بررسی خاصیت ضد باکتریایی و پروبیوتیکی یک سویه لاکتوباسیلوس سالیواریوس NK02 ، جدا شده از دهان بر روی *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ، باکتری شایع در بیماران با التهاب لثه

ندا ساجدی نژاد[۱*]، حکیمه شرفی[۳*]، مژگان پاک نژاد[۱]، یدالله سلیمانی شایسته[۱]، بهزاد هوشمند[۲]، سیما مدیری[۳]، حسین شهبانی ظهیری[۳] و کامبیز اکبری نوقابی[۳*]

[۱] تهران، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده دندانپزشکی

[۲] تهران، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دانشکده دندانپزشکی

[۳] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

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

چکیده

بیماریهای لثه به دلیل مجموعه ای از شرایطی ایجاد می گردد که موجب التهاب لثه و دیگر ساختارهای نگهدارنده دندان می شود. هدف این مطالعه بررسی خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس های بومی با خصوصیات پروبیوتیک بر روی باکتری بیماری زای شاخص در بیماریهای التهاب لثه، *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* می باشد. از میان ۴۰ سویه لاکتوباسیلوس جداسازی شده از نمونه های گرفته شده ازدهان افراد سالم و بیمار، سویه منتخب با بالاترین خاصیت ضد باکتریایی انتخاب، با استفاده از تستهای بیوشیمیایی و مولکولی (۱۶S rRNA) تعیین هویت و تحت عنوان لاکتو باسیلوس سالیواریوس NK02 نامگذاری گردید. در ادامه خصوصیات پروبیوتیکی باکتری منتخب مورد مطالعه دقیق قرار گرفت. بررسی خصوصیات پروبیوتیکی باکتری مذکور نشان داد که لاکتو باسیلوس جداشده به میزان ۹۲,۳۴ درصد به لیزوریم مقاوم بوده و توانایی رشد در حضور نمکهای صفراوی به میزان ۷۹,۲۳ درصد را دارا می باشد. درصد زنده ماندن جدایه منتخب در شرایط شبیه سازی شده شیره معده قابل توجه بود. پس از ۹۰ دقیقه میزان بقای جدایه مورد نظر ,$7\ \text{logs CFU ml}^{-1}$ تعیین گردید. لاکتوباسیلوس جداشده به اکثر آنتی بیوتیکها حساس بوده و خاصیت ضد باکتریایی قابل توجه ای علیه تعدادی از باکتریهای بیماری زای مورد استفاده در این مطالعه نشان داد. حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت باکتریسیدال (MBC) سویه NK02 برعلیه *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* معادل MIC: ۵۱۲AUml^{-1}، $\text{MBC: 1250 AUml}^{-1}$ تعیین گردید که در مقایسه با سایر لاکتوباسیلوس های جداسازی شده قابل توجه بود. سویه NK02 به عنوان کاندید مناسبی برای درمان بیماریهای لثه و پس از آزمایشات تأییدی بیشتر در آینده می تواند مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: لاکتوباسیلوس پروبیوتیک، *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ، بیماریهای لثه، حداقل غلظت مهاری رشد

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

* نویسنده اول و دوم در تحقیق حاضر مشارکت یکسان داشته اند.

مقدمه

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

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

Koll-Kiais و همکاران در سال ۲۰۰۵ در سوئد در مطالعه ای به بررسی مقایسه ای لاکتوباسیل های دهان در افراد سالم و بیماران پریودنتیت مزمن پرداختند. در این مطالعه میزان ۲۳۸ لاکتوباسیل از بزاق و نواحی زیر لثه ۲۰ بیمار پریودنتیت مزمن و ۱۵ فرد سالم جدا شد. از بین ۲۳۸ لاکتوباسیل جداشده آنها به بررسی فعالیت ضد میکروبی ۱۱۵ جدایه بر علیه *Porphyromonas gingivalis* و *Streptococcus mutans* پرداختند. از بین ۱۱۵ جدایه، ۱۰ گونه لاکتو باسیل شناسایی شدند. گونه شایع در افراد سالم *Lactobacillus gasseri* و *Lactobacillus fermentum* و در افراد با پریودنتیت مزمن *Lactobacillus plantarum* بود. همچنین *گونه L. gasseri* در افراد با پریودنتیت مزمن بسیار کم بود. لاکتوباسیل های مورد آزمایش مانع رشد ۶۹ درصد *P. intermediate* شدند. بیشترین میزان فعالیت ضد میکروبی به *pararcasei, L. plantarum L. salivarius, L.* و *L. rhamuoesus* مربوط بود. گونه های جدا شده از افراد سالم کمترین فعالیت ضد میکروبی را دارا بودند (۴).

Manjunath و همکاران در مطالعه ای در سال ۲۰۱۱ به بررسی اثرات مفید پروبیوتیکها در سلامت پریودونتال پرداختند. در این مطالعه پیشنهاد شده که پروبیوتیکها برای پیشگیری از بیماریهای پریودونتال ۳ مکانیسم دارند: اثر مستقیم ، اثر رقابتی و تغییر سیستم ایمنی میزبان، پروبیوتیکها باعث کاهش pH، جلوگیری از تولید آنتی اکسیدان ها وجلوگیری از شکل گیری پلاک با خنثی کردن الکترونهای آزاد در شکل گیری مواد معدنی می گردند. پروبیوتیکها به صورت سنتی برای پیشگیری از سرطان کولون، پایین آوردن کلسترول، پایین آوردن فشار خون، بهبود عملکرد سیستم ایمنی، کاهش التهاب و....نیز استفاده می شوند (۶).

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

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

مواد و روشها

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

انتخاب سویه منتخب: سویه منتخب جداشده از دهان فرد سالم براساس خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری *A. actinomycetemcomitan* انتخاب گردید. در این تست پس از رشد لاکتو باسیلوس ها در شرایط هوازی از روش deferred antagonism استفاده شد (۸). محیطی که به عنوان محیط لایه زیرین انتخاب شد MRS آگار ۱/۴ درصد فاقد سدیم استات و تری آمونیوم سولفات با pH:7.1 بود. محیط استفاده شده در لایه بالایی هم شامل Brain Heart Infusion(BHI) حاوی ۰/۷ درصد آگار بود که با ۰/۵ درصد عصاره مخمر و ۰/۰۰۰۵ همین برای رشد اختصاصی باکتری A. *actinomycetemcomitan*S به محیط اضافه گردید. برای انجام تست ابتدا لاکتوباسیلوس ها بر روی محیط زیرین تلقیح شده و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه قرار داده شده تا رشد کنند. باکتری بیماری زای دهانی مذکور در محیط غنی شده اشاره شده در بالا با کدورت ۰/۲ – ۰/۱ تلقیح و سپس بر روی محیط MRS که باکتری لاکتوباسیلوس بر روی آن رشد داده شده بود ریخته شد. پلیتها در ۳۷ درجه برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. خاصیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس ها علیه *A. actinomycetemcomitnas* براساس ایجاد هاله عدم رشد بررسی شد (۱).

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

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

جدول ۱- توالی پرایمر های استفاده شده

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

برای بررسی نتایج، ۴ میکرولیتر از محصول PCR به همراه ۲ میکرولیتر بافر سنگین کننده مخلوط شده و در چاهکهای ژل آگاروز لود شد و الکتروفورز انجام گرفت (۱).

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

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

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

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

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

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

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

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

الکترولیتی شامل مواد زیر تلقیح شد ($CaCl_2$; 6.2 g l^{-1} NaCl, 2.2 g l^{-1} KCl, 1.2 g l^{-1} and 0.22 g $l^{-1}NaHCO_3$).

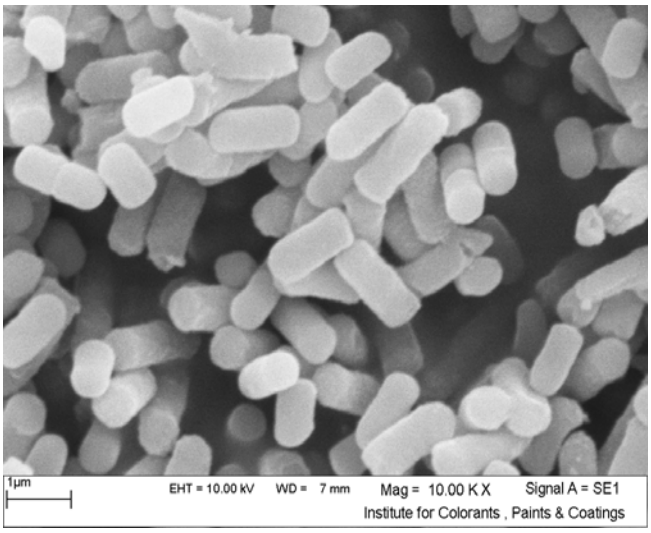
یکی از محلولهای الکترولیت به عنوان تست و حاوی mg l^{-1} ۱۰۰ لیزوزیم و دیگری در شرایط کاملاً مشابه و فاقد لیزوزیم به عنوان کنترل در ۳۷ درجه انکوبه و مورد بررسی قرار داده شد. در بازه زمانی ۱۲۰-۳۰-۰ دقیقه از نمونه های مورد آزمایش و کنترل نمونه برداری و بر روی محیط MRS آگار شمارش کلنیها انجام شد (۱۰).

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

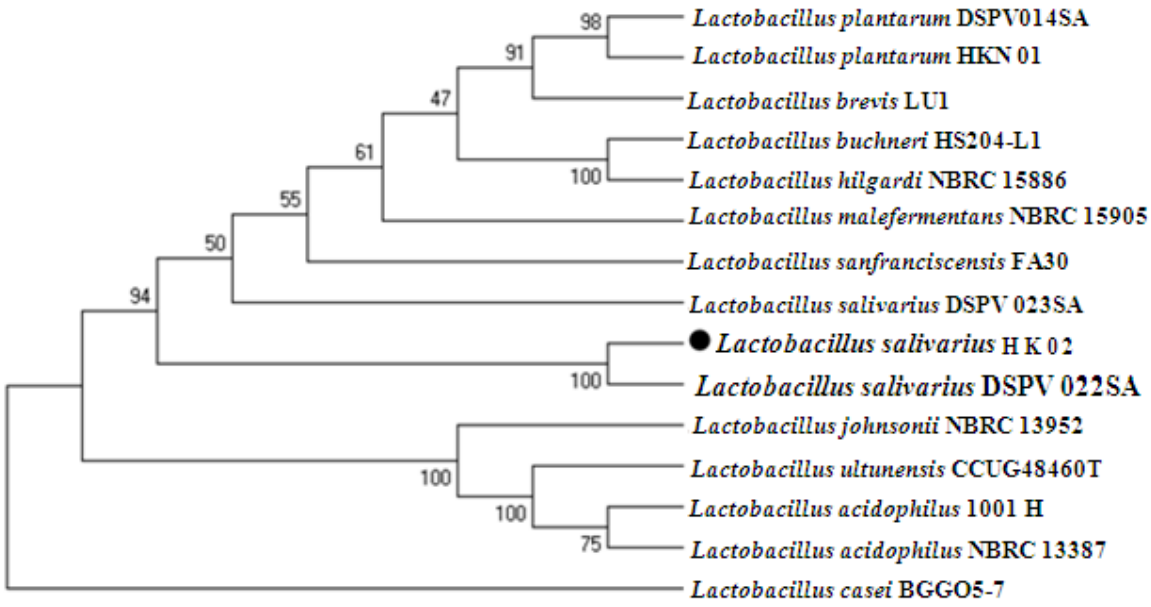
نتایج

جداسازی و غربالگری سویه منتخب براساس خصوصیت ضد باکتریایی: از بین ۴۰ سویه لاکتوباسیلوس جداشده یک جدایه براساس بیشترین خاصیت ضد باکتریایی برعلیه *A. actinomycetemcomitans* انتخاب شد. این سویه بیشترین $AUml^{-1}$ ۵۱۲ :MIC و بیشترین $AUml^{-1}$ ۱۲۵۰ :MBC را در مقایسه با سایر لاکتوباسیلوس ها داشت. جدایه منتخب از روش توالی یابی ژنی ۱۶S rRNA استفاده شد. نتایج حاصل پس از مقایسه با توالیهای موجود در بانک ژن متعلق به مرکز ملی داده های زیست فناوری (NCBI) نشان داد که جدایه به جنس لاکتو باسیلوس تعلق دارد و بیش از ۱۰۰ درصد با *گونه سالیواریوس* همسانی دارد. نهایتاً سویه مذکور تحت عنوان *L. salivarius* NK02 نامگذاری و با شماره دسترسی JX129916 در NCBI ثبت گردید. در شکلهای ۱ و ۲ به ترتیب شکل ظاهری و فیلوژنتیک دندروگرام حاصل از آنالیز توالی ۱۶S rRNAو ارتباط سویه NK02 با دیگر لاکتو باسیلوسها نشان داده شده است.

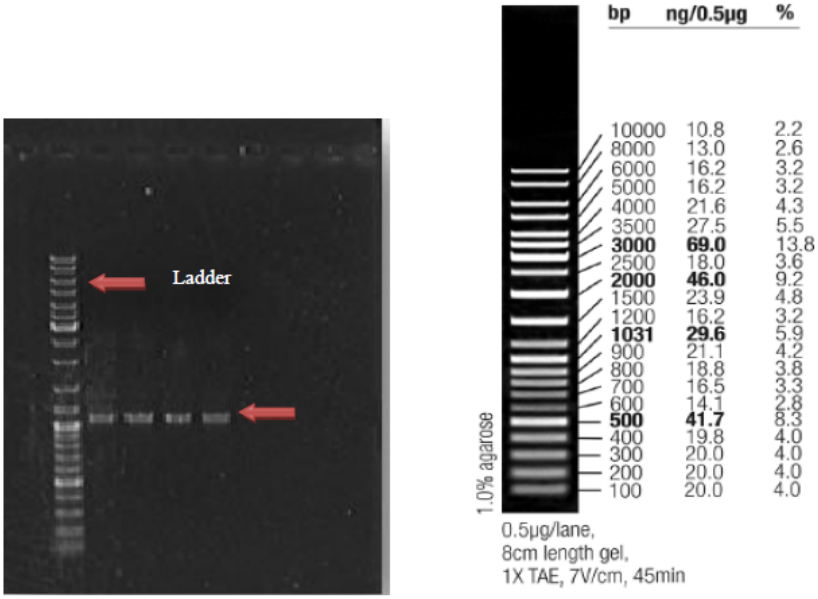
ویژگیهای پروبیوتیکی): تعیین پروفایل ژن *bsh* : به دلیل اهمیت وجود ژن *bsh* که کد کننده فعالیت هیدرولیز نمکهای صفراوی و موجب کاهش کلسترول سرم خون می شود و همچنین ارتباط ژن *bsh* با خواص پروبیوتیکی جدایه های لاکتوباسیلوس این تست با استفاده از پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر و با استفاده از واکنش زنجیره ای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



شکل۱- شکل ظاهری باکتری لاکتوباسیلوس سالیواریوسNK02 توسط اسکنینگ میکروسکوپ الکترونی (SEM)



شکل۲- فیلوژنتیک دندروگرام حاصل از آنالیز توالی ۱۶S rRNA. ارتباط سویه NK02 با دیگر لاکتوباسیلوسها نشان داده شده است.



شکل۳- PCR ژن *bsh* درلاکتوباسیلوس سالیواریوسNK02

مقاومت به لیزوزیم، نمکهای صفراوی و شیره شبیه سازی شده معده: لاکتوباسیلوس جداشده به میزان ۹۲/۳۴ درصد مقاومت به لیزوریم و شرایط شبیه سازی شده دهان نشان داد. همچنین توانایی رشد آن در مجاورت با نمکهای صفراوی به میزان ۷۹/۲۳ درصد مشاهده شد. مقاومت سویه منتخب در شرایط شبیه سازی شده شیره معده تغییر قابل توجه ای در ۶۰ دقیقه اول با کاهش pH از ۵ به ۲/۵ مشاهده نشد. شمار سلولهای لاکتو باسیلوس منتخب پس

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

فعالیت هیدرولیزی نمکهای صفراوی: لاکتوباسیلوس جداشده توانایی هیدرولیز نمک سدیم گلایکودکسی اسید را به صورت هاله عدم رشد بر روی محیط MRS-GDCA نشان داد.

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

جدول ۳

bacteria	*S. aureus* (PTCC 1112)	*B. subtilis* (PTCC 1715)	*B. cereus* (PTCC 1015)	*E. coli* (PTCC 1338)	*S. typhimurium* (wild type)	*K. pneumonia* (PTCC 1290)	*P. aeruginosa* (PTCC 1310)
MIC ($AUml^{-1}$)	۲۵۶	۶۴	۶۴	۲۵۶	۵۱۲	۵۱۲	۱۲۸
MBC ($AUml^{-1}$)	۳۱۲	۱۵۶	۱۵۶	۳۱۲	۱۲۵۰	۱۲۵۰	۳۱۲

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

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

جدول ۴

Antibiotics / Bacteria	Amoxycillin (AMX 25)	Ampicillin (AMP 10)	Cefixime (CFM 5)	Cefotaxime (CTX 30)	Azithromycin (AZM 15)	Tetracycline (TE 30)	Gentamycin (CN 10)	Streptomycin (S 10)	Chloromphenicol (C 30)
L. salivarius NK۰۲	S	S	S	S	S	S	S	R	S

بحث

یک ویژگی مرحله مهم جهت انتخاب باکتریهایی که قابلیت بروز ویژگی پروبیوتیکی را دارند بررسی وضعیت سویه مورد نظر در شرایط شبیه سازی شده دستگاه گوارش می باشد. این راهکار امکانی را فراهم می آورد تا سویه هایی که احتمالاً در این شرایط زنده می مانند شناسایی شده و در ادامه مورد مطالعه بیشتر قرار گیرند. شرایط سخت برای میکروارگانیسم ها در دهان و تحت تأثیر آنزیم لیزوزیم موجود در بزاق شروع و در معده در حضور pH:1.5 الی ۳ و در بخش فوقانی روده که صفرا در آنجا وجود دارد ادامه پیدا می کند. جدایه منتخب مقاومت بالایی در برابر غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در لیتر آنزیم لیزوزیم در شرایط مشابه بزاق موجود زنده نشان داد.

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

جدایه منتخب سازگاری مطلوبی در برابر شیره شبیه سازی شده معده با pH 2.5 و تحمل بالایی را در برابر صفرا نشان داد. در اغلب تحقیقات اخیر مقادیر صفرای مورد استفاده از ۰/۳ درصد تا ۱ درصد بوده در حالی که Mathara و همکاران مقدار ۰/۳ درصد از صفرا را برای انتخاب سویه هایی که مقاومت مطلوبی دارند پایه گذاری کردند (رشد بالای ۵۰ درصد در مقایسه با محیط کشت کنترل که فاقد صفرا می باشد). با به کارگیری مقادیر مشابه صفرا و معیار های گزینشی، لاکتو باسیلوس سالیواریوس سویه NK02 توانایی بقای مناسبی در شرایط شبیه سازی شده معده و روده داشت که این امر نشان دهنده توانایی مطلوب جدایه منتخب می باشد (۷).

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

منابع

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

study. Journal of Clinical Periodontology 10:897-905.

10. Stamatova I, Meurman JH (2009) Probiotics and periodontal disease. Periodontology 1:141-151.

11. Teughels W, Quirynen LG (2011) Do probiotics offer opportunities to manipulate the periodontal oral microbiota. Journal of Clinical Periodontology 38:159-177.

12. Vinderola CG, Reinheimer JA (2000) Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, *bifidobacteria* and lactic starter bacteria in fermented dairy products. International Dairy Journal 4: 271-276.

13. Vivekananda MR, Vandana KL, Bhat KG (2010) Effect of probiotic *Lactobacilli reuteri* in the management of periodontal disease: a preliminary randomized clinical trial. Journal of Oral Microbiology 2:53-44.

14. Zahradnik RT, Magnusson I, Walker C, McDonell E, Hillman CH, Hillman JD (2009) Preliminary assessment of safety and effectiveness in humans of ProBiora3, a probiotic mouthwash. Journal of Applied Microbiology 107:682-690.

The study of antibacterial and probiotic characteristics of a strain of Lactobacillus salivarius NK02, newly isolated from human mouth: its effect on Aggregatibacter actinomycetemcomitans ‹the etiological agent of preiodontal diseaese

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

[1] **Tehran University of Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Tehran, I.R. of Iran**

[2] **Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Tehran, I.R. of Iran**

[3] National Institute for Genetic Engineering and Biotechnology, **Tehran, I.R. of Iran**

Abstract

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

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