DOI: 10.48305/jims.v41.i717.0298

مجله دانشکده پزشکی اصفهان — سال چهل و یکم/شماره‌ی ۷۱۷/هفته‌ی اول تیر ۱۴۰۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۸ تاریخ چاپ: ۱۴۰۲/۴/۷

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[۲]، آرزو میرزائی[۲]، محمد صادق دماوندی[۳]، تهمینه نریمانی[۲]

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: بیماری‌های دهان و دندان، از جمله بیماری‌های شایع می‌باشد که *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیرومونواس ژینژیوالیس*، 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 میکروب‌شناسی از دوغ‌های کفیر موجود در اصفهان جدا و شناسایی شد. اثر ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها بر *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC 35668) و *پورفیرومونواس ژینژیوالیس* (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 ضدمیکروبی قابل ملاحظه‌ای بر مهار رشد *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیرومونواس ژینژیوالیس* داشتند. لاکتوباسیلوس پلانتاروم بیان ژن *gtfB* را Fold change ۰/۰۰۱ و بیان ژن *brpA* را Fold change ۰/۰۰۷ کاهش، همچنین لاکتوباسیلوس رامنوزوس بیان ژن *gtfB* را Fold change ۰/۰۱ و بیان ژن *brpA* را Fold change ۰/۰۴کاهش 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*؛ *پورفیرومونواس ژینژیوالیس*؛ ریل تایم پی‌سی‌آر

ارجاع: اختراعی خاطره سادات، پورسینا فرخنده، میرزائی آرزو، دماوندی محمد صادق، نریمانی تهمینه. **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): ۳۰۵-۲۹۸

مقدمه

عفونت‌های دهان و دندان، از جمله شایع ترین 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 (World Health Organization) WHO و FAO (Food and Agriculture Organization) در سال ۲۰۰۲ 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

۱- کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی 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: تهمینه نریمانی: استادیار، گروه باکتری‌شناسی و ویروس‌شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: narimani@med.mui.ac.ir

پروبیوتیکی مطرح می‌باشد (٤). شواهد مربوط به نقش باکتری‌ها به ویژه *استرپتوکوک موتانس* و *پورفیرومونـاس ژینژیـوالیس* 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 (٥، ٦). *استرپتوکوک موتانس* و البته برخی دیگر از *استرپتوکوک*‌ها، قندها به ویژه ساکارز را مصرف کرده و با کمک آنزیم‌های (Glycosyltransferase) GTF-I و Fructosyltransferase آن‌ها را به گلوکوز و فروکتوز هیدرولیز نموده و تولید پلیمرهای خارج سلولی (Exopolysaccharides) EPS 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 (٦). از دیگر فاکتورهای ویرولانس، ژن پروتئین تنظیم کننده‌ی 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 ضدمیکروبی، اثرات آنتاگونیستی با پاتوژن‌ها و غیره می‌تواند نقش مؤثری در پیشگیری و درمان بیماری‌ها از جمله بیماری‌های مرتبط با دهان و دندان داشته باشد (٧). 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، باکتری های *استرپتوکوکوس موتانس*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* و *پورفیرومونـاس ژینژیـوالیس* بود. در این مطالعه، دوغ های کفیر محلی، قارچ کفیر محلی مورد بررسی قرار گرفت و دوغ‌های کفیر کارخانه از مطالعه خارج شد.

جمع‌آوری و شناسایی نمونه‌ها: ١٠ نمونه‌ی مختلف از دوغ کفیر بومی موجود در اصفهان خریداری و از آن رقت‌های یک‌دهم تا یک صد هزارم با استفاده از (Phosphate buffer saline) PBS تهیه شد. از هر رقت، ١ میلی لیتر در محیط کشت MRS آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به مدت ٤٨ تا٧٢ ساعت در دمای ٣٧ 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 لاکتو باسیلوس پلانتاروم و لاکتو باسیلوس رامنوزوس جدا شد (٨).

شناسایی سویه‌ها به روش فنوتایپی: شناسایی سویه‌های لاکتو باسیل، با استفاده از رنگ‌آمیزی گرم، تست کاتالاز، تست تخمیر قند، رشد در دماهای ١٠، ١٥ و ٤٥ درجه‌ی سانتی‌گراد و رشد در Phهای مختلف صورت گرفت (٩، ١٠). باکتری‌هایی که به عنوان *لاکتوباسیلوس* شناسایی شدند در محیط کشت MRS مایع با ٢٥ درصد گلیسرول در دمای ٨٠- درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (١١، ١٢). همچنین دو سویه‌ی استاندارد *استرپتوکوکوس موتانس* (ATCC35668) و *پورفیرومونـاس ژینژیـوالیس* (ATCC32277) به ترتیب از سازمان پژوهش های 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- اسپکتروفتومتر، نمونه های DNA روی ژل آگارز ١ درصد الکتروفورز گردید و سپس در فریزر ٢٠°C- تا مراحل بعدی نگهداری شد (١٣).

جهت انجام PCR ژن *16srRNA* از پرایمر رفت CTCAAAACTAAACAAAGTTTC و پرایمر برگشت CTTGTACACACCGCCCGTCA (برای شناسایی جنس *لاکتوباسیلوس*) استفاده شد (١٤) و برای شناسایی جدایه‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* 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 (١٥). برای انجام PCR، مواد لازم بدین شرح استفاده شد: DNA الگو (١µl)، آب مقطر (١٥ µl)، Master mix (٨ µl)، پرایمر رفت (٠/٥µl) و پرایمر برگشت (٠/٥ µl). در ادامه جهت انجام PCR (Polymerase chain reaction)، برنامه‌ی زیر به دستگاه داده شد: دناتوراسیون اولیه در دمای ٩٤°C به مدت ١ دقیقه، ٣٠ سیکل که شامل دناتوراسیون در دمای ٩٤ °C به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ °C به مدت ١ دقیقه برای ژن *16srRNA*، و دمای ٥٤ °C به مدت ١ دقیقه برای ژن *apbE2*(تشخیص جنس *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*)، دمای ٥٣ °C برای ژن *aeS* (تشخیص جنس *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*)، گسترش در دمای ٧٢°C به مدت ١ دقیقه و در انتها گسترش نهایی در دمای ٧٢ °C به مدت ١٢ دقیقه بود.

بررسی ترکیبات حاصل از کشت باکتری با استفاده از Gas chromatography–mass spectrometry: پس از کشت ٤٨ ساعته‌ی پروبیوتیک‌ها بر روی MRS agar، چند کلنی برداشته و

به محیط MRS broth منتقل کرده پس از ۴۸ ساعت سانتریفیوژ با دور ۴۰۰۰rpm 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 طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) و منابع کتابخانه‌ای که به صورت الکترونیکی در دسترس هستند انجام شد (۱۸).

تعیین کم‌ترین غلظت مهاری 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 خانه ای، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت مولر هینتون ریخته شد. سپس سوسپانسیونی حاوی ۱۰ mg/ml از پودر خشک شده‌ی هر یک از *لاکتوباسیلوس*ها 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 هینتون براث با رقت $0/5\times10^6$ cfu/ml به هر چاهک اضافه شد. پلیت های ۹۶ خانه ای حاوی *استرپتوکوکوس موتانس* و مایع رویی *لاکتو باسیلوس* در انکوباتور CO2دار در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. جهت بررسی و تعیین MIC *پورفیرومونس ژینژیوالیس*، سوسپانسیونی از *پورفیرومونس ژینژیوالیس* رشد یافته در محیط BHI براث غنی شده با ویتامین K_1 و همین، با غلظت معادل ۱ مک فارلند تهیه شد و به چاهک‌های حاوی رقت‌های مختلف از *لاکتوباسیلوس*ها (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 گرماگذاری، میزان رشد سویه‌های بیماری‌زا بر اساس تعیین کدورت چاهک‌ها با استفاده از الایزا ریدر با جذب ۶۲۰ نانومتر ارزیابی شد (۱۶).

بررسی اثر لاکتو باسیل‌های جدا شده بر ممانعت از رشد استرپتوکوکوس موتانس به روش چاهک گذاری: از *استرپتوکوکوس موتانس* کشت شده روی محیط بلاد آگار، با استفاده از سرم فیزیولوژی سوسپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه و روی محیط مولرهینتون 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 پلانتاروم* 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 آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین 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 پورفیرومونس ژینژیوالیس به روش چاهک‌گذاری: برای بررسی اثر *لاکتوباسیلوس*های مذکور بر روی *پورفیرومونس ژینژیوالیس* به روش چاهک گذاری، همه‌ی مراحل مشابه روش ذکر شده در مورد *استرپتوکوکوس موتانس*، انجام گرفت با این تفاوت که محیط کشت مخصوص پور فیرومونس بکار گرفته شد. همچنین از آنتی بیوتیک مترونیدازول به عنوان شاهد مثبت استفاده گردید. پلیت ها 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 پلانتاروم 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 پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* در MRS براث در شرایط بی‌هوازی سوسپانسیونی آماده شد و از سوپرناتانت آن‌ها (که قبلاً روش تهیه‌ی آن توضیح داده شد) در چاهک های 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 Bhushan و Chachr با کریستال ویوله رنگ‌آمیزی شده و با دستگاه الیزاریدر OD نمونه‌ها خوانده شد (۵، ۱۷).

بررسی اثر مهارکنندگی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس بر روی تولید بیوفیلم ناشی از پورفیرومونس ژینژیوالیس: برای بررسی اثر مهارکنندگی *لاکتوباسیلوس*های مذکور بر روی *پورفیرومونس ژینژیوالیس*، همه‌ی مراحل طبق مراحلی که در مورد *استرپتوکوکوس موتانس* گفته شد، انجام گرفت منتهی با در نظر

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

ارزیابی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس رامنوزوس بر بیان فاکتورهای ویرولانس gtfB و brpA در استرپتوکوکوس موتانس با روش Real Time PCR بیان فاکتورهای ویرولانس *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 ژن های *16srRNA*، *gtfB* و *brpA* از شرکت ژن فناوران سفارش داده شد.

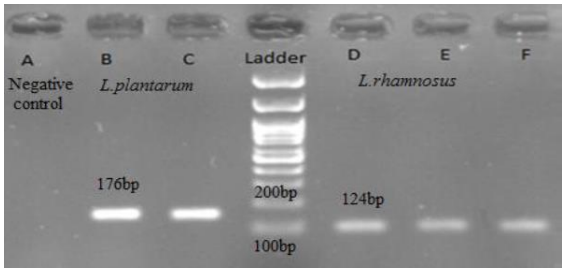
پرایمر رفت شامل ATGTTGGGTTAAGTCCCG و پرایمر برگشت CTAGCGATTCCRRCTTCA برای ژن *16srRNA* مورد استفاده قرار گرفت (۱۹). و برای ژن *gtfB*، پرایمر رفت ACGAACTTTGCCGTTATTGTCA و پرایمر برگشت AGCAATGCAGCCAATCTACAA(۲۰) و برای ژن *brpA* پرایمر رفت CGTGAGGTCATCAGCAAGGTC و پرایمر برگشت CGCTGTACCCCAAAAGTTTAGG می‌باشد (۲۱).

واکنش Real-time PCR توسط SYBR green PCR Master Mix انجام گرفت. مواد مورد نیاز برای واکنش PCR عبارت است از: Master 2x SYBR green (۱۰µl)، Mgcl2 (۱µl)، (۰/۵ µl) پرایمر رفت، (۰/۵µl) پرایمر برگشت، (۵µl) cDNA و (۳µl) 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 سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه برای ژن *brpA*، دمای ۵۲ درجه‌ی سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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. همانطورکه 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 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 124bp

نتایج فعالیت ضدمیکروبی 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 *پورفیرومونا*س *ژینژیوالیس* ایجاد کردند. با توجه به نتایج به دست آمده هر دو جدایه‌ی *لاکتوباسیلوس* اثر مهاری 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 *لاکتوباسیل*‌های مورد مطالعه

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

نتایج حاصل از روش MIC لاکتوباسیلوس پلانتاروم و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* هر دو به یک میزان اثر مهاری بر روی باکتری‌های پاتوژن داشتند به طوری که در غلظت‌های مختلف تهیه شده از جدایه های *لاکتوباسیلوس* جدا شده از دوغ کفیر، مشاهده شد که غلظت‌های ۲/۵ میلی گرم بر میلی‌لیتر دارای اثر ممانعت از رشد بر *استرپتوکوکوس موتانس* و غلظت‌های ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اثر ممانعت از رشد بر *پورفیرومونا*س *ژینژیوالیس* داشته باشد.

بررسی اثر سوپرناتانت های مورد مطالعه بر قدرت اتصال و تشکیل بیوفیلم استرپتوکوک به روش میکروتیتر پلیت: 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 سوپرناتانت ها 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 مهاری 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 پلانتاروم* اثر کاهشی بیشتری بر بیان دو ژن *gtfB* و *brpA* 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 پلانتاروم* 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 ۰/۰۱ Fold change و بیان ژن *brpA* را Fold change ۰/۰٤ کاهش داد (جداول ۲، ۳).

جدول۲. نتایج حاصل از اثر مهاری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر بیان ژن‌های مذکور

ژن	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Fold change
brpA	$2^{-4/7}$	۰/۰۰۷
gtfB	$2^{-2/9}$	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 مهاری دو گونه از پروبیوتیک ها 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 متنوعی 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 جدایه های پروبیوتیکی در این مطالعه بر روی باکتری‌های بی‌هوازی پاتوژن چون *پرفیرومونا‌س ژنژیوالیس* کمتر از اثر آن بر روی پاتوژن هوازی اختیاری چون *استرپتوکوکوس موتانس* نمی‌باشد.

جدول۳. نتایج حاصل از اثر مهاری *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* بر بیان ژن‌های مذکور

ژن	$2^{-\Delta\Delta CT}$	Fold change
brpA	$2^{-4/45}$	۰/۰۴
gtfB	$2^{-6/15}$	۰/۰۱

از طرفی بعضی از پروبیوتیک‌ها محصولات ثانویه‌ای تولید می کنند. این محصولات بیولوژیکی گروه گسترده‌ای از ترکیبات ارگانیک هستند که می تواند به عنوان دارو، مواد شیمیایی، چاشنی، آنتی اکسیدان، آنتی میکروبی، و غیره کاربرد داشته باشد. این ترکیبات قادر هستند از اتصال پاتوژن ها به سطوح سخت یا جایگاه عفونت ممانعت به عمل آورند. با انجام آزمایش کروماتوگرافی مایع مشخص شد که جدایه های 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 پلانتاروم* ولاکتو باسیلوس *برویس* صورت گرفت که ۹۰ ترکیب ضدمیکروبی شناسایی شدکه 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 پلانتاروم*، ١٤ ترکیب و در *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* نیز ۱۱ ترکیب دارای خاصیت ضدمیکروبی بودند. مقایسه‌ی این ترکیبات نشان داد که چندین ترکیب به صورت مشترک در هر دو گونه‌ی لاکتوباسیلوس وجود دارد که عبارتند از: مشتقات پیرولیدیون، فورانون، بنزوئیک اسید، ایکوزان، نونادکان. البته برای روشن شدن مکانیسم اثر ضد میکروبیال

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 *لاکتوباسیلوس*‌های جداسازی شده از دوغ کفیر نسبت به *لاکتوباسیلوس*‌های استاندارد در مطالعات قبلی بیشتر بود.

در مطالعه‌ای توسط Tahmourespour و همکاران در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثر بیوسور فاکتانت 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 *gtf A/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 (۲٤)، 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 باکتری های پروبیوتیک است که اثرات درمانی زیادی از جمله: تقویت سیستم گوارش تنظیم قندخون، تقویت سیستم ایمنی، درمان آلرژی ها، پیشگیری از عفونت های دهان و دندان و غیره دارد. این نوشیدنی لبنی محبوبیت زیادی در دنیا به خصوص منطقه‌ی خاورمیانه به خاطر نوع ذائقه‌یمردم 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 پروبیوتیک های مختلف از این قاعده مستثنی نبوده و مصرف آن‌ها جهت سلامتی و پیشگیری از یکسری بیماری ها از جمله پوسیدگی های دندان می‌تواند مفید باشد که البته نیازمند مطالعات بیشتر بخصوص روی مدل‌های انسانی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

پروبیوتیک‌ها به ویژه *لاکتوباسیل*‌ها 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 *استرپتوکوک*‌هایی که موجب پوسیدگی می‌شوند، قادر به کاهش پوسیدگی دندان و دیگر بیماری‌های پریودنتال خواهند بود.

در این مطالعه، اثرات ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس* بر پاتوژن هایی چون *استرپتوکوکوس موتانس* و *پورفیروموناس ژینژیوالیس* مشهود بود به طوری که هم به صورت فنوتیپی و هم مولکولی اثر آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت و نشان دهنده‌ی اثر این پروبیوتیک ها 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 *لاکتوباسیل*‌ها، به عنوان افزودنی‌های پروبیوتیکی در صنایع غذایی، بسیاری از این باکتری‌ها علاوه بر بی ضرر بودن برای مصرف کننده، 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 میکروب‌شناسی پزشکی با کد طرح ۵۱۵۷٤ است که با حمایت‌های مالی گروه باکتری و ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اصفهان انجام شد و بدین‌وسیله نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاری‌های صورت گرفته برای انجام این مطالعه اعلام می‌دارند.

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. Evivie 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, Hultenby K, Scherbak N, et al. Antibacterial effects of Lactobacillus and bacteriocin PLNC8 αβ 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, Muthukumaran 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, Hultenby K, Scherbak N, et al. Antibacterial effects of Lactobacillus and bacteriocin PLNC8 αβ 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, Desmasures 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.

DOI: *10.48305/jims.v41.i717.0298*

Journal of Isfahan Medical School **Vol. 41, No. 717, 1st Week, July 2023**

Received: 25.02.2023 Accepted: 29.05.2023 Published: 28.06.2023

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

Khatereh Ekhteraei[1], Farkhondeh Poursina[2], Arezoo Mirzaei[2], Mohammad Sadegh Damavandi[3], Tahmineh Narimani[2]

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 deca.

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