

اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس جداسازی شده از دوغ کفیر بومی اصفهان بر روی پاتوژن‌های دهانی

خاطره سادات اختراعی^۱، فرخنده پورسینا^۱، آرزو میرزائی^۲، محمد صادق دماوندی^۳، ته‌مینا نریمانی^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری‌های دهان و دندان، از جمله بیماری‌های شایع می‌باشد که استرپتوکوکوس موتانس و پورفیروموناس تریئریوالیس، نقش مؤثری در آن دارند. به دنبال عفونت‌های ایجاد شده توسط این باکتری‌ها، نیاز به مصرف آنتی‌بیوتیک می‌باشد. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها برای کاهش باکتری‌های بیماری‌زای حفره‌ی دهانی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌بیوتیک‌ها، مورد بررسی قرار گرفته است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر پروبیوتیک‌های جداسازی شده از دوغ کفیر بومی بر روی دو عامل اصلی پوسیدگی دندان می‌باشد.

روش‌ها: دو گونه‌ی شایع لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس با کمک تکنیک‌های میکروبی‌شناسی از دوغ‌های کفیر موجود در اصفهان جدا و شناسایی شد. اثر ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها بر استرپتوکوکوس موتانس (ATCC 35668) و پورفیروموناس تریئریوالیس (ATCC3227) با روش چاهک‌گذاری و Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت و سپس شناسایی ترکیبات موجود در مایع رویی کشت (سوپرناتانت) آن‌ها، توسط کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) صورت گرفت.

یافته‌ها: در این مطالعه، لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس، اثر ضد میکروبی قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد استرپتوکوکوس موتانس و پورفیروموناس تریئریوالیس داشتند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیان ژن *gtfB* را ۰/۰۰۱ Fold change و بیان ژن *brpA* را ۰/۰۰۷ Fold change کاهش داد. همچنین لاکتوباسیلوس رامنوزوس بیان ژن *gtfB* را ۰/۰۱ Fold change و بیان ژن *brpA* را ۰/۰۴ Fold change کاهش داد. همچنین انجام GC-MS وجود از مشتقات پیرولیدیون، فورانون، بنزوئیک اسید، ایکوزان، نونادکان را در سوپرناتانت حاصل از پروبیوتیک‌ها مورد آزمایش نشان داد.

نتیجه‌گیری: با توجه به اثر پروبیوتیک‌های موجود در دوغ کفیر بومی، می‌توان با مصرف روزانه‌ی نوشیدنی‌های پروبیوتیک به پیشگیری از پوسیدگی‌های دندانی کمک کرد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک؛ کفیر؛ استرپتوکوکوس موتانس؛ پورفیروموناس تریئریوالیس؛ ریل تایم پی‌سی‌آر

ارجاع: اختراعی خاطره سادات، پورسینا فرخنده، میرزائی آرزو، دماوندی محمد صادق، نریمانی ته‌مینا. اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس جداسازی شده از دوغ کفیر بومی اصفهان بر روی پاتوژن‌های دهانی. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۴۰۲؛ ۴۱ (۷۱۷):

۲۹۸-۳۰۵

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که در صورت مصرف به میزان کافی، تأثیرات سودمندی بر روی رشد میزبان خود دارند. امروزه استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان روشی جدید در پیشگیری از پوسیدگی دندان مطرح می‌باشد (۳). باکتری‌های اسید لاکتیک مهم ترین گروه از میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک شناخته شده‌اند و در این میان جنس لاکتوباسیلوس به عنوان متداول‌ترین ارگانیسم به کار رفته در تولید محصولات

مقدمه

عفونت‌های دهان و دندان، از جمله شایع‌ترین عفونت‌های انسانی در سراسر جهان می‌باشد (۱). طبق گزارشی در سال ۲۰۱۹، برآورد شده است که نیمی از جمعیت جهان، حدود ۳/۵۸ میلیارد نفر در بزرگسالان و ۴۸۶ میلیون نفر در کودکان مبتلا به پوسیدگی دندان هستند (۲). طبق تعاریف سازمان بهداشت جهانی (WHO (World Health Organization) و FAO (Food and Agriculture Organization) در سال ۲۰۰۲

۱- کارشناسی ارشد میکروبی‌شناسی پزشکی، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- دانشجوی دکتری تخصصی باکتری‌شناسی پزشکی، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

نویسنده‌ی مسؤول: ته‌مینا نریمانی: استادیار، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: narimani@med.mui.ac.ir

رشد در دماهای ۱۰، ۱۵ و ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و رشد در Ph‌های مختلف صورت گرفت (۹، ۱۰). باکتری‌هایی که به عنوان لاکتوباسیلوس شناسایی شدند در محیط کشت MRS مایع با ۲۵ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۱، ۱۲). همچنین دو سویه‌ی استاندارد استرپتوکوکوس موتانس (ATCC35668) و پورفیروموناس ژینتریوالیس (ATCC32277) به ترتیب از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و گروه باکتری و ویروس‌شناسی دانشکده‌ی پزشکی اصفهان تهیه و کشت داده شد.

استخراج DNA و انجام PCR جهت تعیین گونه:

استخراج DNA با استفاده از کشت خالص تازه‌ی باکتری و روش جوشاندن صورت گرفت. برای تعیین کیفیت DNA‌های استخراج شده علاوه بر کنترل کمی نمونه با استفاده از نانودراپ-اسپکترومتر، نمونه‌های DNA روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و سپس در فریزر ۲۰°C- تا مراحل بعدی نگهداری شد (۱۳). جهت انجام PCR ژن *I6srRNA* از پرایمر رفت $CTCAAACTAAACAAAGTTTC$ و پرایمر برگشت $CTTGACACACCGCCCGTCA$ (برای شناسایی جنس لاکتوباسیلوس) استفاده شد (۱۴) و برای شناسایی جدایه‌های لاکتوباسیلوس پلاتناروم از پرایمرهای رفت $CGAGACAGCAATTCCTGCACTCG$ و برگشت $CCTCAGAAACAGTCCGGTTGA$ استفاده گردید. همچنین برای تشخیص جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوزوس از پرایمر رفت $ATTTAACCGCAAGTGGCAGC$ و پرایمر برگشت $AAATTGTGTGAACCGGCGTA$ استفاده شد (۱۵). برای انجام PCR، مواد لازم بدین شرح استفاده شد: DNA الگو (۱ μl)، آب مقطر (۱۵ μl)، Master mix (۸ μl)، پرایمر رفت (۰/۵ μl) و پرایمر برگشت (۰/۵ μl). در ادامه جهت انجام PCR (Polymerase chain reaction)، برنامه‌ی زیر به دستگاه داده شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴°C به مدت ۱ دقیقه، ۳۰ سیکل که شامل دناتوراسیون در دمای ۹۴°C به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶°C به مدت ۱ دقیقه برای ژن *I6srRNA* و دمای ۵۴°C به مدت ۱ دقیقه برای ژن *apbE2* (تشخیص جنس لاکتوباسیلوس پلانترام)، دمای ۵۳°C برای ژن *aeS* (تشخیص جنس لاکتوباسیلوس رامنوزوس)، گسترش در دمای ۷۲°C به مدت ۱ دقیقه و در انتها گسترش نهایی در دمای ۷۲°C به مدت ۱۲ دقیقه بود.

بررسی ترکیبات حاصل از کشت باکتری با استفاده از

Gas chromatography-mass spectrometry. پس از کشت ۴۸ ساعته‌ی پروبیوتیک‌ها بر روی MRS agar، چند کلنی برداشته و

پروبیوتیکی مطرح می‌باشد (۴). شواهد مربوط به نقش باکتری‌ها به ویژه استرپتوکوک موتانس و پورفیروموناس ژینتریوالیس در ایجاد پوسیدگی و تولید بیوفیلم، روز به روز در حال افزایش می‌باشد، بنابراین کاهش تعداد این باکتری‌ها در محیط دهان به پیشگیری از پوسیدگی دندان‌ی کمک می‌کند (۵، ۶). استرپتوکوک موتانس و البته برخی دیگر از استرپتوکوک‌ها، قندها به ویژه ساکارز را مصرف کرده و با کمک آنزیم‌های GTF-I (Glycosyltransferase) و Fructosyltransferase آن‌ها را به گلوکوز و فروکتوز هیدرولیز نموده و تولید پلیمرهای خارج سلولی (Exopolysaccharides) می‌کند. ژن *gtfB* در مراحل ابتدایی سنتز گلوکان از ساکارز دخالت دارد. این توانایی باعث شده این باکتری از مهم‌ترین عوامل ایجاد پوسیدگی در پلاک‌های دندان‌ی باشد (۶). از دیگر فاکتورهای ویرولان، ژن پروتئین تنظیم‌کننده‌ی بیوفیلم (*brpA*) است که در تولید بیوفیلم، تقسیم سلولی، اتولیز، تنظیم میزان تحمل به اسید و اکسیداتیو دخیل نقش دارد. از طرفی پروبیوتیک‌ها، با دارا بودن مکانیسم‌های مختلفی همچون ترشح مواد ضد میکروبی، اثرات آنتاگونیستی با پاتوژن‌ها و غیره می‌تواند نقش مؤثری در پیشگیری و درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های مرتبط با دهان و دندان داشته باشد (۷). از این‌رو بر آن شدیم تا با استفاده از سنجش اثر پروبیوتیک‌های مورد مطالعه تولید فرآورده‌ی اولیه‌ی مطلوب برای کنترل پوسیدگی را پیگیری نماییم.

روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر از نوع تجربی (مقطعی - توصیفی) بوده و جامعه‌ی هدف، باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس، لاکتوباسیلوس پلانترام، لاکتوباسیلوس رامنوزوس و پورفیروموناس ژینتریوالیس بود. در این مطالعه، دوغ‌های کفیر محلی، قارچ کفیر محلی مورد بررسی قرار گرفت و دوغ‌های کفیر کارخانه از مطالعه خارج شد.

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها:

۱۰ نمونه‌ی مختلف از دوغ کفیر بومی موجود در اصفهان خریداری و از آن رقت‌های یک‌دهم تا یک صد هزارم با استفاده از PBS (Phosphate buffer saline) تهیه شد. از هر رقت، ۱ میلی‌لیتر در محیط کشت MRS آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. کلنی‌ها با مورفولوژی‌های متفاوت جداسازی و روی محیط کشت MRS آگار خالص سازی شد و از انجام آزمون‌های تأییدی و بیوشیمیایی بر روی آن‌ها، نهایتاً لاکتوباسیلوس پلانترام و لاکتوباسیلوس رامنوزوس جدا شد (۸).

شناسایی سویه‌ها به روش فنوتایپی: شناسایی سویه‌های لاکتو

باسیل، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست تخمیر قند،

موتانس کشت شده روی محیط بلاد آگار، با استفاده از سرم فیزیولوژی سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولر هیتون آگار کامل شده با ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفند کشت داده شد. بعد از گذشت ۱۰ دقیقه، به کمک قسمت انتهایی یک پی پت پاستور استریل چاهک‌هایی در محیط ایجاد شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون لاکتوباسیلوس پلانتراروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس که هر یک از آن‌ها دارای غلظتی معادل نیم مک فارلند بود به صورت جداگانه به هر چاهک اضافه شد. در ضمن از سوپرناتانت باکتری (قبلاً روش تهیه آن توضیح داد شد) هم به یکی از چاهک‌ها اضافه گردید. از آنتی بیوتیک پنی سیلین به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شدند و قطر هاله‌ی عدم رشد بعد از این مدت اندازه‌گیری گردید (۲۱).

بررسی اثر لاکتوباسیل‌های جدا شده بر ممانعت از رشد

پورفیروموناس ژینژیوالیس به روش چاهک‌گذاری: برای بررسی اثر لاکتوباسیلوس‌های مذکور بر روی پورفیروموناس ژینژیوالیس به روش چاهک‌گذاری، همه‌ی مراحل مشابه روش ذکر شده در مورد استرپتوکوکوس موتانس، انجام گرفت با این تفاوت که محیط کشت مخصوص پورفیروموناس بکار گرفته شد. همچنین از آنتی بیوتیک مترونیدازول به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در شرایط بی‌هوازی، انکوبه شدند و قطر هاله‌ی عدم رشد بعد از این مدت اندازه‌گیری شد (۲۲).

بررسی اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس پلانتراروم و لاکتوباسیلوس

رامنوزوس بر روی تولید بیوفیلم ناشی از استرپتوکوک موتانس: از کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته استرپتوکوک موتانس در TSB کدورتی معادل نیم مک فارلند تهیه شد. از کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته لاکتوباسیلوس پلانتراروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس در MRS برات در شرایط بی‌هوازی سوسپانسیون آماده شد و از سوپرناتانت آن‌ها (که قبلاً روش تهیه‌ی آن توضیح داده شد) در چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه به نسبت ۱:۱۰ رقیق‌سازی شد. ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون استرپتوکوکوس موتانس به هر یک از چاهک‌ها انتقال داده شد و در انکوباتور به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه انکوبه شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون سوسپانسیون‌های رویی خارج شد و چاهک‌ها طبق پروتکل به کار رفته در روش Bhusan و Chachr با کریستال یوله رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه الیزا ریدر OD نمونه‌ها خوانده شد (۵، ۱۷).

بررسی اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس پلانتراروم و لاکتوباسیلوس

رامنوزوس بر روی تولید بیوفیلم ناشی از پورفیروموناس ژینژیوالیس: برای بررسی اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس‌های مذکور بر روی پورفیروموناس ژینژیوالیس، همه‌ی مراحل طبق مرحله‌ی که در مورد استرپتوکوکوس موتانس گفته شد، انجام گرفت منتهی با در نظر

به محیط MRS broth منتقل کرده پس از ۴۸ ساعت سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. سپس فاز رویی را با نسبت ۱:۱ با اتیل استات مخلوط کرده و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور شیکردار قرار دادیم، فاز رویی حاوی اتیل استات توسط دکانتور جدا شده و برای ارزیابی ترکیبات مختلف جهت انجام GC-MS استفاده گردید (۱۸). برای شناسایی مواد استخراجی، ۱ میکرولیتر از نمونه به دستگاه مدل (MS:5975C GC:7890A)، نوع و ابعاد ستون با مشخصات (DB5/30m×250µm×0.25µm) تزریق گردید. شناسایی طیف‌های جرمی از طریق مقایسه با طیف‌های پایه موجود در بانک اطلاعاتی رایانه دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی (GC-MS) و منابع کتابخانه‌ای که به صورت الکترونیکی در دسترس هستند انجام شد (۱۸).

تعیین کم‌ترین غلظت مهارى رشد (Minimum Inhibitory

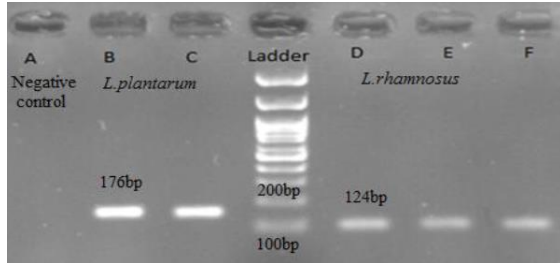
Concentration) MIC برای تعیین MIC، ابتدا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت مایع حاوی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رشد یافته را به پلیت‌های شیشه‌ای منتقل کرده، ۲۴ ساعت درون انکوباتور ۴۲ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس پودر خشک شده را وزن کرده و از آن برای انجام MIC استفاده گردید. درون چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه‌ای، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هیتون ریخته شد. سپس سوسپانسیون حاوی ۱۰ mg/ml از پودر خشک شده‌ی هر یک از لاکتوباسیلوس‌ها را تهیه کرده و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به چاهک اول اضافه شد و سری رقت از آن تهیه گردید. به طوری که رقت‌های ۵ mg/ml - ۰/۰۷۸ در چاهک‌ها تعیین شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون سویه استرپتوکوکوس موتانس رشد یافته در محیط مولر هیتون برات با رقت $10^6 \times 0/5$ cfu/ml به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌های ۹۶ خانه‌ای حاوی استرپتوکوکوس موتانس و مایع رویی لاکتوباسیلوس در انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. جهت بررسی و تعیین MIC پورفیروموناس ژینژیوالیس، سوسپانسیون پورفیروموناس ژینژیوالیس رشد یافته در محیط BHI برات غنی شده با ویتامین K₁ و همین، با غلظت معادل ۱ مک فارلند تهیه شد و به چاهک‌های حاوی رقت‌های مختلف از لاکتوباسیلوس‌ها (۵ mg/ml - ۰/۰۷۸) اضافه شد، سپس پلیت‌ها در شرایط بی‌هوازی و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گذاشته شد (۱۱).

پس از طی زمان گرم‌گذاری، میزان رشد سویه‌های بیماری‌زا بر اساس تعیین کدورت چاهک‌ها با استفاده از الیزا ریدر با جذب ۶۲۰ نانومتر ارزیابی شد (۱۶).

بررسی اثر لاکتوباسیل‌های جدا شده بر ممانعت از رشد

استرپتوکوکوس موتانس به روش چاهک‌گذاری: از استرپتوکوکوس

رامنوزوس وجود دارد، به طوری که چندین ترکیب به صورت مشترک در هر دو گونه لاکتوباسیلوس مشاهده شد که عبارتند از: مشتقات پیرولیدیون، فورانون، بنزوئیک اسید، ایکوزان، نونادکان.



شکل ۱. محصول PCR استخراج شده از دو گونه لاکتوباسیلوس بر روی ژل آگارز ۱٪

A: کنترل منفی / چاهک B و C لاکتوباسیلوس پلانتاروم باند ۱۷۶ bp / چاهک D, E, F لاکتوباسیلوس رامنوزوس باند ۱۲۴bp

نتایج فعالیت ضد میکروبی سویه‌های لاکتوباسیلوس به روش

چاهک گذاری: بر اساس نتایج سویه‌های لاکتوباسیلوس مورد مطالعه در غلظتی معادل نیم مک فارلند هاله عدم رشد را علیه استرپتوکوکوس موتانس و پورفیروموناس ژیترئیوالیس ایجاد کردند. با توجه به نتایج به دست آمده هر دو جدایه‌ی لاکتوباسیلوس اثر مهارتی بر روی پاتوژن‌های بیماری‌زا داشتند، اگرچه قدرت آن‌ها در مقایسه با آن‌تی‌بیوتیک کمتر بود، همچنین لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیشترین هاله‌ی عدم رشد را در هر دو جنس باکتری نشان داد (جدول ۱).

جدول ۱. نتایج میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد لاکتوباسیل‌های مورد مطالعه

لاکتوباسیلوس مورد آزمایش	سویه‌ی بیماری‌زا	میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد (mm)
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	استرپتوکوکوس موتانس	۱۳
لاکتوباسیلوس پلانتاروم	پورفیروموناس ژیترئیوالیس	۱۴/۰۶
لاکتوباسیلوس رامنوزوس	استرپتوکوکوس موتانس	۱۲/۲۰
لاکتوباسیلوس رامنوزوس	پورفیروموناس ژیترئیوالیس	۱۳/۶۰

نتایج حاصل از روش MIC لاکتوباسیلوس پلانتاروم و

لاکتوباسیلوس رامنوزوس هر دو به یک میزان اثر مهارتی بر روی باکتری‌های پاتوژن داشتند به طوری که در غلظت‌های مختلف تهیه شده از جدایه‌های لاکتوباسیلوس جدا شده از دوغ کفیر، مشاهده شد که غلظت‌های ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر دارای اثر ممانعت از رشد بر استرپتوکوکوس موتانس و غلظت‌های ۵ میلی گرم بر میلی لیتر اثر ممانعت از رشد بر پورفیروموناس ژیترئیوالیس داشته باشد.

گرفتن شرایط و محیط کشت مخصوص پورفیروموناس که قبلاً به آن اشاره شده است (۱۸).

ارزیابی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس بر بیان فاکتورهای ویروالانس *gtfB* و *brpA* در استرپتوکوکوس موتانس با روش Real Time PCR بیان فاکتورهای ویروالانس *gtfB* و *brpA* در حضور جدایه‌های لاکتوباسیلوس، با کمک پروتکل کیت استخراج RNA و سنتز cDNA پارس توس و روش Real time PCR ارزیابی شد.

تهیه‌ی پرایمر: سه نوع پرایمر ژن‌های *J6srRNA*، *gtfB* و *brpA* از شرکت ژن فناورن سفارش داده شد.

پرایمر رفت شامل ATGTTGGGTTAAGTCCCG و پرایمر برگشت CTAGCGATTCCRRCTCA برای ژن *J6srRNA* مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). برای ژن *gtfB*، پرایمر رفت ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA و پرایمر برگشت AGCAATGCAGCCAATCTACAA (۲۰) و برای ژن *brpA* پرایمر رفت CGTGAGGTCATCAGCAAGGTC و پرایمر برگشت CGCTGTACCCCAAAAGTTTAGG می‌باشد (۲۱).

واکنش Real-time PCR توسط SYBR green PCR Master Mix انجام گرفت. مواد مورد نیاز برای واکنش PCR عبارت است از: (۱۰ μl) Master 2x SYBR green، (۱ μl) Mgcl2، (۰/۵ μl) پرایمر رفت، (۰/۵ μl) پرایمر برگشت، cDNA (۵ μl) و آب مقطر. تیوب‌های مخصوص در دستگاه Real time PCR قرار داده و دستگاه run شد. برنامه‌ی دستگاه به این صورت بود که دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، ۴۰ سیکل که شامل دناتوراسیون در دمای ۹۵ به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن *brpA* دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن *gtfB*، دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی گراد برای ژن *gtfB*، گسترش در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در انتها گسترش نهایی در دمای ۶۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود (۱۹-۲۱).

یافته‌ها

کیفیت، کمیت و خلوص DNA توسط الکتروفورز روی ژل آگارز و استفاده از دستگاه نانودراپ مورد سنجش قرار گرفت. همانطور که در شکل زیر نشان داده شده است، ۹ باند شارپ محصول PCR در الکتروفورز آگارز مشاهده می‌شود (شکل ۱).

آنالیز ترکیبات شیمیایی استخراج شده: نتایج مربوط به کروماتوگرام‌های GC/MS نشان داد که ۲۰ ترکیب شیمیایی در لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ۱۷ ترکیب شیمیایی در لاکتوباسیلوس

متوعی در گونه‌های مختلف کفیر یافت شده‌اند، بنابراین می‌توان انتظار داشت که انواع مختلف کفیر اثر مهارکنندگی بر رشد *استرپتوکوکوس موتانس* داشته باشند (۲۲). اما در این مطالعه، علاوه بر جداسازی لاکتوباسیل‌ها از دوغ‌های کفیر محلی منطقه‌ی اصفهان، اثر آن را بر پورفیروموناس *ژنژیوالیس* مورد بررسی قرار گرفت که مطالعات کمی از اثر پروبیوتیک‌ها بر روی باکتری‌های بی‌هوازی صورت گرفته است. نتایج این تحقیق نشان داد، اثر جدایه‌های پروبیوتیکی در این مطالعه بر روی باکتری‌های بی‌هوازی پاتوژن چون پورفیروموناس *ژنژیوالیس* کمتر از اثر آن بر روی پاتوژن هوازی اختیاری چون *استرپتوکوکوس موتانس* نمی‌باشد.

جدول ۳. نتایج حاصل از اثر مهارتی لاکتوباسیلوس رامنوزوس بر بیان

ژن‌های مذکور

ژن	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Fold change
<i>brpA</i>	$2^{-4.45}$	۰/۰۴
<i>gtfB</i>	$2^{-6.15}$	۰/۰۱

از طرفی بعضی از پروبیوتیک‌ها محصولات ثانویه‌ای تولید می‌کنند. این محصولات بیولوژیکی گروه گسترده‌ای از ترکیبات ارگانیکی هستند که می‌تواند به عنوان دارو، مواد شیمیایی، چاشنی، آنتی‌اکسیدان، آنتی‌میکروبی، و غیره کاربرد داشته باشد. این ترکیبات قادر هستند از اتصال پاتوژن‌ها به سطوح سخت یا جایگاه عفونت ممانعت به عمل آورند. با انجام آزمایش کروماتوگرافی مایع مشخص شد که جدایه‌های لاکتوباسیل این مطالعه هم توانایی تولید یکسری ترکیبات ضد میکروبیال را داشت.

طبق گزارشات Tan و همکاران در سال ۲۰۲۰، آنالیز ترکیبات شیمیایی موجود در سوپرناتانت کشت لاکتوباسیلوس پلانترام و لاکتوباسیلوس برویس صورت گرفت که ۹۰ ترکیب ضد میکروبی شناسایی شد که از بین آن‌ها چندین ترکیب بنزوئیک اسید، پیرلیدیون، نونادکان، ایکوزان با نتایج حاصل از مطالعات ما همخوانی داشت (۲۳). آنالیز ترکیبات شیمیایی استخراج شده هر دو گونه لاکتوباسیلوس در مطالعه‌ی ما توسط کتابخانه‌ی الکترونیکی دستگاه کروماتوگرافی گاز مایع صورت گرفت و نتایج نشان داد از میان ترکیبات شناسایی شده در لاکتوباسیلوس پلانترام، ۱۴ ترکیب و در لاکتوباسیلوس رامنوزوس نیز ۱۱ ترکیب دارای خاصیت ضد میکروبی بودند. مقایسه‌ی این ترکیبات نشان داد که چندین ترکیب به صورت مشترک در هر دو گونه‌ی لاکتوباسیلوس وجود دارد که عبارتند از: مشتقات پیرلیدیون، فورانون، بنزوئیک اسید، ایکوزان، نونادکان. البته برای روشن شدن مکانیسم اثر ضد میکروبیال

بررسی اثر سوپرناتانت‌های مورد مطالعه بر قدرت اتصال و

تشکیل بیوفیلم *استرپتوکوک* به روش میکروتیتر پلایت: هر ۱۰ سوپرناتانت تهیه شده از جدایه‌ها، در غلظت‌های یک تا 10^{-7} اثر کاهشی بر روی تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های بیماری‌زا داشتند. به طوری که در حضور غلظت ۱ تا 10^{-3} از سوپرناتانت‌ها بیوفیلم قوی، در غلظت 10^{-3} تا 10^{-6} بیوفیلم متوسط و در غلظت 10^{-7} بیوفیلم ضعیف‌تری توسط پاتوژن‌های مورد استفاده تشکیل شد.

نتایج مقایسه‌ی اثر مهارتی پروبیوتیک‌ها به روش *Real-time PCR*

نتایج نشان داد به طور میانگین هر دو پروبیوتیک مورد مطالعه، بیان ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم *استرپتوکوکوس موتانس* را کاهش دادند به طوری که لاکتوباسیلوس پلانترام اثر کاهشی بیشتری بر بیان دو ژن *brpA* و *gtfB* نسبت به لاکتوباسیلوس رامنوزوس داشت. از طرفی هر دو پروبیوتیک مورد مطالعه تأثیر کاهشی بیشتری بر بیان ژن *gtfB* نسبت به بیان ژن *brpA* داشتند لاکتوباسیلوس پلانترام بیان ژن *gtfB* را Fold change (چند برابر) ۰/۰۰۱ و بیان ژن *brpA* را Fold change ۰/۰۰۷ کاهش داد، همچنین لاکتوباسیلوس رامنوزوس بیان ژن *gtfB* را Fold change ۰/۰۱ و بیان ژن *brpA* را Fold change ۰/۰۴ کاهش داد (جدول ۲، ۳).

جدول ۲. نتایج حاصل از اثر مهارتی لاکتوباسیلوس پلانترام بر بیان

ژن‌های مذکور

ژن	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Fold change
<i>brpA</i>	$2^{-4.7}$	۰/۰۰۷
<i>gtfB</i>	$2^{-2.9}$	۰/۰۰۱

بحث

تنوع باکتری‌های اسید لاکتیک در محصولات غذایی مختلف و در شرایط جغرافیایی گوناگون زیاد است. این تنوع در محصولات لبنی تولید شده در دنیا نیز بسیار پیچیده و بالا است از طرفی با توجه به اینکه جزئیات کاملی در زمینه‌ی جداسازی باکتری‌های اسید لاکتیک از دوغ‌های کفیر محلی وجود نداشت، بنابراین مطالعات و بررسی برای شناسایی دو گونه‌ی شایع از باکتری‌های اسید لاکتیک از دوغ کفیر بومی انجام شد و با کمک تست‌های بیوشیمیایی و روش‌های مولکولی جداسازی و بررسی اثرات ضد میکروبی و مهارتی دو گونه از پروبیوتیک‌ها بررسی گردید که همخوانی با اکثر مطالعات انجام شده در دنیا داشت (۱۸).

Cogulu و همکاران، در یک مطالعه‌ی بالینی نشان دادند، مصرف ۳ هفته نوشیدنی کفیر، می‌تواند منجر به کاهش اجتماع *استرپتوکوکوس موتانس* بزاق شود. علاوه بر آن، پروبیوتیک‌های

نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها به ویژه لاکتوباسیل‌ها قادر به اتصال به سطوح و تعدیل نمودن جایگزینی گونه‌های بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری موجود در دهان هستند به طوری که با تأثیر بر فرایند اتصال استرپتوکوک‌هایی که موجب پوسیدگی می‌شوند، قادر به کاهش پوسیدگی دندان و دیگر بیماری‌های پرودنتال خواهند بود.

در این مطالعه، اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلاتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس بر پاتوژن‌هایی چون استرپتوکوکوس موتانس و پورفیروموناس ژینتریوالیس مشهود بود به طوری که هم به صورت فنوتیپی و هم مولکولی اثر آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نشان دهنده‌ی اثر این پروبیوتیک‌ها بر مهار رشد، ممانعت از تشکیل بیوفیلم و بیان ژن‌های موثر در تشکیل بیوفیلم در باکتری‌های بیماری‌زای مذکور بود.

بنابر نتایج مطالعات انجام شده در زمینه‌ی ارزیابی باکتری‌های مولد لاکتیک اسید به ویژه لاکتوباسیل‌ها، به عنوان افزودنی‌های پروبیوتیکی در صنایع غذایی، بسیاری از این باکتری‌ها علاوه بر بی‌ضرر بودن برای مصرف‌کننده، دارای اثرات مفید بر سلامتی افراد نیز می‌باشند. امید است با تکمیل بیشتر این مطالعه و مطالعات مشابه بتوان برخی از سویه‌های جدا شده از مواد لبنی سنتی ایران را به عنوان سویه‌های بومی با توانایی پروبیوتیکی معرفی کرد و در صنعت مواد غذایی و همچنین فرآورده‌های دامی استفاده‌ی تجاری نمود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه با کد اخلاق IR.MUI.MED.REC.1399.260 بخشی از پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد رشته‌ی میکروبیولوژی پزشکی با کد طرح ۵۱۵۷۴ است که با حمایت‌های مالی گروه باکتری و ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد و بدین وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاری‌های صورت گرفته برای انجام این مطالعه اعلام می‌دارند.

این ترکیبات مطالعاتی انجام شده اما نیاز به تحقیق بیشتری دارد. همچنین پس از انجام روش‌های بیوشیمیایی از روش‌های مولکولی نظیر PCR و Real Time PCR برای شناسایی گونه‌ها و همچنین اثرات مهاری گونه‌های لاکتوباسیلوس بر بیان ژن‌های *gtfB* و *brpA* در استرپتوکوکوس موتانس استفاده شد که تاکنون مطالعه‌ای بر روی مهار ژن *brpA* در ایران صورت نگرفته بود. نتایج نشان داد اثر مهاری لاکتوباسیلوس‌های جداسازی شده از دوغ کفیر نسبت به لاکتوباسیلوس‌های استاندارد در مطالعات قبلی بیشتر بود.

در مطالعه‌ای توسط Tahmourespour و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثر بیوسورفاکتانت جدا شده از *L. acidophilus* DSM20079 بر روی تشکیل بیوفیلم سویه‌ی *S. mutans* ATCC35668 و *S. mutans* جدا شده از پلاک دندانی پرداخته شد. همچنین به بررسی اثر بیوسورفاکتانت ذکر شده بر سطح بیان دو ژن *gtfA/B* در این دو سویه پرداختند. نتایج نشان داد که بیوسورفاکتانت مشتق شده بر روی خصوصیات سطحی، تشکیل بیوفیلم، توانایی اتصال و بیان این ژن‌ها مؤثر بوده است (۲۴)، در این مطالعه اثر مهاری *L. rhamnosus* و *L. plantarum* بر بیان ژن‌های *gtfB* و *brpA* بررسی شد که هر دو گونه پروبیوتیک اثر مهاری بر ژن‌های دخیل در تولید بیوفیلم داشتند ولی اثر آن‌ها بر مهار ژن *gtfB* بیشتر از *brpA* بود.

در پایان می‌توان گفت دوغ کفیر، یک نوشیدنی پرکالری و غنی از باکتری‌های پروبیوتیک است که اثرات درمانی زیادی از جمله: تقویت سیستم گوارش تنظیم قندخون، تقویت سیستم ایمنی، درمان آلرژی‌ها، پیشگیری از عفونت‌های دهان و دندان و غیره دارد. این نوشیدنی لبنی محبوبیت زیادی در دنیا به خصوص منطقه‌ی خاورمیانه به خاطر نوع ذائقه‌ی‌میرمرد دارد و باعث مصرف روزافزون آن شده است. در این مطالعه هم نشان داده شد، دوغ‌های کفیر محلی مناطق مختلف اصفهان هم با دارا بودن پروبیوتیک‌های مختلف از این قاعده مستثنی نبوده و مصرف آن‌ها جهت سلامتی و پیشگیری از یکسری بیماری‌ها از جمله پوسیدگی‌های دندان می‌تواند مفید باشد که البته نیازمند مطالعات بیشتر بخصوص روی مدل‌های انسانی می‌باشد.

References

1. Forssten SD, Björklund M, Ouwehand AC. Streptococcus mutans, caries and simulation models. *Nutrients* 2010; 2(3): 290-8.
2. Peres MA, Macpherson LM, Weyant RJ, Daly B, Venturelli R, Mathur MR, et al. Oral diseases: a global public health challenge. *Lancet* 2019; 394(10194): 249-60.
3. Ciandrini E, Campana R, Casettari L, Perinelli DR, Fagioli L, Manti A, et al. Characterization of biosurfactants produced by *Lactobacillus* spp. and their activity against oral streptococci biofilm. *Appl Microbiol Biotechnol* 2016; 100(15): 6767-77.
4. Evvie SE, Huo GC, Igene JO, Bian X. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. *Food Nutr Res* 2017; 61(1): 1318034.
5. Khalaf H, Nakka SS, Sandén C, Svärd A, Hulténby K, Scherbak N, et al. Antibacterial effects of *Lactobacillus* and bacteriocin PLNC8 $\alpha\beta$ on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol* 2016; 16(1): 188.
6. Heymann HO, Swift EJ, Ritter AV. Sturdevant's art

- and science of operative dentistry. 6th ed. Philadelphia, PA: Mosby; 2012.
7. Alves-Barroco C, Roma-Rodrigues C, Balasubramanian N, Guimarães MA, Ferreira-Carvalho BT, Muthukumar J, et al. Biofilm development and computational screening for new putative inhibitors of a homolog of the regulatory protein BrpA in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *Int J Med Microbiol* 2019; 309(3-4): 169-81.
 8. Tahmourespour A, Salehi R, Kermanshahi RK. Lactobacillus acidophilus-derived biosurfactant effect on gtfB and gtfC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. *Braz J Microbiol* 2011; 42(1): 330-9.
 9. Leite AMO, Miguel MAL, Peixoto RS, Ruas-Madiedo P, Paschoalin VMF, Mayo B, et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. *J Dairy Sci* 2015; 98(6): 3622-32.
 10. Vos P, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey FA, et al. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York, NY: Springer Science & Business Media; 2011.
 11. Khalaf H, Nakka SS, Sandén C, Svärd A, Hulthenby K, Scherbak N, et al. Antibacterial effects of Lactobacillus and bacteriocin PLNC8 $\alpha\beta$ on the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol* 2016; 16(1): 188.
 12. Jeong D, Kim DH, Song KY, Seo KH. Antimicrobial and anti-biofilm activities of Lactobacillus kefiranofaciens DD2 against oral pathogens. *J Oral Microbiol* 2018; 10(1): 1472985.
 13. Schleifer KH, Ehrmann M, Beimfohr C, Brockmann E, Ludwig W, Amann R. Application of molecular methods for the classification and identification of lactic acid bacteria. *Int Dairy J* 1995; 5(8): 1081-94.
 14. Dubernet S, Desmases N, Guéguen M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 214(2): 271-5.
 15. Gaspar C, Palmeira-de-Oliveira R, Martinez-de-Oliveira J, das Neves J, Pestana PG, Rolo J, et al. Development and validation of a new one step Multiplex-PCR assay for the detection of ten Lactobacillus species. *Anaerobe* 2019; 59: 192-200.
 16. Hoque MZ, Akter F, Hossain K, Rahman M, Billah M, Islam K. Isolation, identification and analysis of probiotic properties of Lactobacillus spp. from selective regional yoghurts. *World J Dairy Food Sci* 2010; 5(1): 39-46.
 17. Bhushan J, Chachra S. Probiotics-their role in prevention of dental caries. *J Oral Health Comm Dent* 2010; 4(3): 78-82.
 18. Ahmed A, Dachang W, Lei Z, Jianjun L, Juanjuan Q, Yi X. Effect of Lactobacillus species on *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Pak J Pharm Sci* 2014; 27(5 Spec no): 1523-8.
 19. Aboutalebian S, Ahmadikia K, Fakhim H, Chabavizadeh J, Okhovat A, Nikaeen M, et al. Direct detection and identification of the most common bacteria and fungi causing otitis externa by a stepwise multiplex PCR. *Front Cell Infect Microbiol* 2021; 11: 644060.
 20. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res* 2011; 45(1): 69-86.
 21. Bitoun JP, Liao S, Yao X, Ahn SJ, Isoda R, Nguyen A, et al. BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78(8): 2914-22.
 22. Cogulu D, Topaloglu-Ak A, Caglar E, Sandalli N, Karagozlu C, Ersin N, et al. Potential effects of a multistrain probiotic-kefir on salivary *Streptococcus mutans* and Lactobacillus spp. *J Dent Sci* 2010; 5(3): 144-9.
 23. Tan YN, Zhang JH, Chen WN. GC-MS-based metabolomics analysis of prawn shell waste co-fermentation by lactobacillus plantarum and bacillus subtilis. *Polysaccharides* 2020; 1(1): 31-50.
 24. Tahmourespour A, Salehi R, Kermanshahi RK. Lactobacillus acidophilus-derived biosurfactant effect on gtfB and gtfC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. *Braz J Microbiol* 2011; 42(1): 330-9.

The Antimicrobial Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Rhamnosus* Isolated from Local Kefir Buttermilk on Oral Pathogens

Khatereh Ekhteraei¹, Farkhondeh Poursina², Arezoo Mirzaei²,
Mohammad Sadegh Damavandi³, Tahmineh Narimani²

Original Article

Abstract

Background: Tooth decay is one of the most common diseases, and *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis* have been found to play an effective role in causing advanced tooth decay. With the growing antibiotic resistance of bacteria, the use of probiotics has been investigated to reduce pathogenic bacteria in the oral cavity. The purpose of this study is to investigate the effect of probiotics isolated from traditional kefir dough on the two main causes of tooth decay.

Methods: Two common species *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* were confirmed using microbiological techniques (phenotypic and molecular). The antimicrobial effects of these probiotic on *Streptococcus mutans* (ATCC 35668) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 32277) were evaluated using the welling method and then the compounds present in their culture supernatant were identified by gas chromatography Mass spectrometry (GC-MS).

Findings: The experiments revealed that *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus rhamnosus* had a significant antimicrobial effect on *Streptococcus mutans* and *Porphyromonas gingivalis*, potentially making them suitable candidates to control the disease. *Lactobacillus plantarum* decreased *gtfB* gene expression by 0.001 fold change and *brpA* gene expression by 0.007 fold change, also *Lactobacillus rhamnosus* decreased *gtfB* gene expression by 0.01 fold change and *brpA* gene expression by 0.04 fold change. Also, GC-MS showed the presence of Pyrrolidione, Furanone, Benzoic acid, Icosane, Nonadecane derivatives in the supernatant of the tested probiotics.

Conclusion: Considering the antimicrobial properties of bacteria isolated from traditional kefir buttermilk, they can be used as traditional probiotic strains with antimicrobial effect in fermented foods.

Keywords: Probiotic; Kefir; *Streptococcus mutans*; *Porphyromonas gingivalis*; Real Time PCR

Citation: Ekhteraei K, Poursina F, Mirzaei A, Damavandi MS, Narimani T. **The Antimicrobial Effects of *Lactobacillus Plantarum* and *Lactobacillus Rhamnosus* Isolated from Local Kefir Buttermilk on Oral Pathogens.** J Isfahan Med Sch 2023; 41(717): 298-305.

1- MSc of Medical Microbiology, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- PhD Candidate of Medical Bacteriology, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Tahmineh Narimani, Assistant Professor, Department of Bacteriology and Virology, School of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran; Email: narimani@med.mui.ac.ir