

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال پنجم، شماره ۱۷، بهار ۱۳۹۵، صفحه ۱۷۰-۱۵۹  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۱۰

## بررسی اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی بر باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک (UPEC)

**مهسا صدری:** کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، maah.sa1846@yahoo.com  
**نازیلا ارباب سلیمانی\*:** استادیار میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، nazilaarbab@yahoo.co.uk  
**محمد مهدی فرقانی فرد:** استادیار علوم سلولی و مولکولی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد دامغان، دامغان، ایران، forghanifard@gmail.com

### چکیده

**مقدمه:** یکی از عوامل مهم در عفونت‌های دستگاه ادراری ناشی از اشریشیاکلای یوروپاتوژنیک، چسبیدن باکتری به سطح سلول میزبان است. بنابراین، مهار اتصال باکتری، راهکاری مناسب برای مهار و پیشگیری از عفونت است. هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص ضد میکروبی و به ویژه ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها بر روی پاتوژن شایع دستگاه ادراری (اشریشیاکلی)، با استفاده از روش‌های میکروبی است.

**مواد و روش‌ها:** در پژوهش حاضر از دو سویه لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 و لاکتوباسیلوس کازهای PTCC 1608 استفاده شد. تعداد ۴۰ باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک از بیمارستان‌های استان سمنان جمع‌آوری شد. ۲۰ نمونه با بیش‌ترین توانایی در تولید بیوفیلم، برای انجام آزمون‌های میکروبی انتخاب شدند. به منظور بررسی آثار ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها در حالت کشت کامل و مایع رویی کشت (سوپرناتانت)، به ترتیب از روش‌های کشت دو لایه اصلاح شده و رقت‌سازی سوپرناتانت استفاده شد. مکانیسم تجمع‌پذیری لاکتوباسیلوس‌ها با پاتوژن مورد نظر بررسی شد. تشخیص فعالیت ضد اتصالی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس‌ها، با استفاده از روش میکروتیتربلیت ۹۶ خانه‌ای انجام شد.

**نتایج:** در تمامی آزمون‌های میکروبی به کار رفته اثر ضد میکروبی و اثر ضد اتصالی لاکتوباسیلوس‌ها بر باکتری‌های اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک تایید شد. لاکتوباسیلوس کازهای با اثر مهاری رشد (۴۲/۷ میلی‌متر) و ضد اتصالی (۴۶/۷ درصد) به‌عنوان باکتری پروبیوتیک مناسب‌تر در این پژوهش گزارش شد.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج به دست آمده لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در جلوگیری از اتصال، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی باکتری اشریشیاکلی یوروپاتوژنیک دارای آثار چشمگیری هستند. بنابراین، استفاده از آن‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت دستگاه ادراری به‌عنوان راهکاری مهم و عملی، منطقی و قابل قبول است.

**واژه‌های کلیدی:** یوروپاتوژنیک اشریشیاکلی، لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی، عفونت دستگاه ادراری، اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی

\* نویسنده مسؤول مکاتبات

## مقدمه

یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی<sup>۱</sup> عامل اولیه عفونت دستگاه ادراری<sup>۲</sup> در کشورهای توسعه یافته محسوب می‌شود (۱). در ایالات متحده آمریکا سالانه ۱/۶ میلیارد دلار هزینه صرف درمان این بیماری می‌شود و تخمین زده می‌شود ۴۰ تا ۵۰ درصد از زنان سالم بالغ در طول دوره زندگی خود حداقل یک‌بار عفونت دستگاه ادراری را تجربه می‌کنند (۲). این بیماری ابتدا با عفونت مثانه شروع می‌شود، بیشتر با فرا گرفتن کلیه‌ها توسعه پیدا کرده و سرانجام ممکن است به نارسایی کلیوی منجر شود و حتی به خون هم راه یابد (۱). توانایی این باکتری برای اتصال به بافت‌های میزبان یکی از برترین عامل‌هاست که کلونیزاسیون را در دستگاه ادراری تسهیل می‌کند و اجازه پایداری باکتری در برابر جریان ادراری و هجوم آن به اپیتلیال مثانه را می‌دهد. پدیده اتصال، ورود باکتری به داخل سلول‌های اپیتلیال را تحریک می‌کند (۲).

یکی از راه‌های کنترل عفونت‌های حاد ادراری استفاده از آنتی‌بیوتیک است که در حال حاضر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در حال افزایش هستند. در سال‌های اخیر مطالعات انجام گرفته، تأیید کننده آثار ضد بیماری‌زایی پروبیوتیک‌هاست. به علت تولید عامل‌های ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری کننده از بیماری‌های عفونی ایجاد شده با پاتوژن‌های دهانی، روده‌ای و ادراری - تناسلی مطرح شده‌اند (۳). ویژگی مهم باکتری‌های پروبیوتیک، توانایی این باکتری‌ها به منظور مهار افزایش تعداد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و نیز مهار قدرت بیماری‌زایی آن‌ها است. باکتری‌های اسید لاکتیک از قبیل جنس لاکتوباسیلوس، با تولید عامل‌های ضد

میکروبی و نیز به کارگیری مکانیسم‌های مختلف، دارای عملکرد بسیار موثری در این راستا هستند (۴-۶). به‌طور کلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری‌زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به علت چهار ویژگی اصلی این باکتری‌ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن‌هاست (۷). همچنین، باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی<sup>۳</sup> با میکروب‌های بیماری‌زا مجتمع می‌شوند و با آثار ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های پاتوژن به سلول هدف در میزبان‌شان می‌شوند (۸). بنابراین، پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار ضد میکروبی و ضد اتصالی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی بر باکتری یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی و نیز معرفی و پیشنهاد این باکتری‌ها در پیشگیری و درمان عفونت‌های ادراری انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

**جمع‌آوری و تهیه نمونه‌ها:** ابتدا تعداد ۴۰ نمونه ادرار از افراد مبتلا به عفونت ادراری از بیمارستان‌های استان سمنان (بیمارستان امام حسین و خاتم الانبیا در شهرستان شاهرود و بیمارستان امام رضا در شهرستان دامغان) جمع‌آوری شد. پس از کشت روی محیط اتوزین متیلن بلو<sup>۴</sup> و مشاهده کلونی‌های دارای جلای فلزی، آزمون‌های بیوشیمیایی متداول، رنگ آمیزی گرم و مشاهده میکروسکوپی، حضور ۳۰ ایزوله یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی در بین نمونه‌ها تأیید شد. دو سویه<sup>۵</sup> لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس<sup>۶</sup> PTCC 1643 و لاکتوباسیلوس کازهای<sup>۷</sup> PTCC 1608 از مرکز کلکسیون میکروبی علمی صنعتی ایران خریداری شد.

### بررسی اثر ضد میکروبی کشت کامل پروبیوتیک‌ها

با روش کشت دولایه<sup>۱۳</sup> اصلاح شده: برای بررسی آثار ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها، تعداد ۲۰ ایزوله یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی که دارای قدرت بالا در تشکیل بیوفیلم و در نتیجه دارای توانایی اتصال و بیماری‌زایی بالا نیز بودند، انتخاب شدند. ابتدا ۵۰ میکرولیتر از لاکتوباسیلوس پروبیوتیکی تازه رشد یافته، در مرکز پلیت MRS آگار قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری و رشد لاکتوباسیلوس، محیط مولر هیتتون آگار<sup>۱۴</sup> مذاب بر روی آن ریخته و اجازه داده شد تا ببندد. سپس، از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری پاتوژن بر روی این محیط، کشت متراکم داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد. این آزمایش برای ۲۰ نمونه باکتری یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی و نمونه شاهد در حضور هر دو لاکتوباسیلوس به طور جداگانه انجام و نمونه‌ها از لحاظ هاله عدم رشد ایجاد شده، بررسی شدند (۱۰).

### بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت پروبیوتیک‌ها

با روش رقت‌سازی: به منظور تهیه مایع رویی کشت سلولی<sup>۱۵</sup> از لاکتوباسیلوس‌ها، ابتدا کشت تازه از آن‌ها در محیط MRS براث تهیه شد. سپس، محیط کشت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور<sup>۱۶</sup> ۱۰۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ و برای اطمینان از عدم وجود هر گونه سلول میکروبی از فیلتر (۰/۲۲ میکرون) عبور داده شد (۲). سپس، ۱۰ لوله محتوی ۵ میلی‌لیتر محیط مولر هیتتون براث<sup>۱۷</sup> تهیه و از هر کدام از لوله‌های ۱ تا ۱۰ به ترتیب ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر از محیط کشت خارج و به همان میزان سوپرناتانت اضافه شد. در نهایت، ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند باکتری پاتوژن به لوله‌ها اضافه و ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد.

سپس، به منظور فعال‌سازی، سویه‌ها در محیط MRS براث<sup>۸</sup> و MRS آگار<sup>۹</sup> در شرایط بی‌هوازی کشت داده شدند. اشرشیاکلی PTCC1399 که در این پژوهش به عنوان شاهد به کار رفت از مرکز کلکسیون میکروبی علمی صنعتی ایران خریداری شد.

### بررسی چگونگی تشکیل بیوفیلم باکتری

یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی با استفاده از روش میکروتیتر پلیت<sup>۱۰</sup> ۹۶ خانه‌ای: ابتدا ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون باکتری تازه کشت یافته به لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر محیط استریل لوریا برتانی<sup>۱۱</sup> تلقیح شد. سپس، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محیط ۱۰ میلی‌لیتری به داخل چاهک‌های میکروتیتر پلیت ریخته شد. در چاهک شاهد فقط محیط کشت استریل لوریا برتانی ریخته شد. پس از گذاشتن درب پلیت، گرماگذاری به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از گذشت این مدت، محتویات چاهک‌ها خالی و با سرم فیزیولوژی استریل ۳ بار شستشو داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد برای تثبیت سلول‌ها به چاهک‌ها اضافه شد. پس از گذشت ۱۵ دقیقه، محتویات چاهک‌ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه سطح پلیت خشک شد. در مرحله بعد، هر چاهک با ۲۰۰ میکرولیتر از کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. چاهک‌ها با آب شهری به آرامی شسته و با استیک اسید ۳۳ درصد به عنوان حلال پر شدند. پس از ۱۵ دقیقه گرماگذاری، پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب نوری چاهک‌ها در ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الایزایدر مدل<sup>۱۲</sup> (اسات فاکس ۳۲۰۰) ساخت شرکت آمریکا خوانده شد (۹).

پلی‌استیرنی ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا ۷۵ میکرولیتر از سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک و سپس، ۷۵ میکرولیتر از سوسپانسیون نیم مک فارلند نمونه باکتری پاتوژن به چاهک‌ها اضافه شد.

میکروتیتربلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه گرماگذاری شد. در چاهک‌های شاهد تنها باکتری‌های پاتوژن و محیط کشت استریل ریخته شد. سپس، محتویات چاهک‌ها خارج و هر چاهک سه بار توسط بافر فسفات شستشو داده شد. برای تثبیت سلول‌ها از اتانل ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و به منظور رنگ‌آمیزی از کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده شد. سپس، میکروتیتربلیت با جریان ملایم آب شیر شسته شد. پس از خشک شدن چاهک‌ها در معرض هوا، استیک‌اسید ۳۳ درصد به عنوان حلال به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر برای هر چاهک اندازه‌گیری شد. آزمایش برای هر کدام از نمونه‌های پاتوژن در مجاورت هر دو پروبیوتیک ۲ بار تکرار و به‌طور جداگانه انجام شد. در نهایت، میزان کاهش اتصال از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کاهش اتصال} = \frac{\text{ODa} - \text{ODb}}{\text{ODa}} \times 100$$

ODa بیانگر جذب نوری چاهک کنترل و ODb جذب نوری چاهک مورد آزمایش است (۳). مقایسه عملکرد ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها در آزمون‌های میکروبی انجام شده، با استفاده از روش‌های آماری و به کمک نرم افزار SPSS بررسی و نتایج گزارش شد.

آزمایش برای ۲۰ نمونه پاتوژن در حضور سوپرناتانت هر دو لاکتوباسیلوس و نیز هر نمونه به تنهایی به عنوان شاهد، به شکل جداگانه انجام و لوله‌ها از برای کدورت محیط کشت حاصل از رشد بررسی شدند (۱۱).

### بررسی تجمع‌پذیری پروبیوتیک‌ها با باکتری

**یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی:** ابتدا کشت تازه از باکتری‌های پاتوژن و لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در محیط مایع تهیه و از رسوب باکتریایی سوسپانسیون معادل نیم مک فارلند در بافر فسفات سالین<sup>۱۸</sup> تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری‌های پروبیوتیک و باکتری‌های پاتوژن در یک اپندورف استریل با یکدیگر مخلوط و بلافاصله جذب نوری آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر با دستگاه اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری شد. اپندورف‌های حاوی مخلوط باکتری‌ها به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. پس از مدت زمان یاد شده، مایع رویی هر اپندورف از نظر میزان جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر بررسی و میزان تجمع یافتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد تجمع یافتن} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100$$

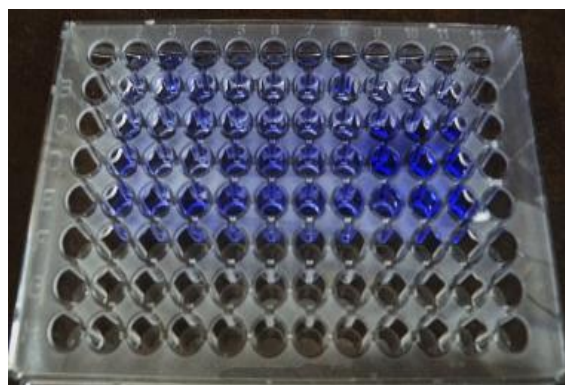
A1 میزان جذب نوری بلافاصله پس از مخلوط کردن باکتری‌ها و A2 میزان جذب نوری پس از ۴ ساعت است. آزمون برای ۲۰ نمونه باکتری یوروپاتوژنیک اشرشیاکلی و نمونه شاهد در حضور هر دو لاکتوباسیلوس پروبیوتیکی به شکل جداگانه انجام شد (۱۲).

### بررسی اثر ضد اتصالی سوپرناتانت پروبیوتیک‌ها با

استفاده از میکروتیتربلیت ۹۶ خانه ای: به منظور بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها از میکروتیتربلیت

## نتایج

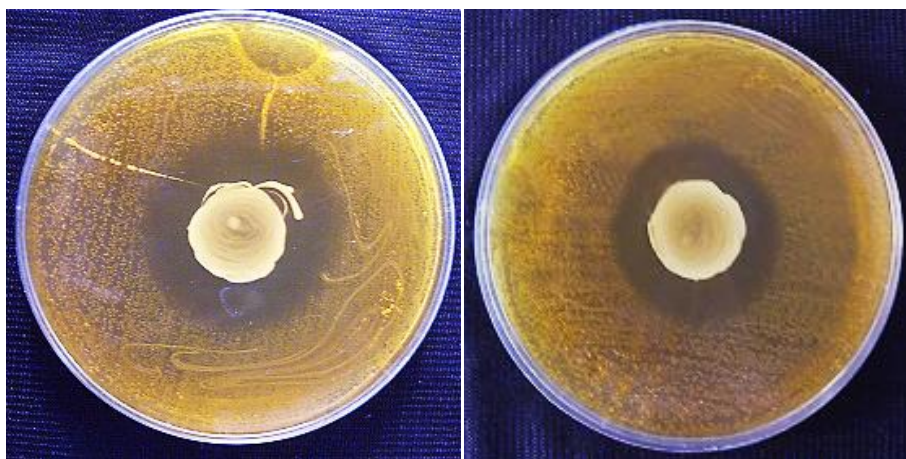
نتایج ارزیابی تشکیل بیوفیلم باکتری های اشریشیا کلاهی یوروپاتوژنیک نشان داد که از میان ۳۰ باکتری تشکیل دهنده بیوفیلم، ۲۵ درصد قدرت ضعیف، ۴۲/۵ درصد قدرت متوسط و ۵۰ درصد دارای قدرت بسیار بالا برای اتصال و تشکیل بیوفیلم بودند که آزمون های میکروبی در حضور باکتری های پروبیوتیک روی آن ها انجام شد (شکل ۱).



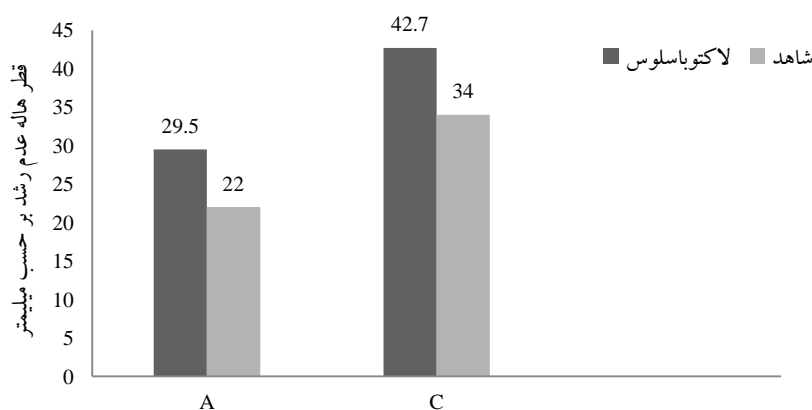
شکل ۱- تشکیل بیوفیلم اشریشیا کلاهی یوروپاتوژنیک در میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای بر اساس شدت رنگ کریستال ویوله در چاهک ها

در آزمون کشت کامل باکتری های پروبیوتیک، میانگین قطر هاله عدم رشد اشریشیا کلی یوروپاتوژن توسط لاکتوباسیلوس کازهای ۴۲/۷ میلی متر و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۲۹/۵ میلی متر بود و میانگین قطر هاله عدم رشد اشریشیا کلی شاهد در حضور لاکتوباسیلوس کازهای و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به ترتیب ۳۴ و ۲۲ میلی متر به دست آمد (شکل ۲).

همچنین، بررسی نتایج آزمون تی مستقل (T test) نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین لاکتوباسیلوس کازهای و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس وجود دارد. نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازهای بر روی اشریشیا کلی یوروپاتوژن در حالی که از کشت کامل باکتری های پروبیوتیک استفاده می شود، به مراتب بیشتر از حالت مشابه در لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بود (شکل ۳).



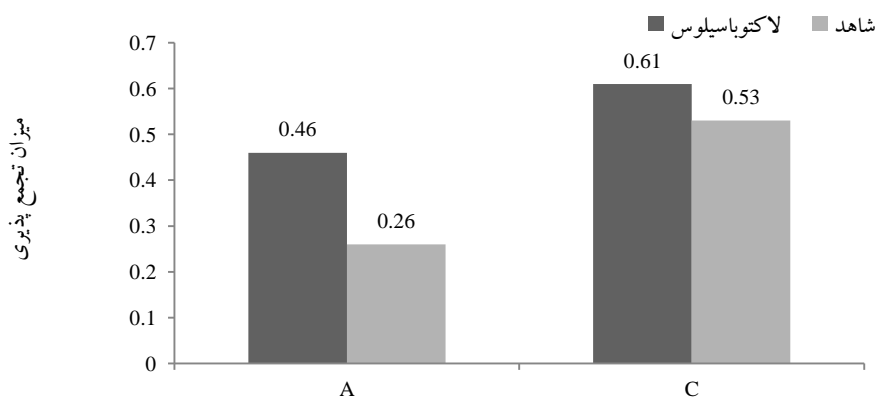
شکل ۲- هاله عدم رشد اشریشیا کلی یوروپاتوژن در حضور لاکتوباسیلوس کازهای (سمت راست) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (سمت چپ)



شکل ۳- نمودار میانگین قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیا کلی* یوروپاتوژن و شاهد *اشریشیا کلی* (PTCC1399) در حضور لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (A) و لاکتوباسیلوس کازهای (C) بر حسب میلی‌متر

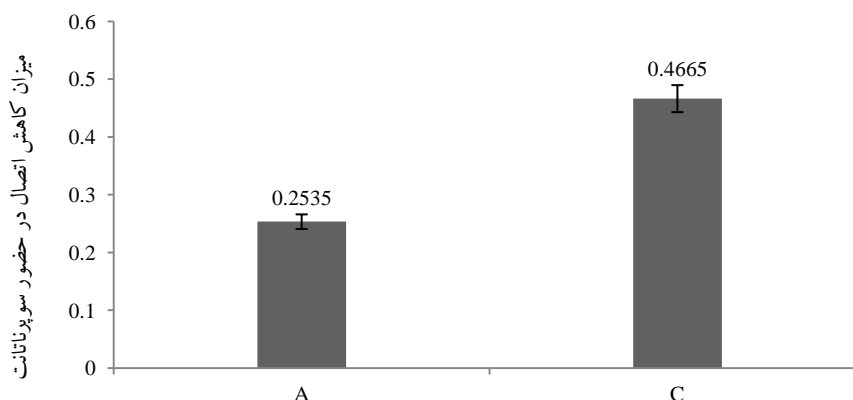
باکتری‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* با درصد بالایی بودند که از این میان لاکتوباسیلوس کازهای با میانگین ۶۱/۹ درصد نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با میانگین ۴۶/۷ درصد، دارای تجمع پذیری بیشتری با یوروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* بود. میزان تجمع پذیری لاکتوباسیلوس کازهای و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با *اشریشیا کلی* شاهد به ترتیب ۵۳ و ۲۶ درصد به دست آمد. همچنین، نتایج بررسی آزمون تی مستقل نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین دو لاکتوباسیلوس وجود دارد (شکل ۴).

در آزمون بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت، بررسی کدورت لوله‌ها در نمونه‌های یوروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* نشان داد، میانگین حداقل غلظت مهارکننده رشد سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازهای ۱۲ درصد و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس ۱۸ درصد است. بنابراین، اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازهای در مقایسه با لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در حالتی که از سوپرناتانت پروبیوتیکی استفاده می‌شود نیز بیشتر بود. نتایج آزمایش بررسی تجمع پذیری لاکتوباسیلوس‌ها نشان داد که هر دو باکتری پروبیوتیک قادر به تجمع با



شکل ۴- نمودار میانگین درصد تجمع پذیری لاکتوباسیلوس کازهای (C) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (A) با باکتری یوروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* و شاهد *اشریشیا کلی* (PTCC1399)

سوپرناتانت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با میانگین ۲۵/۶ درصد است. همچنین، نتایج بررسی آزمون تی مستقل نشان داد در سطح خطای ۱ درصد تفاوت معناداری بین دو لاکتوباسیلوس وجود دارد (شکل ۵).



شکل ۵- نمودار میانگین کاهش اتصال باکتری یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی در حضور سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازهای (C) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (A)

بیماری‌زا با استفاده از کشت کامل و سوپرناتانت آن‌ها وجود دارد. بهترین روش برای بررسی اثر کشت کامل پروبیوتیک‌ها روشی است که توسط مک گیون و تگ<sup>۱۹</sup> در سال ۱۹۷۱ با عنوان Spot on – lawn method ارایه شد که در سال ۲۰۰۱ مایا<sup>۲۰</sup> نام آن را به روش کشت دو لایه<sup>۲۱</sup> تغییر داد و در سال ۲۰۱۰ ارباب سلیمانی<sup>۲۲</sup> و همکاران این روش را با کمی اصلاح با نام روش کشت دو لایه اصلاح شده<sup>۲۳</sup> عنوان کردند. در این روش اثر ضد میکروبی کشت کامل پروبیوتیک با وجود هاله عدم رشد باکتری‌های یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی در لایه دوم محیط کشت به خوبی قابل مشاهده بود (۱۰). در پژوهش حاضر نیز از روش کشت دو لایه اصلاح شده استفاده شد و نتایج نشان داد که اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازهای بر روی یوروپاتوژنیک اشریشیا کلی نسبت به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بیشتر

بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک‌ها بر باکتری بیماری‌زا، از این جهت که سبب جلوگیری از شروع بیماری می‌شود دارای اهمیت است. نتایج نشان داد که سوپرناتانت لاکتوباسیلوس کازهای با میانگین ۴۶/۷ درصد دارای اثر ضد اتصالی بیشتری نسبت به

## بحث و نتیجه گیری

عفونت دستگاه ادراری یکی از متداول‌ترین عفونت‌های انسانی است. باکتری اشریشیا کلی یکی از شایع‌ترین عوامل ایجاد کننده عفونت مجاری ادراری در افراد با دستگاه ادراری سالم است و مسؤول ۹۰ درصد از کل عفونت مجاری ادراری باکتریال اکتسابی از جامعه است (۱۳). از آنجا که این باکتری مقاوم به درمان آنتی‌بیوتیکی شده است، روش‌های ضد میکروبی غیر آنتی‌بیوتیکی نظیر پروبیوتیک‌ها بسیار مورد توجه است. پژوهش حاضر به منظور بررسی خواص ضد میکروبی و ضد اتصالی باکتری‌های پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازهای و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس) بر پاتوژن شایع دستگاه ادرای (اشریشیا کلی)، انجام شد. روش‌های متعددی برای بررسی ویژگی ضد میکروبی باکتری‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های

جدا شده از ادرار افراد مبتلا به عفونت ادراری، گزارش کردند (۱۰).

توانایی باکتری‌های اسیدلاکتیک برای تجمع با باکتری‌های روده‌ای در شرایط *in vivo* و *in vitro* از دیرباز بسیار مورد توجه بوده و به عنوان مکانیسم کارآمدی برای جلوگیری از عفونت مطرح شده است (۱۸). در پژوهش حاضر، اثر مهارى این مکانیسم بر باکتری *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* آزمایش شد. درصد تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازهای* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* با *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* به ترتیب در حدود ۶۰ و ۴۵ درصد به دست آمد که *لاکتوباسیلوس کازهای* دارای اثر بهتری بود. راید<sup>۳۲</sup> و همکارانش در سال ۱۹۸۸ اثر مهارى *لاکتوباسیلوس کازهای* و *لاکتوباسیلوس رامنوزوس*<sup>۳۳</sup> سویه *GR-1* و اثر تجمع‌پذیری این باکتری‌ها را با *اشرشیاکلی* جدا شده از دستگاه ادراری گزارش کردند (۱۹). در سال ۲۰۰۲، ساسکوویچ<sup>۳۴</sup> قابلیت تجمع یافتن *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* را با باکتری‌های پاتوژن *اشرشیاکلی* حدود ۱۹/۴ درصد بیان کرد. همچنین، در سال ۲۰۱۰ ارباب سلیمانی و همکارانش در پژوهشی اثر تجمع‌پذیری *لاکتوباسیلوس کازهای* با *اشرشیاکلی* را بیش از سایر پروبیوتیک‌ها اعلام کردند (۱۰ و ۲۰).

با بررسی اثر ضد اتصالی سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک بر باکتری *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* در این مطالعه، این نتیجه حاصل شد که هر دو *لاکتوباسیلوس* دارای اثر ضد اتصالی مناسبی بودند که از این میان *لاکتوباسیلوس کازهای* اثر ضد اتصالی (۴۶/۷ درصد) بیشتری را نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۲۵/۶ درصد)، بر باکتری *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* اعمال کرد. عابدی<sup>۳۵</sup> و همکارانش در سال ۲۰۱۳ اعلام کردند

بود. در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازهای* سویه *شیروتا علیه اشرشیاکلی* توسط آسهارا<sup>۳۴</sup> گزارش شد (۷). در سال ۲۰۰۸ آناس<sup>۳۵</sup> و همکارانش اعلام کردند کشت کامل باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتروم*<sup>۳۶</sup> دارای آثار ضد میکروبی علیه باکتری‌های بیماری‌زای *اشرشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*<sup>۳۷</sup> است (۱۴). ارباب سلیمانی و همکاران نیز در سال ۲۰۱۰، نشان دادند کشت کامل *لاکتوباسیلوس کازهای* دارای بیش‌ترین اثر ضد میکروبی بر روی *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* در میان سایر باکتری‌های پروبیوتیک مورد آزمایش بود. (۱۰).

اثر ضد میکروبی سوپرناتانت حاصل از باکتری‌های پروبیوتیک را می‌توان به تولید اسید لاکتیک نسبت داد زیرا در طی رشد باکتری‌های پروبیوتیک، اسیدته محیط به شدت اسیدی شده و باکتری‌های بیماری‌زا به‌طور طبیعی به شرایط اسیدی حساس بوده و در اسیدته پایین از بین می‌روند (۱۵ و ۱۶). در این مطالعه بررسی حداقل غلظت بازدارنده از سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک نشان داد که سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازهای* در غلظت پایین‌تر (۱۲ درصد) دارای اثر ضد میکروبی بیشتر بر باکتری *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی* نسبت به *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (۱۸ درصد) بود. در سال ۲۰۰۳ آگانانو<sup>۳۸</sup> و همکاران نشان دادند سوپرناتانت حاصل از دو پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتروم* و *لاکتوباسیلوس برویس*<sup>۳۹</sup> دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های *اشرشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*<sup>۳۰</sup> و *یرسینیا اتروکلی تیکا*<sup>۳۱</sup> بوده و از رشد آن‌ها جلوگیری می‌کند (۱۷). ارباب سلیمانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ غلظت ۵ درصد از سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس کازهای* را برای مهار رشد باکتری‌های *یوروپاتوزنیک اشرشیاکلی*



نهایت، تشکیل بیوفیلم این باکتری جلوگیری کنند. یکی از مکانیسم‌هایی که امروزه به عنوان برتری لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی مطرح است قدرت به دام انداختن باکتری بیماری‌زا بر اساس تجمع‌پذیری است. اگر چه در گذشته پژوهشگران بر این باور بودند که تجمع‌پذیری باکتری‌های پروبیوتیک با عوامل بیماری‌زا به ویژگی ضد میکروبی آن‌ها مربوط است اما در سال‌های اخیر ارتباط میان تجمع‌پذیری این باکتری‌ها و قدرت ضد اتصال مطرح شده است. بر اساس یافته‌های پژوهش حاضر مشخص شد هر چقدر قدرت ضد میکروبی و تجمع‌پذیری لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی بیشتر می‌شود قدرت ضد اتصال آن‌ها نیز افزایش می‌یابد و شاید بتوان این فرضیه را مطرح کرد که تجمع‌پذیری می‌تواند در ارتباط با هر دو عامل ضد میکروبی و ضد اتصال باشد. امید است که بتوان با پژوهش‌های بیشتر و درک بهتر از مکانیسم ضد اتصال باکتری‌های پروبیوتیک بتوان از آن‌ها در درمان و پیشگیری از عفونت دستگاه ادراری استفاده کرد و از پیدایش سویه‌ای مقاوم به آنتی‌بیوتیک جلوگیری کرد.

## References

- (1) Matiuzzi da Costa M., Drescher G., Maboni F., Weber Sh dABS., Henning Vainstein M., Schrank I., et al. Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from urinary tract of swine in southern of brazile. *Brazilian Journal of Microbiology* 2008; 39: 741-3.
- (2) Snyder JA., Haugen BJ., Lockett CV., Maroncle N., Hagan EC., Johnson DE., et al. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 2005; 73 (11): 7588-96.

که لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی دارای اثر ضد اتصال هستند. بر اساس گزارش آن‌ها لاکتوباسیلوس دلبروکی قادر بود حدود ۸۰ درصد از اتصال اشرشیاکلی به سلول‌های Caco-2 جلوگیری کند و مکانیسم آن‌را جایگزینی رقابتی دانستند. یکی از علت‌های تفاوت نتیجه به دست آمده در پژوهش حاضر با نتیجه به دست آمده از پژوهش عابدی و همکارانش تفاوت سطوح اتصال است. در کشت سلولی Caco-2 در رقابت میان لاکتوباسیلوس پروبیوتیکی و باکتری اشرشیاکلی برای اتصال به گیرنده سلولی لاکتوباسیلوس موفق‌تر بوده و با اشغال این جایگاه از اتصال باکتری بیماری‌زا جلوگیری می‌کند اما در میکروتیتر پلیت پلی استیرنی شرایط کشت سلولی محیا نیست (۲۱). به طور کلی در مطالعات انجام شده نشان داده شده است، در شرایطی که از کشت کامل باکتری‌های پروبیوتیک استفاده می‌شود نسبت به استفاده از سوپرناتانت آن‌ها، اثر ضد اتصال بیشتری بر باکتری‌های بیماری‌زا اعمال می‌شود. می‌توان چنین استنباط کرد که در کشت کامل اثر ضد اتصال پروبیوتیک به علت تولید متابولیت‌های ضد میکروبی و در برخی موارد به واسطه رقابت مستقیم با پاتوژن برای جایگاه اتصال، علاوه بر ایجاد شرایط اسیدی است. چنانچه اینگراسیا<sup>۳۶</sup> و همکارانش در سال ۲۰۰۵ اثر ضد اتصال کشت کامل لاکتوباسیلوس کازهای سویه *DN-114001* را بر اشرشیاکلی در شرایط *in vitro* بررسی و حدود ۵۷ درصد گزارش کردند (۱۰ و ۲۲). بر اساس یافته‌های این مطالعه می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که کشت کامل و سوپرناتانت حاصل از لاکتوباسیلوس کازهای و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای آثار مهارتی علیه اشرشیاکلی یورپاتوزنیک هستند و این باکتری‌های پروبیوتیک قادرند از اتصال و در

- (3) Spinler JK., Taweechoitipatr M., Rognerud CL., Ou CN., Tumwasorn S., Versalovic J. Human- derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe* 2008; 14 (3): 166- 71.
- (4) Darsanaki RK., Rokhi ML., Aliabadi MA., Issazadeh K. Antimicrobial activities of *Lactobacillus* strains isolated from fresh vegetables. *Middle- east Journal of Scientific Research* 2012; 11 (9): 1216- 19.
- (5) Fracchia L., Cavallo M., Allegrone G., Martinotti M. A *Lactobacillus*- derived biosurfactant inhibits biofilm formation of human pathogenic *Candida albicans* biofilm producers. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology* 2010; 2: 827- 837.
- (6) Servin AL. Antagonistic activities of *lactobacilli* and *bifidobacteria* against microbial pathogens. *FEMS Microbiology Reviews* 2004; 28 (4): 405- 40.
- (7) Asahara T., Nomoto K., Watanuki M., Yokokura T. Antimicrobial activity of intraurethrally administered probiotic *Lactobacillus casei* in a murine model of *Escherichia coli* urinary tract infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (6): 1751- 60.
- (8) Collado MC., Meriluoto J., Salminen S. Measurement of aggregation properties between probiotics and pathogens. *Journal of Microbiological methods* 2007; 71 (1): 71- 4.
- (9) Stepanović S., Vuković D., Hola V., Bonaventura GD., Djukić S., Čirković I., et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 2007; 115 (8): 891- 9.
- (10) Soleimani NA., Kermanshahi RK., Yakhchali B., Sattari TN. Antagonistic activity of probiotic *lactobacilli* against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *African Journal of Microbiology Research* 2010; 4 (20): 2169- 73.
- (11) Kasra Kermanshahi R., Beheshti Maal K., Mobini Dehkordi M. *Cellular and Molecular Biology of Bacterial Structure*. 2<sup>nd</sup> Ed. Esfahan: University of Esfahan; 2008.
- (12) Todorov SD., Von Mollendorff JW., Moelich E., Muller N., Witthuhn RC., Dicks LM. Evaluation of Potential Probiotic Properties of *Enterococcus mundtii*, Its Survival in Boza and in situ Bacteriocin Production. *Food Technology & Biotechnology* 2009; 47 (2): 178- 91.
- (13) Mandell GL. Mandell., Douglas., Bennett's. *Principles and practice of infectious diseases*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2005.
- (14) Anas M., Eddine HJ., Mebrouk K. Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from Algerian raw goat's milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal Dairy Food Science* 2008; 3 (2): 39- 49.
- (15) Heller KJ. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *The American journal of Clinical Nutrition* 2001; 73 (2): 374s- 379.
- (16) Elham Sarmast Ghahfarokhi., Mohsen Mobini Dehkordi., Keyvan Beheshtimaal. Isolation and evaluation of lactic acid production content in native *Lactobacillus* of Chaharmahal va Bakhtiari province isolated from dairy products. *Biological Journal of Microorganism* 2012; 1 (3): 41- 52.
- (17) Ogunbanwo ST., Sanni AL., Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology* 2003; 2 (8): 219- 27.

- (18) Kolenbrander PE., Ganeshkumar N., Cassels F., Hughes C. Coaggregation: specific adherence among human oral plaque bacteria. *The FASEB Journal* 1993; 7 (5): 406- 13.
- (19) Reid G., McGroarty JA., Angotti R., Cook RL. *Lactobacillus* inhibitor production against *Escherichia coli* and co aggregation ability with uropathogens, *Canadian Journal of Microbiology* 1988; 34: 344- 51.
- (20) Kos B., Šušković J., Vuković S., Šimpraga M., Frece J., Matošić S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology* 2003; 94 (6): 981- 7.
- (21) Abedi D., Feizizadeh., Jafarian Dehkordi A. In vitro anti- bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Research in Pharmaceutical Sciences* 2013; 8 (4): 260- 8.
- (22) Ingrassia I., Leplingard A., Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei* DN- 114 001 inhibits the ability of adherent- invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Applied and Environmental Microbiology* 2005; 71 (6): 2880- 8.

- 
- <sup>1</sup>- Uropathogenic *Escherichia coli*
  - <sup>2</sup>- Urinary Tract Infection
  - <sup>3</sup>- Coaggregation
  - <sup>4</sup>- Eosin Methylene Blue
  - <sup>5</sup>- Persian Type Culture Collection
  - <sup>6</sup>- *Lactobacillus acidophilus*
  - <sup>7</sup>- *Lactobacillus casei*
  - <sup>8</sup>- Man Rogasa Sharp Broth
  - <sup>9</sup>- Man Rogasa Sharp Agar
  - <sup>10</sup>- Microtiter Plate
  - <sup>11</sup>- Luria Bertani
  - <sup>12</sup>- Stat Fax 3200
  - <sup>13</sup>- Modified Double Layer Method
  - <sup>14</sup>- Muller Hinton Agar
  - <sup>15</sup>- Cell Free Supernatant
  - <sup>16</sup>- RPM
  - <sup>17</sup>- Muller Hinton Broth
  - <sup>18</sup>- Phosphate Buffer Saline
  - <sup>19</sup>- Mc given and Tagg
  - <sup>20</sup>- Maya
  - <sup>21</sup>- Double layer method
  - <sup>22</sup>- Arbab Soleimani
  - <sup>23</sup>- Modified double layer method
  - <sup>24</sup>- Asahara
  - <sup>25</sup>- Anas
  - <sup>26</sup>- *Lactobacillus plantarum*
  - <sup>27</sup>- *Staphylococcus aureus*
  - <sup>28</sup>- Ogunbanwo
  - <sup>29</sup>- *Lactobacillus brevis*
  - <sup>30</sup>- *Bacillus cereus*
  - <sup>31</sup>- *Yersinia enterocolitica*
  - <sup>32</sup>- Reid
  - <sup>33</sup>- *Lactobacillus rhamnosus*
  - <sup>34</sup>- Šušković
  - <sup>35</sup>- Abedi
  - <sup>36</sup>- Ingrassia



## The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of Probiotic *Lactobacilli* on Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)

**Mahsa Sadri**

M.Sc. of Microbiology, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran,  
maah.sa1846@yahoo.com

**Nazila Arbab Soleimani**\*

Assistant Professor of Microbiology, Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran,  
nazilaarbab@yahoo.co.uk

**Mohammad Mahdi Forghanifard**

Assistant Professor of Cell and molecular biology, Department of Biology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran, forghanifard@gmail.com

### Abstract

**Introduction:** One of the most important factors in Urinary Tract Infection caused by Uropathogenic *Escherichia coli*, is the attachment of bacteria to the host cell surface. Thus, inhibition of bacterial attachment is the appropriate action to prevent infection. The aim of this study was to investigate the antimicrobial and especially anti adhesive characteristics of probiotic bacteria against *Escherichia coli* by using microbial techniques.

**Materials and methods:** In this study two strains of *Lactobacillus acidophilus* PTCC 1643 and *Lactobacillus casei* PTCC 1608 were used. 40 Uropathogenic *Escherichia coli* were collected from Semnan province hospitals. 20 samples with the more capability of biofilm production were selected for microbial tests. To evaluate the antimicrobial activity of complete culture and supernatant of probiotic *lactobacilli*, modified double layer method and dilution of supernatant were used, respectively. The mechanism of co- aggregation of *lactobacilli* with pathogens was examined. The microtitre plate method was used to detect anti-adhesive activity of *Lactobacilli* supernatant.

**Results:** The antimicrobial and anti-adhesive effects of probiotic *lactobacilli* on Uropathogenic *Escherichia coli* were confirmed in all tests. In this study, *Lactobacillus casei* with the growth inhibitory (42/7 mm) and anti-adhesive (46/7mm) effects were reported as a proper probiotic bacterium.

**Discussion and conclusion:** According to the results, the probiotic *lactobacilli* have spectacular effects to prevent attachment, biofilm formation and pathogenicity of UPEC, so using them to prevent and treat Urinary tract infection is a practical, reasonable and acceptable method.

**Key words:** Uropathogenic *Escherichia coli*, Probiotic *lactobacilli*, Urinary tract infection, Antimicrobial and Antiadhesive Effect

---

\* Corresponding author

**Received:** May 17, 2014 / **Accepted:** December 31, 2014