



بارگذاری ریز مغذی نانو ذره سلنیم در ساختار باکتری‌های لاکتوباسیل و بررسی توان ضد میکروبی آن جهت ساخت مکمل دارویی ضد اسهال

صادق چراغی سرای^۱ | علی حسین خانی^{۱*} | اکبر تقی زاده^۱ | حمید محمدزاده^۱ | حامد همیشه کار^۲

^۱ گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
^۲ مرکز تحقیقات کاربردی علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز

چکیده: اثرشیاکلی عامل اصلی اسهال خونی است. تحقیق حاضر در راستای پیشنهاد داروی زیست محیطی ضد اسهال، به بررسی اثرات هم‌افزایی و ضد میکروبی نانو ذرات سلنیم و لاکتوباسیل‌ها روی اثرشیاکلی پرداخته است. توان ضد میکروبی نمونه‌های آزمایشی به روش انتشار از دیسک و چاهک به صورت اندازه‌گیری هاله عدم رشد ارزیابی شد. همچنین کمترین غلظت مهار رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) به روش رقت‌سازی انجام گردید. نتایج بدست آمده نشان داد در هر دو روش چاهک و دیسک بیشترین قطر هاله عدم رشد به ترتیب با میانگین $23/6$ و $23/36$ میلی‌متر متعلق به تیمار "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها" روی گونه استاندارد اثرشیاکلی بود. تعیین MIC و MBC نیز حاکی از آن بود که دو تیمار "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها" و "نانو ذرات سلنیم+لاکتوباسیل" به ترتیب با میانگین کل $590/7$ و $615/38$ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MIC و میانگین کل $955/32$ و $1195/67$ میکروگرم بر میلی‌لیتر برای MBC، پایین‌ترین مقادیر را نسبت به سایر تیمارها داشتند ($P < 0/05$). تمامی آزمون‌ها حاکی از توان ضد اسهالی بالای نمونه "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها" بود. از اینرو به شرط تکرار آزمایش در مطالعات آتی و اطمینان از صحت نتایج بدست آمده، می‌توان ساخت داروی زیست محیطی با این فرمولاسیون را جهت استفاده درمانی توصیه نمود.

واژگان کلیدی: نانو ذره سلنیم، لاکتوباسیلوس، ضد میکروبی، اثرشیاکلی.

a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

۱- مقدمه

ضد میکروبی و کاربردهای درمانی نانوذرات در اولویت‌های پژوهش‌های ملی قرار گرفته است. مطالعات صورت گرفته توان ضد میکروبی نانو ذرات را بدین صورت تشریح کرده‌اند که پس از واکنش بین نانو ذرات و ماکرو مولکول‌های موجودات زنده، اختلاف بین بار منفی میکروارگانیسم و بار مثبت نانو ذره، به صورت یک الکترومغناطیس جاذب بین میکروبی و نانو ذره عمل کرده و باعث اتصال نانو ذره به سطح سلول شده و در نتیجه می‌تواند باعث مرگ سلول شود. در نهایت تعداد زیادی از این تماس‌ها منجر به اکسید

نانوبیوتکنولوژی زیر مجموعه‌ای از علم نانوتکنولوژی است که از موجودات زنده مانند باکتری‌ها، جلبک‌های سبز و قارچ‌ها در جهت بیوسنتز نانو ذرات استفاده می‌کند [۱]. نانو ذرات به دلیل داشتن نسبت سطح به حجم بالا و اندازه کوچک، امکان اتصال و تعامل بیشتری با ساختارهای سلولی میکروبی‌ها را دارند [۲]. لذا با گسترش پدیده مقاومت به اثربخشی داروها، مطالعه بر روی اثرات

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی بود که اجرای تمامی مراحل آن به تأیید کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسید. جزئیات دقیق گروه‌های آزمایشی در جدول ۱ بیان شده است.

جدول ۱: مقدار نانو ذرات سلنیم و تعداد لاکتوباسیل‌ها در تیمارهای آزمایشی

تیمار	مقدار سلنیم ($\mu\text{g/ml}$)	تعداد لاکتوباسیل (Cfu/ml)
شاهد	۰	۰
لاکتوباسیل	۰	$10^8 - 10^9$
نانو ذره سلنیم	0.308 ± 0.043	۰
نانو ذره سلنیم + لاکتوباسیل	0.311 ± 0.07	$10^8 - 10^9$
نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها	0.302 ± 0.014	$10^8 - 10^9$

۲-۲- تهیه منبع نانو سلنیمی

نانو ذرات سلنیم سنتز شده در شرکت نانو مواد ایرانیان با اندازه ۴۵-۱۰ نانومتر استفاده شد. برای ارزیابی اینکه نانو ذره سلنیم بعد از بارگذاری در ابعاد نانو باقی مانده و به حالت بالک در نیامده است، آزمون‌های مربوط به تغییر رنگ محلول، طیف سنجی فرابنفش مرئی UV-Vis، تعیین الگوی پراش پرتو X (XRD)، تعیین اندازه ذرات و الگوی ریخت شناسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام گرفت. بدین منظور از دستگاه آنالیزی SEM، مدل LEO 1455 VP ساخت کشور آلمان استفاده شد. همچنین از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل 2601 ساخت شرکت Ray Leigh چین برای آزمون طیف سنجی و از دستگاه Equinox 3000 ساخت کشور فرانسه برای آنالیز XRD استفاده گردید.

۲-۳- تهیه گونه‌های لاکتوباسیلی و اثرشیاکلی

سویه‌های منتخب لاکتوباسیلی و گونه استاندارد اثرشیاکلی (ATCC 25922) از کلکسیون مرکز باکتری‌های صنعتی ایران به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه تهیه گردید. مشخصات چهار گونه لاکتوباسیلی به شرح ذیل می‌باشد: *Lactobacillus casei*

شدن مولکول‌های سطحی میکروب‌های بیماری‌زا شده و باعث مرگ سریع آنها می‌شوند [۳]. از بین نانو ذرات متعددی که بررسی شده‌اند فقط تعداد کمی قادر هستند رشد باکتری‌های مقاوم به دارو را به طور موثری مهار کنند [۴]. نانوذره سلنیم، ذره‌ای قرمز رنگ است که علاوه بر توان ضد میکروبی بالا، خواص جدیدی مانند اثرات کوانتومی و واکنش پذیری بالا در محدوده‌ای وسیع‌تر را آشکار می‌نماید [۵]. از اینرو جهت کنترل و ممانعت از عفونت‌های مقاوم به دارو، گزینه مناسبی می‌باشد. از سوی دیگر سلول زنده و متابولیت‌های پروبیوتیک‌ها می‌توانند به عنوان عوامل ضد میکروبی مطرح شوند [۶]. نحوه عملکرد پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلی در تداخل با عفونت‌ها بسیار متنوع است و این تنوع به علت ویژگی اصلی آنها از جمله توانایی در اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار پاتوژن‌هاست [۷]. با توجه به اینکه استفاده همزمان از چند ماده ضد میکروبی نسبت به استفاده تنها یک عامل ضد میکروبی بسیار موثر خواهد بود [۸]، از اینرو چنانچه بتوان ریز مغذی‌های با قابلیت توان ضد میکروبی بالا را به نحوی در توده زیستی باکتری‌های لاکتوباسیل وارد کرد به این علت که در سیستم گوارش انسان و دام باقی می‌مانند، باعث آزاد شدن و جذب تدریجی این ریزمغذی‌ها در لوله گوارش میزبان شده و اثرات ضد میکروبی مستمری از خود نشان می‌دهند [۹]. عنصر سلنیم به عنوان یک ریز مغذی کمیاب و ضروری بوده که همواره به واسطه داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثر حفاظتی در برابر عوامل مختلف بیماری‌زا، نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی و مقابله با عوامل عفونی دارد [۱۰]. از اینرو در مطالعه حاضر با امید یافتن جایگزین جدید و زیست محیطی برای داروهای ضد اسهال خونی که عامل اصلی آن باکتری عفونی اثرشیاکلی است، سعی گردید عنصر سلنیم به شکل نانو ذره که به مراتب توان ضد میکروبی بالایی نسبت به اشکال معدنی و آلی آن دارد، به صورت مختلف به همراه لاکتوباسیل‌ها استفاده شده و اثرات ضد میکروبی آن‌ها روی ایزوله‌های استاندارد و بالینی اثرشیاکلی جدا شده از بره‌های شیرخوار به عنوان مدل حیوانی، بررسی و گزارش گردد.

۲- بخش تجربی

۲-۱- گروه‌های آزمایشی

در متابولیسم گونه‌های لاکتوباسیلی از روش جذب اتمی کوره‌ای استفاده شد [۱۳]. دستگاه اتمی مورد استفاده Perkin Elemer مدل ۳۰۳۰ ساخت کشور آمریکا بود.

۲-۵- ارزیابی به روش انتشار در چاهک و دیسک

در روش انتشار دیسک، دیسک بلانک آغشته به هر یک از تیمارهای آزمایشی بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار قرار داده شد و در روش انتشار چاهک، گوده‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر در محیط کشت ایجاد نموده و مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر یک از رقت‌های آماده شده نمونه‌های آزمایشی با سمپلر درون چاهک‌ها ریخته شد. سپس پلیت‌ها در هر دو روش برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت نمونه‌های آزمایشی درون محیط نفوذ کرده و متناسب با قدرت هر تیمار در جلوگیری از رشد باکتری مولد اسهال، هاله عدم رشد در اطراف دیسک و چاهک مشاهده و توسط کولیس دیجیتالی اندازه‌گیری شد.

۲-۶- ارزیابی به روش MIC و MBC

در این آزمون از روش ماکرودایلوشن برات استفاده شد. هریک از نمونه‌های آزمایشی در ۲ میلی‌لیتر محیط مولر هینتون برات (ساخت میکرومدیا مجارستان) حل شده و پس از آن رقت‌های سریال تهیه گردید. به هر یک از لوله‌ها ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اشرشیاکلی معادل ۰/۵ مک فارلند ($10^8 \times 1/5$) اضافه و به این ترتیب مقدار ثابت باکتری تحت تأثیر نمونه‌های آزمایشی قرار گرفت. یک لوله حاوی سوسپانسیون میکروبی که فاقد ماده آزمایشی بود به عنوان شاهد استفاده شد. لوله‌ها در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. در ادامه از مایع داخل هر یک از لوله‌ها به مقدار ۱۰ میکرولیتر در ۱۵ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی رقیق‌سازی و برای شمارش کلنی‌ها به محیط مولر هینتون آگار انتقال داده و توسط آنس استریل بر روی محیط کشت پخش گردید. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. سپس رشد کلنی باکتری مولد اسهال در پلیت بررسی و MIC و MBC نمونه‌های آزمایشی تعیین شدند. غلظتی که ۹۹/۹۹ درصد باکتری‌ها کشته شده بودند به عنوان MBC و لوله شفاف به عنوان MIC انتخاب شد.

subsp 1608 (39392) ATCC, Lactobacillus plantarum 1058 (8014) ATCC, Lactobacillus acidophilus 1643 (20079) DSM, Lactobacillus reuteri 1655 (20016) DSM. در این مطالعه از بره‌های شیرخوار نژاد قزل به عنوان مدل حیوانی استفاده گردید. مجموعاً ۱۹۲ نمونه بالینی اشرشیاکلی از ایستگاه تحقیقاتی خلعت پوشان دانشگاه تبریز در یک دوره تقریباً ۱۰۰ روزه از طریق رکتوم بره‌ها به وسیله سوپ استریل جمع‌آوری گردید. سوپ‌ها مستقیماً در محیط Tryptic Soy Broth (TSB)، ساخت مرک آلمان) قرار داده شدند و در آزمایشگاه بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و سوربیتول مک‌کانکی آگار (ساخت مرک آلمان) حاوی مکمل سفکسیم و تلئوریت به منظور ردیابی اشرشیاکلی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C گرمخانه‌گذاری گردیدند. در نهایت جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی، برای بررسی اثرات ضد میکروبی در محیط مولر هینتون آگار (Mueller Hinton Agar)، ساخت میکرومدیا مجارستان) کشت داده شدند.

۲-۴- بارگذاری نانو ذرات سلنیم در ساختار لاکتوباسیل‌ها

طبق روش پیشنهادی استبنیکوا و همکاران [۱۱] گونه‌های منتخب لاکتوباسیلی به منظور تولید توده سلولی غنی شده با نانو ذرات سلنیم استفاده شدند. بدین صورت که سطوح مختلف گونه‌های لاکتوباسیلی به عنوان مایه تلقیح به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت با دو غلظت نانو ذرات سلنیم در دستگاه انکوباتور شیکردار کشت داده شدند. محیط کشت پایه، ملاس نیشکر استریل با بریکس ۴۰ درصد بود و دیگر اجزای تشکیل دهنده محیط کشت شامل نمک‌های مغذی کلرید روی، کلرید منیزیم، تیامین، کلسیم پانتوتنات، سترات سدیم، سدیم گلوتامات بودند که معمولاً وجود آنها بهبود جذب نانو ذرات سلنیم را به دنبال دارد [۱۱ و ۱۲]. منبع نانو ذرات سلنیم به استناد روش اسمعیلی و همکاران [۱۲] در غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های مشخص به محیط کشت اضافه شد [۱۲] و میزان رشد باکتری‌های لاکتوباسیلی در محیط کشت غنی از نانو ذرات سلنیم به وسیله اندازه‌گیری دانسیته توده گونه‌های لاکتوباسیلی توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۴۰ نانومتر تعیین گردید [۱۱]. در نهایت به منظور اطمینان از نانو ذرات سلنیم جذب شده

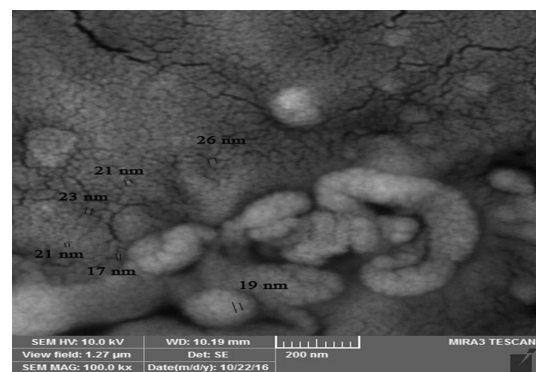
۷-۲- آنالیز آماری

پس از جمع‌آوری داده‌های آزمایشی به منظور بررسی نرمال بودن داده‌های مربوطه از رویه proc univariate استفاده شد. برای آنالیز آماری از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) استفاده گردید. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت.

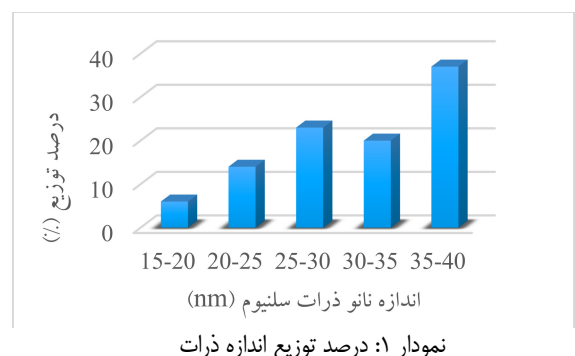
۳- نتایج و بحث

۳-۱- آزمون‌های طیف سنجی

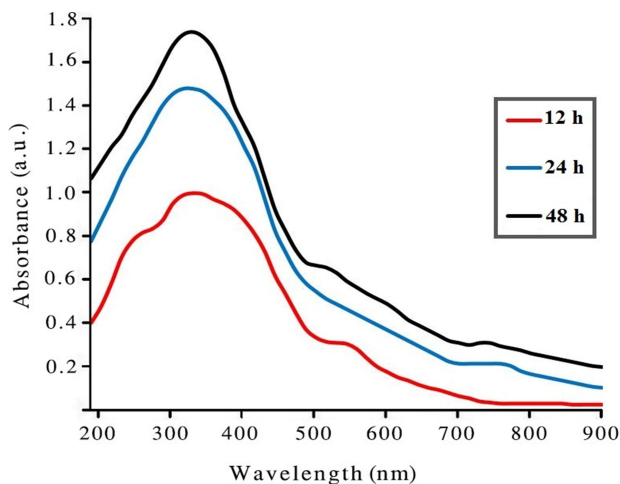
بررسی تغییر رنگ محلول در ساعات مختلف پس از بارگذاری نانو ذره سلنیم حاکی از حضور این عنصر در محیط واکنش بود؛ چرا که رنگ محلول را از زرد روشن به قرمز آجری تغییر داده بود. این امر دلیلی بر باقیماندن ماده در ابعاد نانو می‌باشد [۲ و ۱۶]. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی حاصل از نانو ذرات سلنیم نشان داد که نانو ذره سلنیم حالت کروی با قطری در حدود ۴۵-۱۵ نانومتر داشته و به خوبی پراکنده شده‌اند. تصویر SEM نانو ذره سلنیم در شکل ۱ و توزیع اندازه ذرات در نمودار ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات سلنیم



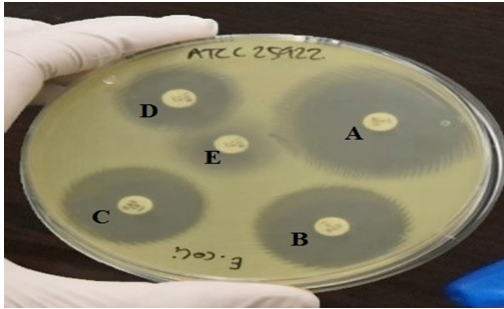
بررسی اسپکتروفوتومتری نانو ذره سلنیم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ بعد از بارگذاری نشان داد که همه طیف‌ها یک پیک جذبی متناوبی در محدوده طول موج ۳۳۷ نانومتر دارند که این موضوع با جذب نوری نانو ذره سلنیم در مطالعات دیگر هم‌خوانی دارد (میشرا و همکاران [۱۴] با ۳۰۰ نانومتر و اینگوله و همکاران [۱۵] با ۳۴۰ نانومتر). (نمودار ۲).



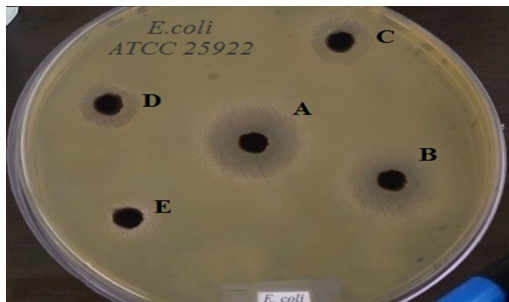
نمودار ۲: بررسی اسپکتروفوتومتر UV-Vis نانو ذره سلنیم در زمان‌های ۱۲، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از بارگذاری

نتایج حاصل از پراش اشعه ایکس حضور ساختار کریستالین نانو ذرات سلنیم را تایید نمود. بدین صورت که حضور حداقل ۴ پیک نانو ذرات سلنیم، نشان دهنده حضور این عنصر در محیط واکنش است [۱۶]. الگوی پیک‌های حاصل از تفرق اشعه ایکس، در نمودار ۳ (بخش الف) نشان داده شده است. گسترش قله پیک‌ها و عرض نسبتاً کم آن‌ها در الگوی XRD، حاکی از درجه بالای کریستالینیتی نانو ذرات می‌باشد [۱۶]. در مطالعه حاضر نیز نتایج بررسی ساختار کریستالی نانو ذرات سلنیم گویای آن بود که ۲ پراش قوی در زوایای $23/1^\circ$ و $29/8^\circ$ مربوط به صفحات کریستالی (100) و (101) و سایر پراش‌های متوسط و ضعیف در زوایای $32/9^\circ$ ، $43/1^\circ$ ، $44/3^\circ$ ، $58/5^\circ$ ، $62/0^\circ$ ، $67/6^\circ$ و $72/7^\circ$ به ترتیب مربوط به صفحات بلوری (110) ، (102) ، (111) ، (201) ، (112) ، (202) ، (210) و (113) است. این امر مطابق با نمونه استاندارد (JCPDS card) با کد مرجع 06-0362 می‌باشد که سنتز صحیح نانو ذرات سلنیم را تأیید می‌کند (نمودار ۳، بخش ب). همچنین این موضوع با یافته‌های حاصل از مطالعه اینگوله و همکاران [۱۵] و لانگی و همکاران [۱۶] هم‌خوانی داشت.

شده مربوط به تیمارهای ذیل می‌باشد: A: نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیلها B: نانو ذرات سلنیم + لاکتوباسیل C: لاکتوباسیل D: نانو ذرات سلنیم E: کنترل آنتی‌بیوتیکی



شکل ۲: نمونه‌ای از ناحیه مهار رشد (روش دیسک)

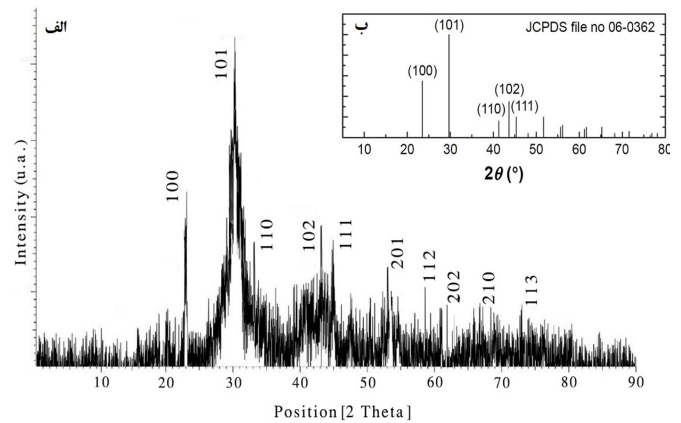


شکل ۳: نمونه‌ای از ناحیه مهار رشد (روش چاهک)

۳-۳- اثر ضد باکتریایی به روش MIC و MBC

تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) تیمارهای آزمایشی روی گونه‌های اشرشیاکلی نشان داد نمونه‌های پیشنهادی به عنوان داروی زیست محیطی ضد اسهال هم در حالت جداگانه و هم در صورت استفاده توأم دارای فعالیت ضد باکتریایی هستند. بدین نحو که تیمار "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیلها" و تیمار تلفیقی "نانو ذرات سلنیم + لاکتوباسیل" در هر دوره آزمایشی از میانگین MIC پایین‌تری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند که نشان دهنده قدرت بالای این مکمل‌ها در جلوگیری از رشد پاتوژن‌های مولد اسهال بود و تفاوت معنی‌داری از این لحاظ با سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$). همچنین بعد از تیمار نانو ذرات سلنیم بیشترین میانگین MIC مربوط به تیمار "لاکتوباسیل" بود (جدول ۴).

طبق نتایج بدست آمده، پایین‌ترین میانگین حداقل غلظت کشندگی باکتریایی (MBC) در موثرترین حالت ترکیبی دو ماده ضد میکروب



نمودار ۳: الگوی پراش اشعه X. الف) نانو ذره سلنیم استفاده شده در مطالعه حاضر (ب) الگوی پراش اشعه X نمونه استاندارد نانو ذره سلنیم (JCPDS card 06-0362)

۳-۲- اثر ضد باکتریایی به روش چاهک و دیسک

نتایج حاصل از روش انتشار چاهک و دیسک در جداول ۲ و ۳ گزارش شده است. یافته‌های به دست آمده در روش چاهک نشان داد در بین تیمارهای آزمایشی "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل" با $23/6$ و $21/46$ میلی‌متر، بیشترین اثر بازدارندگی را به ترتیب روی گونه استاندارد و بالینی اشرشیاکلی داشت. دومین میانگین برای بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به تیمار تلفیقی "نانو ذرات سلنیم + لاکتوباسیل" بود. همچنین علی‌رغم تاثیر مثبت بازدارندگی دو تیمار نانو ذرات سلنیم و لاکتوباسیل تفاوت آماری معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد ($P > 0.05$). با توجه به حدود اطمینان و سطح معنی‌داری در ارتباط با فعالیت ضد میکروبی تیمارهای آزمایشی با $P < 0.05$ می‌توان از درستی آزمون اطمینان حاصل کرد.

نتایج حاصله از روش دیسک در جدول ۳ نشان دهنده اثر بازدارندگی مثبت تمامی تیمارهای مورد آزمایش می‌باشد. "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیلها" با میانگین مهار $23/36$ و $20/30$ میلی‌متر بیشترین اثر و تیمار "نانو ذرات سلنیم" با میانگین مهار $9/18$ و $9/35$ میلی‌متر کمترین اثر بازدارندگی را به ترتیب روی گونه استاندارد و بالینی اشرشیاکلی نشان دادند ($P < 0.05$). میانگین اثر مهارتی تیمار "لاکتوباسیل" و تیمار تلفیقی "نانو ذرات سلنیم + لاکتوباسیل" مشابه هم بوده و تفاوت معنی‌داری نسبت به هم نداشتند ($P > 0.05$). نمونه‌ای از توان ضد باکتریایی نمونه‌های آزمایشی به صورت مشاهده هاله عدم رشد در شکل ۲ و ۳ نشان داده شده است. در هر دو روش حروف نامگذاری

جدول ۲: خاصیت ضد باکتریایی تیمارهای آزمایشی به روش انتشار از چاهک (بر حسب میلی‌متر)

میانگین کل دوره‌ها		آزمایش سوم (ماه سوم)		آزمایش دوم (ماه دوم)		آزمایش اول (ماه اول)		شاهد
E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	
.	لاکتوباسیل
۱۱/۲۳±۰/۹۴ ^c	۱۳/۳±۱/۰۳ ^c	۹/۴	۱۱/۵۶	۱۲/۱۴	۱۳/۲۶	۱۲/۱۵	۱۵/۰۶	نانو ذره سلنیم
۱۰/۳۷±۰/۹۱ ^c	۱۱/۳۶±۰/۸۷ ^{cd}	۸/۱۱	۹/۱۸	۱۲/۳۷	۱۲/۰۹	۱۰/۶۳	۱۲/۸۱	نانو ذره سلنیم + لاکتوباسیل
۱۶/۱۸±۱/۳۲ ^b	۱۹/۲۱±۱/۲۴ ^b	۱۳/۲۴	۱۸/۴۱	۱۸/۰۳	۲۰/۲۱	۱۷/۲۸	۱۹/۰۲	نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها
۲۱/۴۶±۱/۲۸ ^a	۲۳/۶±۱/۴۵ ^a	۲۱/۱	۲۲/۵۷	۱۹/۷۸	۲۴/۳۰	۲۳/۴۹	۲۳/۹۴	

۱- حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد.
۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۳: خاصیت ضد باکتریایی تیمارهای آزمایشی به روش انتشار از دیسک (بر حسب میلی‌متر)

میانگین کل دوره‌ها		آزمایش سوم (ماه سوم)		آزمایش دوم (ماه دوم)		آزمایش اول (ماه اول)		شاهد
E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	
.	لاکتوباسیل
۱۴/۴۳±۱/۱ ^b	۱۵/۳±۱/۱۶ ^{bc}	۱۲/۷۱	۱۳/۶۲	۱۴/۳۴	۱۷/۰۸	۱۶/۲۴	۱۵/۱۹	نانو ذره سلنیم
۹/۱۸±۰/۸۵ ^c	۹/۳۵±۰/۷۹ ^c	۸/۱۳	۱۰/۶۹	۸/۰۳	۹/۱۰	۱۱/۴	۸/۲۷	نانو ذره سلنیم + لاکتوباسیل
۱۵/۳۴±۱/۳ ^b	۱۸/۲۵±۱/۲۴ ^b	۱۴/۰۵	۱۷/۴۴	۱۵/۱۷	۱۹/۰۲	۱۶/۸۲	۱۸/۳۰	نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها
۲۰/۳±۱/۳۷ ^a	۲۳/۳۶±۱/۵۱ ^a	۱۹/۱۰	۲۲/۰۴	۱۸/۱۹	۲۴/۸۸	۲۳/۶۰	۲۳/۱۸	

۱- حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد.
۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۴: میزان MIC تیمارهای آزمایشی بر علیه اشرشیاکلی استاندارد و بالینی (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل
۱۰۹۰/۳۸±۴۱/۶ ^b	۹۳۵/۴۵±۳۹/۳ ^b	۱۲۱۷/۳	۸۶۶/۹۷	۱۰۷۱/۷	۹۶۷/۲	۹۸۲/۱۴	۹۷۲/۱۸	نانو ذره سلنیم
۱۲۴۵/۲±۵۱/۴۵ ^a	۱۰۶۰/۵۶±۴۲/۱ ^a	۱۳۵۷/۲۸	۱۱۲۴/۷۶	۱۲۸۳/۱۷	۹۹۲/۷۱	۱۰۹۵/۱۵	۱۰۶۴/۲۱	نانو ذره سلنیم + لاکتوباسیل
۷۸۰/۲۲±۳۴/۶۸ ^c	۶۱۵/۲۸±۳۱/۲۵ ^c	۹۱۶/۱۹	۷۶۸/۶	۸۴۱/۲۲	۵۷۳/۱	۵۸۳/۲۶	۵۰۴/۴۵	نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها
۷۲۵/۲۷±۲۹/۸ ^c	۵۹۰/۷±۳۴/۵ ^c	۸۳۵/۱۱	۶۹۷/۹۳	۷۹۱/۱۸	۵۳۸/۶۵	۵۴۹/۴۳	۵۳۵/۵۳	

۱- حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد.
۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۵: میزان MBC تیمارهای آزمایشی بر علیه اشرشیاکلی استاندارد و بالینی (بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر)

میانگین		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	E.Coli-Clinical	E.Coli-Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	لاکتوباسیل
۱۸۵۰/۳۳±۶۲/۷۹ ^b	۱۶۷۵/۴۸±۶۱/۴ ^b	۱۹۶۸/۱۷	۱۷۷۲/۳۴	۱۸۷۵/۲	۱۶۳۴/۸۲	۱۷۰۷/۶۲	۱۶۱۹/۳	نانو ذره سلنیم
۲۱۲۵/۶±۶۴/۸۷ ^a	۱۹۱۰/۳۶±۶۴/۳۵ ^a	۲۲۱۵/۶	۲۰۴۰/۵۸	۱۹۸۸/۳۹	۱۸۹۷/۴۴	۲۱۷۲/۸۱	۱۷۹۳/۰۵	نانو ذره سلنیم + لاکتوباسیل
۱۲۶۰/۴۱±۴۹/۲۶ ^c	۱۰۲۵/۵۱±۵۵/۲۸ ^c	۱۳۱۱/۷۸	۱۰۳۸/۱	۱۱۷۴/۲۵	۹۴۰/۸۹	۱۲۹۵/۲	۱۰۹۷/۵۴	نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها
۱۱۹۵/۶۷±۵۰/۳۴ ^c	۹۵۵/۳۲±۴۸/۷ ^c	۱۲۶۲/۷۷	۹۸۳/۱۳	۱۰۹۰/۴۷	۹۰۷/۲۸	۱۲۳۳/۷۵	۹۷۵/۵۶	

۱- حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$). مقایسه میانگین به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد.
۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

همکاران [۵] در مطالعه‌ای مشابه با بررسی اثرات ضد میکروبی پروبیوتیک غنی شده با سلنیم روی باکتری اشرشیاکلی، میانگین ناحیه ممانعت کننده از رشد را برای سویه‌های مختلف لاکتوباسیلی ۱۴/۹۸، ۱۹/۹۱، ۲۲/۱۶ و ۲۴/۱۹ میلی‌متر گزارش کردند. بررسی MIC و MBC در تحقیق حاضر نشان داد که تیمار "نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل" و تیمار تلفیقی "نانو ذرات سلنیم+لاکتوباسیل" پایین‌ترین میانگین‌ها را برای هر دو آزمون فوق داشتند. این امر حاکی از توان بالای این تیمارها در جلوگیری از رشد باکتری مولد اسهال خونی یعنی اشرشیاکلی بود. هلر [۲۱] با استفاده از آزمون بازدارندگی رشد گزارش کرد که اکثریت گونه‌های لاکتوباسیلوس، بخصوص کازئی سبب مهار باکتری‌های اشرشیاکلی انتروهوموراژیک و اشرشیاکلی انتروتوکسیژنیک می‌شود. با نگاهی به میانگین بازدارندگی ترکیبات مختلف ضد میکروبی روی عامل مولد اسهال خونی می‌توان پی برد که حساسیت اشرشیاکلی به ترکیبات فوق در مقایسه با دیگر باکتری‌های بیماری‌زا پایین است. دلیل این امر می‌تواند به این جهت باشد که غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی مانند اشرشیاکلی به طور غالب از لیپوپلی ساکارید مستحکم تشکیل شده است که سد مقاومی در برابر عوامل تخریب‌گر نظیر تمامی داروهای صنعتی محسوب می‌شود [۲۲]. در همین رابطه چانگ و همکاران [۲۳] با تشریح خصوصیات مثبت نانو ذرات، بیان کردند که میزان تجمع بار منفی روی باکتری‌های گرم منفی بیشتر از باکتری‌های گرم مثبت است و بر هم کنش نانو ذرات دارای بار مثبت با دیواره سلولی دارای بار منفی منجر به نشت محتویات درون سلول باکتری می‌گردد. بررسی‌های هی و همکاران [۳] نیز نشان دادند که اختلاف بار منفی سلول باکتری و بار مثبت نانو ذره به صورت یک جاذب الکتروستاتیک عمل کرده و باعث اتصال نانو ذره به سطح سلول شده، در نتیجه با تخریب غشاء سلول باکتری و نشت مواد موجب مرگ سلول می‌شود. قابل توجه است که وقتی ترکیب چند ماده ضد میکروبی همزمان اعمال می‌شود در مقایسه با اثرات فردی آنها، ممکن است پاسخ ضد میکروبی ایجاد شده افزایش یافته و یا بدون تغییر باقی بماند. ترکیبات ضد میکروبی که از یک گروه بوده یا دارای مکانیسم عمل یکسانی باشند، احتمالاً فقط اثر جمع‌پذیر خواهند داشت. ولی ترکیباتی که مکانیسم عمل متفاوت داشته یا محل اثر آنها متفاوت باشد، ممکن است اثر هم‌افزایی یا متضادی

یعنی تیمار نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها و تیمار تلفیقی نانو ذرات سلنیم+لاکتوباسیل با بیشترین هم‌افزایی علیه دو گونه اشرشیاکلی اتفاق افتاد. همچنین بیشترین غلظت کشندگی باکتریایی تیمار مربوط به نانو ذرات سلنیم بود (جدول ۵). بررسی نتایج مربوط به MIC و MBC مشخص کرد که از لحاظ حساسیت بین گونه‌های اشرشیاکلی مورد آزمایش نسبت به تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($P < 0.05$). به عبارتی در تمامی تیمارها بیشترین حساسیت مربوط به گونه استاندارد اشرشیاکلی و کمترین حساسیت متعلق به گونه بالینی آن بود. این امر نشان دهنده آن است که جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی مقاومت بیشتری در برابر ترکیبات پیشنهادی ضد اسهال داشتند.

از ۱۹۲ نمونه جمع‌آوری شده در سه دوره آزمایشی برای اشرشیاکلی، بیماری‌زا بودن ۴۵ نمونه (۲۳ درصد) از آنها به کمک تست‌های حساسیت محرز شد. این مسئله نشان دهنده اهمیت اشرشیاکلی در ایجاد اسهال خونی می‌باشد. نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نشان داد که نانو ذرات سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها قادر هستند از رشد گونه‌های عامل مولد اسهال جلوگیری کنند. در مطالعه‌ای مشابه کاظمی و همکاران [۱۷] با استفاده از روش چاهک و دیسک نشان دادند که گونه‌های مختلف لاکتوباسیلی نظیر سویه‌های استفاده شده در تحقیق حاضر (لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس کازئی) دارای اثر ممانعت‌کنندگی بر علیه عوامل مولد اسهال نظیر اشرشیاکلی هستند. اگانبانو و همکاران [۱۸] نیز با بررسی هاله عدم رشد به روش انتشار چاهک، گزارش کردند که لاکتوباسیلوس پلانتروم با میانگین هاله عدم رشد ۸-۶ میلی‌متری، از رشد اشرشیاکلی جلوگیری می‌کند. شیرازی و همکاران [۱۹] به وسیله اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد، اثر مهار پروبیوتیک لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس را روی گونه استاندارد اشرشیاکلی (ATCC 25922)، ۱۱/۶۶ میلی‌متر تعیین کردند که تا حدودی با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت. دیگر جایگزین دارویی استفاده شده در تحقیق حاضر نانو ذرات سلنیم بود که به دلیل سمیت پایین آن برای سلول‌های میزبان و اختصاصیت بالا برای باکتری‌ها انتخاب شده بود [۴]. ترن و ویستر [۲۰] تاثیر مهار کنندگی بالای نانو ذرات سلنیم بر باکتری‌های بیماری‌زا و سمیت انتخابی بالای آن برای باکتری‌ها را گزارش کردند. یانگ و

باکتری‌های اشرشیاکلی نشان داد. از اینرو به شرط تکرار آزمایش در مطالعات آتی و اطمینان از صحت نتایج بدست آمده و در راستای پیشگیری از اسهال، می‌توان ساخت دارو یا مکمل زیست محیطی با این فرمولاسیون را برای استفاده وسیع توصیه نمود.

مراجع

- [1] H. Hariharan, N. A. Al-Dhabi, P. Karupiah, S. K. Rajaram, "Microbial synthesis of selenium nanocomposite using *Saccharomyces cerevisiae* and its antimicrobial activity against pathogens causing nosocomial infection," *Chalcogenide Letters*, 9, 509-515, 2012.
- [2] D. Medina-Cruz, G. Mi, T. J. Webster, "Synthesis and characterization of biogenic selenium nanoparticles with antimicrobial properties made by *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli*, and *Pseudomonas aeruginosa*," *Journal of Biomedical Materials Research*, 106, 1400-1412, 2018.
- [3] Y. He, S. H. Ingudam, S. Reed, A. Gehring, T. P. Strobaugh, P. Irwin, "Study on the mechanism of antibacterial action of magnesium oxide nanoparticles against foodborne pathogens," *Journal of Nano biotechnology*, 14, 54-63, 2016.
- [4] P. A. Tran, N. O'Brien-Simpson, E. C. Reynolds, N. Pantarat, D. P. Biswas, A. J. O'Connor, "Low cytotoxic trace element selenium nanoparticles and their differential antimicrobial properties against *S. aureus* and *E. coli*," *Nanotechnology*, 27, 1-10, 2016.
- [5] J. Yang, K. Huang, S. H. Qin, X. Wu, Z. Zhao, F. Chen, "Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*," *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 246-254, 2009.

نشان دهند [۲۴]. از اینرو در تحقیق حاضر میانگین بالای تیمارهایی که مواد ضد میکروبی به صورت بارگذاری شده و تلفیقی در آنها استفاده شده بود به واسطه اثر هم‌افزایی قابل توجیه است. همچنین لازم به توضیح است که در تیمار بارگذاری شده، نانو ذرات سلنیم به عنوان جزئی از ساختار باکتری لاکتوباسیل تبدیل شده و به صورت توده لاکتوباسیلی غنی از نانو ذرات سلنیم عمل می‌نماید. از اینرو تیمار بارگذاری شده اثرات هم‌افزایی و ضد میکروبی به مراتب بالایی را نسبت به حالتی که هر دو ماده ضد میکروب با حفظ ساختار خود و فقط به صورت همزمان باهم استفاده می‌گردند (حالت تلفیقی) ایجاد می‌کند. در همین راستا کریتافول و همکاران [۲۵] بیان داشتند که بارگذاری لاکتوباسیل‌ها با مکمل سلنیمی، سمیت مکمل‌های سلنیمی را روی عوامل عفونی به وسیله تغییر دادن شکل آنها و تبدیل به متابولیت‌های سلنیم متیله شده و عنصر سلنیم افزایش می‌دهد و متعاقب آن خاصیت باکتری‌کشی سلنیم را نسبت به زمانی که به صورت جداگانه به کار گرفته می‌شود به چند برابر افزایش می‌دهد. ژانگ و همکاران [۲۶] نیز اظهار داشتند که باکتری‌های مفید پروبیوتیکی به روش داخل سلولی، سلنیم را در خود انباشته کرده و برای بهبود وضعیت سلنیم، به عنوان یک سیستم آزاد کننده سلنیم عمل می‌کنند. در ادامه گونه‌های لاکتوباسیلی بخاطر زنده‌مانی بیشتری که دارند، در طی مواجهه با عوامل عفونی در متابولیسم سلنیم شرکت کرده و با تعدیل متابولیسم آن، خاصیت باکتری‌کشی را به چند برابر افزایش می‌دهند. با علم به موارد ذکر شده می‌توان میانگین بالای تیمار بارگذاری شده نسبت به تیمار تلفیقی را درک کرد. با توجه به اینکه مطالعات علمی کمی در این زمینه صورت گرفته، برای بحث و تفسیر دقیق مکانیسم‌ها لازم است تحقیقات بعدی و مشابه‌ای صورت بگیرد.

۴- نتیجه گیری

آزمون‌های انجام شده نشان دادند که نمونه‌های پیشنهادی به عنوان مکمل زیست محیطی در این تحقیق، توانایی جلوگیری از رشد باکتری عفونی اشرشیاکلی را که به عنوان عامل اصلی مولد اسهال خونی است، دارا می‌باشند. در این میان تیمار نانو ذره سلنیم بارگذاری شده در لاکتوباسیل‌ها نسبت به سایر تیمارها اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای روی هر دو گونه استاندارد و بالینی

- [13] Y. Hongfei, F. Gongjian, G. Zhenxin, "Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM)," *LWT Food Science and Technology*, 43, 666-669, 2010.
- [14] R. R. Mishra, S. Prajapati, J. Das, T. K. Dangar, N. Das, H. Thatoi, "Reduction of selenite to red elemental selenium by moderately halotolerant *Bacillus megaterium* strains isolated from Bhitarkanika mangrove soil and characterization of reduced product," *Chemosphere*, 84, 1231-1237, 2011.
- [15] A. R. Ingole, S. R. Thakare, N. T. Khati, A. V. Wankhade, D. K. Burghate, "Green synthesis of selenium nanoparticles under ambient condition," *Chalcogenide Letters*, 7, 485-489, 2010.
- [16] B. Langi, C. Shah, K. Singh, A. Chaskar, M. Kumar, P. N. Bajaj, "Ionic liquid-induced synthesis of selenium nanoparticles," *Materials Research Bulletin*, 45, :668-671, 2010.
- [17] R. Kazemi, N. Ghaemi, M. S. Mirpor, "Study of antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from probiotic products," *Journal of Microbial Biotechnology of Islamic Azad University*, 7, 29-36, 2011.
- [18] S. T. Ogunbanwo, A. I. Sanni, A. A. Onilude, "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1," *African Journal of Biotechnology*, 2, 219-227, 2003.
- [19] L. Shirazi, M. M. Soltan-dalal, M. Rahnema, "Study of antimicrobial activity of *L. reuteri* and *L. acidophilus* on some pathogens of *Enterobacteriaceae*," *Journal of Microbial Biotechnology of Islamic Azad University*, 3, 29-34, 2011.
- [6] S. Cheraghi-Saray, A. Hosseinkhani, H. Janmohammadi, P. Zare, H. Daghighkia, "Thermal and probiotic treatment effects on restaurant waste for incorporation into poultry diet," *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*, 3, 1-7, 2014.
- [7] T. Asahara, K. Nomoto, M. Watanuki, T. Yokokura, "Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection," *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1751-1760, 2001.
- [8] W. H. De-Jong, P. J. Borm, "Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards," *International Journal of Nanomedicine*, 3, 133-149, 2005.
- [9] H. Kamada, I. Nonaka, Y. Ueda, M. Murai, "Selenium addition to colostrum increase immunoglobulin G absorption by newborn calves," *Journal of Dairy Science*, 90, 5665-5670, 2007.
- [10] L. C. Sakoda, B. I. Graubard, A. A. Evans, W. T. London, W. Y. Lin, F. M. Shen, K. A. McGlynn, "Toenail selenium and risk of hepatocellular carcinoma mortality in Haimen City China," *International Journal of Cancer*, 115, 618-624, 2005.
- [11] O. Stabnikova, V. Ivanov, I. Larionova, J. Lewis, "Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast," *LWT-Food Science and Technology*, 41, 890-895, 2008.
- [12] S. Esmaeili, K. Khosravi-Darani, R. Pourahmad, L. Nazemi, R. Komeili, "Production of selenium-enriched yeast using a Plackett-Burman design," *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, 7, 27-36, 2012.

- [20] P. A. Tran, T. J. Webster, "Selenium nanoparticles inhibit *Staphylococcus aureus* growth," *International Journal of Nanomedicine*, 6, 1553-1558, 2011.
- [21] K. J. Heller, "Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms," *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 374-379, 2001.
- [22] E. Hoseinzadeh, M. Y. Alikhani, M. R. Samarghandy, "Evaluation of synergistic effect of commercial zinc oxide and copper oxide nanoparticles against gram positive and gram negative bacteria by fraction Inhibitory concentration index," *Journal of Zanjan University of Medical Sciences*, 20, 29-41, 2012.
- [23] Y. C. Chung, Y. P. Su, C. C. Chen, G. Jia, H. I. Wang, J. G. Wu, J. G. Lin, "Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall," *Acta Pharmacologica Sinica*, 25, 932-936, 2004.
- [24] A. Bell, "Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance," *FEMS Microbiology Letters*, 253, 171-184, 2005.
- [25] W. Krittaphol, P. A. Wescombe, C. D. Thomson, A. McDowell, J. R. Tagg, J. P. Fawcett, "Metabolism of L-selenomethionine and selenite by probiotic bacteria: in vitro and in vivo studies," *Biological Trace Element Research*, 144, 1358-1369, 2011.
- [26] B. Zhang, K. Zhou, J. Zhang, Q. Chen, G. Liu, N. Shang, W. Qin, P. Li, F. Lin, "Accumulation and species distribution of selenium in Se-enriched bacterial cells of the *Bifidobacterium animalis* 01," *Food Chemistry*, 115, 727-734, 2009.



Nano-Selenium Loading on Structure of Lactobacillus and Evaluating its Antimicrobial Potency to Make Anti-Diarrhea Drug-Supplement

S. Cheraghi Saray¹, A. Hosseinkhani^{1*}, A. Taghizadeh¹, H. Mohammadzadeh¹, H. Hamishehkar²

¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz

²Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz

Abstract: Escherichia coli (E.coli) is the most important species that causes dysentery. Present study was conducted to investigate the synergistic antimicrobial effects of Nano-selenium and lactobacillus on E.coli to suggest anti-diarrhea bio-drug. The antimicrobial effects of experimental treatments against E.coli were evaluated by disk diffusion and well diffusion methods as a measure of the growth inhibition zone. Moreover, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by micro-dilution method. The results of the well and disk diffusion methods showed that in both tests, the highest growth inhibition zone of the "Nano selenium-loaded lactobacillus" treatment on the standard strain of E.coli was 23/6 and 23/36 mm respectively. The results of MIC and MBC determination showed that in all experimental periods, "Nano selenium-loaded lactobacillus" and "Nano-selenium + lactobacillus" treatments with 590/7 and 615/38 µg/ml for MIC and 955/32 and 1195/67 µg/ml for MBC had the lowest amounts compared to other treatments (P<0.05). The results of this experiment confirmed the anti-diarrhea ability of "Nano selenium-loaded lactobacillus" treatment. Therefore, provided that this test be repeated in future studies and ensured the accuracy of these results, manufacturing of bio-drug with this formulation may be advised for prevention or treatment of diarrheal disease.

Keywords: Nano-Selenium Particle, Lactobacillus, Antimicrobial, Escherichia coli.