسبه می گردد (۲).

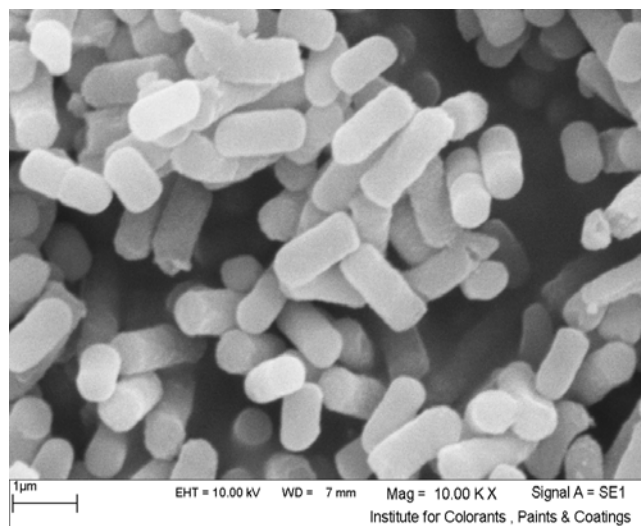
الکترولیتی شامل مواد زیر تلقیح شد (  $CaCl_2$ ;  $6.2 \text{ g l}^{-1}$  )  $(NaCl, 2.2 \text{ g l}^{-1}$   $KCl, 1.2 \text{ g l}^{-1}$  and  $0.22 \text{ g l}^{-1} NaHCO_3$  ). یکی از محلول‌های الکترولیت به عنوان تست و حاوی  $1 \text{ mg l}^{-1}$  لیزوزیم و دیگری در شرایط کاملاً مشابه و فاقد لیزوزیم به عنوان کنترل در ۳۷ درجه انکوبه و مورد بررسی قرار داده شد. در بازه زمانی ۱۲۰-۳۰-۰ دقیقه از نمونه های مورد آزمایش و کنترل نمونه برداری و بر روی محیط MRS آگار شمارش کلنیها انجام شد (۱۰).

مقاومت آنتی بیوتیکی: برای بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جداشده از روش Standard disc diffusion استفاده گردید (۹).

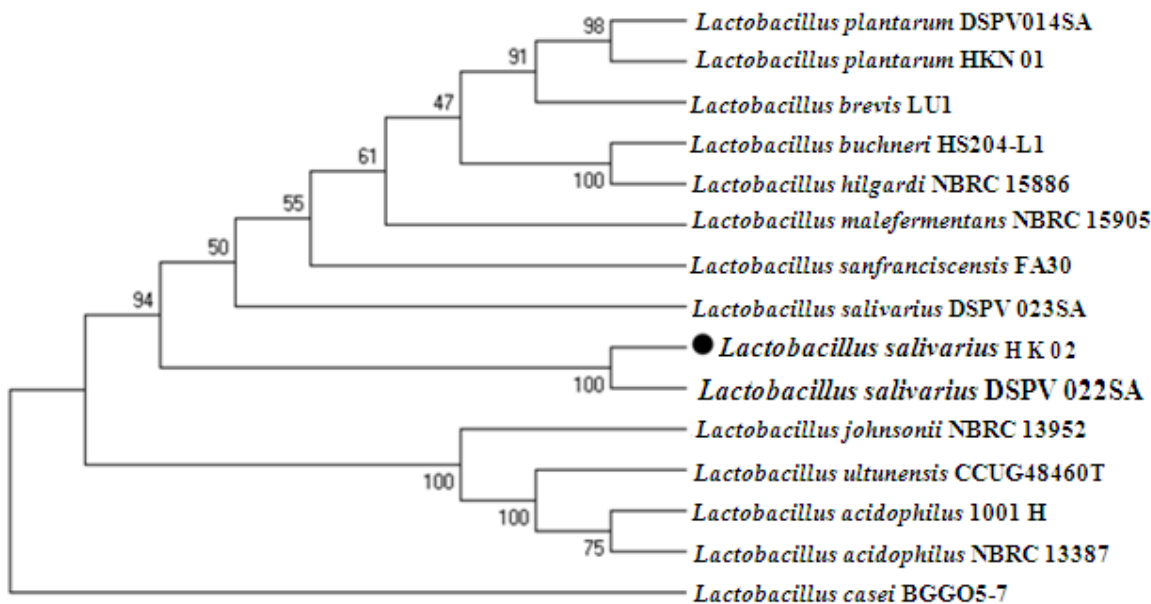
## نتایج

ویژگیهای پروبیوتیکی: تعیین پروفایل ژن *bsh*: به دلیل اهمیت وجود ژن *bsh* که کد کننده فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی و موجب کاهش کلسترول سرم خون می شود و همچنین ارتباط ژن *bsh* با خواص پروبیوتیکی جدایه های لاکتوباسیلوس این تست با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر و با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز بر روی جدایه منتخب بررسی شد. نتایج به دست آمده نشان داد که جدایه منتخب ناقل ژن مورد نظر می باشد (شکل ۳).

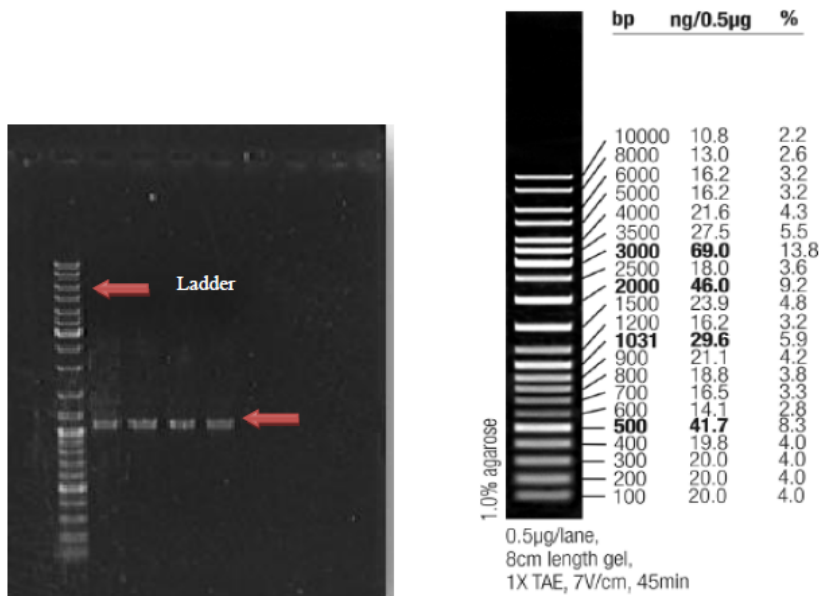
جداسازی و غربالگری سویه منتخب براساس خصوصیت ضد باکتریایی: از بین ۴۰ سویه لاکتوباسیلوس جداشده یک جدایه براساس بیشترین خاصیت ضد باکتریایی برعلیه *A. actinomycetemcomitans* انتخاب شد. این سویه بیشترین  $512 \text{ AUml}^{-1}$  MIC و بیشترین  $1250 \text{ AUml}^{-1}$  MBC را در مقایسه با سایر لاکتوباسیلوس ها داشت. جدایه منتخب از روش توالی یابی ژنی



شکل ۱- شکل ظاهری باکتری لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02 توسط اسکنینگ میکروسکوپ الکترونی (SEM)



شکل ۲- فیلوژنتیک دندروگرام حاصل از آنالیز توالی rRNA ۱۶S. ارتباط سویه NK02 با دیگر لاکتوباسیلوسها نشان داده شده است.



شکل ۳- PCR ژن bsh در لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02

صفراوی به میزان ۷۹/۲۳ درصد مشاهده شد. مقاومت سویه منتخب در شرایط شبیه سازی شده شیره معده تغییر قابل توجهی در ۶۰ دقیقه اول با کاهش pH از ۵ به ۲/۵ مشاهده نشد. شمار سلولهای لاکتوباسیلوس منتخب پس

مقاومت به لیزوزیم، نمکهای صفراوی و شیره شبیه سازی شده معده: لاکتوباسیلوس جدا شده به میزان ۹۲/۳۴ درصد مقاومت به لیزوزیم و شرایط شبیه سازی شده دهان نشان داد. همچنین توانایی رشد آن در مجاورت با نمکهای

را به صورت هاله عدم رشد بر روی محیط MRS-GDCA نشان داد.

**خاصیت ضدباکتریایی:** خاصیت ضد باکتریای لاکتو باسیلوس جداشده علاوه بر علیه *A. actinomycetemcomitan* بر علیه باکتریهای بیماری زای دیگری نیز سنجیده شد. نتایج در جدول ۳ ارائه شده است.

از ۷۰ و ۸۰ دقیقه در ۲/۵ و ۲/۴ pH به ترتیب  $9.76 \pm 0.05$  و  $9.50 \pm 0.02$  بود. در پایان تست وقتی شرایط شبیه سازی شده معده به ۲/۲ pH پس از ۹۰ دقیقه رسید، میزان بقای سویه مورد نظر  $7 \log_{10} \text{CFU ml}^{-1}$  تعیین گردید.

**فعالیت هیدرولیزی نمکهای صفاوی:** لاکتوباسیلوس جداشده توانایی هیدرولیز نمک سدیم گلایکودکسی اسید

جدول ۳

bacteria	<i>S. aureus</i> (PTCC 1112)	<i>B. subtilis</i> (PTCC 1715)	<i>B. cereus</i> (PTCC 1015)	<i>E. coli</i> (PTCC 1338)	<i>S. typhimurium</i> (wild type)	<i>K. pneumonia</i> (PTCC 1290)	<i>P. aeruginosa</i> (PTCC 1310)
MIC (AUml <sup>-1</sup> )	۲۵۶	۶۴	۶۴	۲۵۶	۵۱۲	۵۱۲	۱۲۸
MBC (AUml <sup>-1</sup> )	۳۱۲	۱۵۶	۱۵۶	۳۱۲	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۳۱۲

**مقاومت آنتی بیوتیکی:** لاکتو باسیلوس سالیواریوس سویه NK02 با توجه به نتایج به دست آمده (جدول ۴) به اکثر آنتی بیوتیکهای ذکر شده حساس و تنها به استرپتومايسين مقاومت نشان داد.

**سنجش تحمل pH:** تأثیر pH روی لاکتوب اسیلوس جداشده بررسی شد و شمار سلولهای زنده در pH های ۲، ۵، ۷ و ۹ به ترتیب ۶۸/۳۴، ۹۳/۲۳، ۷۰/۳۴ و ۶۹/۱۲ گزارش شد. میزان زنده ماندن لاکتو باسیلوس در ۲ و ۹ pH به میزان قابل توجهی کاهش یافت.

جدول ۴

Antibiotics \ Bacteria	Amoxycillin (AMX 25)	Ampicillin (AMP 10)	Cefixime (CFM 5)	Cefotaxime (CTX 30)	Azithromycin (AZM 15)	Tetracycline (TE 30)	Gentamycin (CN 10)	Streptomycin (S 10)	Chloromphenicol (C 30)
	<i>L. salivarius</i>	S	S	S	S	S	S	S	R

NK۰۲

سخت برای میکروارگانیسم ها در دهان و تحت تأثیر آنزیم لیزوزیم موجود در بزاق شروع و در معده در حضور pH:1.5 الی ۳ و در بخش فوقانی روده که صفرا در آنجا وجود دارد ادامه پیدا می کند. جدایه منتخب مقاومت بالایی در برابر غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در لیتر آنزیم لیزوزیم در شرایط مشابه بزاق موجود زنده نشان داد.

**بحث**

یک ویژگی مرحله مهم جهت انتخاب باکتریایی که قابلیت بروز ویژگی پروبیوتیکی را دارند بررسی وضعیت سویه مورد نظر در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش می باشد. این راهکار امکانی را فراهم می آورد تا سویه هایی که احتمالاً در این شرایط زنده می مانند شناسایی شده و در ادامه مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. شرایط

۰/۳ درصد تا ۱ درصد بوده در حالی که Mathara و همکاران مقدار ۰/۳ درصد از صفرا را برای انتخاب سویه‌هایی که مقاومت مطلوبی دارند پایه‌گذاری کردند (رشد بالای ۵۰ درصد در مقایسه با محیط کشت کنترل که فاقد صفرا می‌باشد). با به کارگیری مقادیر مشابه صفرا و معیارهای گزینشی، لاکتو باسیلوس سالیواریوس سویه NK02 توانایی بقای مناسبی در شرایط شبیه‌سازی شده معده و روده داشت که این امر نشان‌دهنده توانایی مطلوب جدایه‌منتخب می‌باشد (۷).

نتایج به دست آمده در این تحقیق به طور اختصاصی نشان می‌دهند که توانایی بالقوه ضد باکتریایی سویه NK02 همراه با خصوصیات قابل توجه پروبیوتیکی آن در مهار رشد یکی از شایع‌ترین باکتری‌های ایجادکننده بیماری‌های دهان و لثه یعنی *A. Actinomycetemcomitans* می‌تواند نوید بخش استفاده گسترده از آن به عنوان کاندیدی مناسب برای کنترل و درمان بیماری‌های مرتبط با دهان و لثه باشد. تحقیقات بیشتر در این ارتباط در دست انجام می‌باشد.

ویژگی دیگری که مربوط به باکتری‌های پروبیوتیک مختلف می‌باشد فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی است که شامل تجزیه نمکهای صفراوی به حالت اولیه آنها می‌باشد و باعث حفاظت از باکتری‌ها در برابر خاصیت سمی نمکهای صفراوی تجزیه نشده می‌شود و به عنوان یک مکانیسم سم‌زدایی در جمعیت‌های باکتریایی (مانند لاکتو باسیلوس‌ها) که به طور معمول با دستگاه گوارش انسان در ارتباط هستند از اهمیت خاصی برخوردار است. نتایج به دست آمده نشان داد که لاکتو باسیلوس سالیواریوس جدا شده حاوی ژن *bsh* می‌باشد. به دلیل اهمیت ژن *bsh* که کدکننده فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی می‌باشد و در نهایت باعث کاهش کلسترول سرم خون می‌شود، این ژن انتخاب شد. همچنین سویه منتخب فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی و مقاومت نسبت به اسیدهای صفراوی را نیز نشان داد.

جدایه‌منتخب سازگاری مطلوبی در برابر شیره شبیه‌سازی شده معده با pH 2.5 و تحمل بالایی را در برابر صفرا نشان داد. در اغلب تحقیقات اخیر مقادیر صفراوی مورد استفاده از

## منابع

1. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, and Selvi S (2005) Effect of yogurt with Bifidobacterium DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontologica Scandinavica* 63:317-320.
2. Chavez LE, Molander A, Dahlen G (2004) Gram positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *International Endodontic Journal* 9: 579-587.
3. Gupta V, Gupta B (2010) Probiotic and periodontal disease. *Journal of Oral Health Community Dentistry* 1:35-37.
4. Koll-Kiais P, Mandar R, Leibur E (2005) Oral lactobacilli in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity. *Oral Microbiology and Immunology* 6: 354-361.
5. Köll P, Mändar R, Marcotte H, Leibur E, Mikelsaar M, Hammarström L (2008) Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology and Immunology* 23(2):139-47.
6. Manjunath RGS (2011) Benefits of live microorganisms (probiotics) in periodontal health. *International Journal of Contemporary Dentistry* 2:97-100.
7. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ (1997) Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: validation and the effects of bile. *Journal of Dairy Science* 80:1031-1037.
8. Morency H, Mota-Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC (2001) Comparison of the activity spectra against pathogens of bacterial strains producing a mutacin or alantibiotic. *Canadian Journal of Microbiology* 47:322-331.
9. Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S (2008) Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized double blind placebo controlled



- study. Journal of Clinical Periodontology 10:897-905.
10. Stamatova I, Meurman JH (2009) Probiotics and periodontal disease. Periodontology 1:141-151.
  11. Teughels W, Quirynen LG (2011) Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota. Journal of Clinical Periodontology 38:159-177.
  12. Vinderola CG, Reinheimer JA (2000) Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal 4: 271-276.
  13. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG (2010) Effect of probiotic *Lactobacilli reuteri* in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. Journal of Oral Microbiology 2:53-44.
  14. Zahradnik RT, Magnusson I, Walker C, McDonell E, Hillman CH, Hillman JD (2009) Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. Journal of Applied Microbiology 107:682-690.

## The study of antibacterial and probiotic characteristics of a strain of *Lactobacillus salivarius* NK02, newly isolated from human mouth: its effect on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ‘the etiological agent of periodontal disease

Sajedi Nejad N.<sup>1</sup>, Sharafi H.<sup>3</sup>, Pak Nejad M.<sup>1</sup>, Soleimani shayesteh Y.A.<sup>1</sup>, Houshmand B.<sup>2</sup>, Modiri S.<sup>3</sup>, Shahbani Zahiri H.<sup>3</sup> and Akbari Noghabi K.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Tehran University of Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Tehran, I.R. of Iran

<sup>2</sup> Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Tehran, I.R. of Iran

<sup>3</sup> National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. of Iran

### Abstract

In this study, the antibacterial properties of probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human mouth on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ‘prevalent etiologic agent of periodontal diseases’ was investigated. Among 40 *Lactobacillus* strains isolated from healthy and diseased human mouths, the most efficient antibacterial-producing strain was selected for further studies. The morphological and biochemical characterization of selected isolate matched the literature description about genus *Lactobacillus*. Partial sequencing of 16S rRNA gene and its alignment with other *Lactobacillus* strains revealed that the isolate was closely related to the *Lactobacillus salivarius*. We thus tentatively labeled the isolate as *Lactobacillus salivarius* NK02. The study of probiotic properties of NK02 strain demonstrated that the isolate had significant resistance to lysozyme and adequate ability to grow in the presence of bile salts. Viability of the NK02 strain in simulated gastric juice was remarkable and the survival rate of isolate was 7 logs CFU ml<sup>-1</sup> after 90 minutes. The NK02 strain was sensitive to most antibiotics and had anti-bacterial activity against certain pathogenic bacteria used in this study. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of HK01 strain against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was determined as MIC: 512 AUml<sup>-1</sup> and MBC: 1250 AUml<sup>-1</sup> that was higher than expected compared with other *Lactobacilli*.

**Key words:** *Lactobacillus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, periodontal diseases, minimum inhibitory concentration.