



مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی-پژوهشی

مقایسه اثر ضدباکتریایی عصاره پروبیوتیکی حاصل از لاکتوباسیلوس کازئی با آنتی بیوتیک‌های رایج علیه چهار سویه پاتوژن باکتریایی بصورت برون تنی

افروز سعادت زاده^{۱*}، رضا هنرمند^۲، سحر قلی پور^۲

۱- دکترای تخصصی فارماسیوتیکس، استادیار، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

۲- دکترای عمومی داروسازی، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله : تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۴/۱۳	هدف از این مطالعه، بررسی فعالیت عصاره پروبیوتیکی استخراج شده از لاکتوباسیلوس کازئی علیه رشد ۴ سویه استاندارد باکتریایی مقاوم به دارو و مقایسه اثرضدمیکروبی آن با چند آنتی بیوتیک رایج در شرایط برون تنی بود. لاکتوباسیلوس کازئی در محیط استاندارد MRS و شرایط کم هوازی، کشت داده شد. عصاره خشک پروبیوتیکی، پس از جداسازی توده سلول‌های زنده با روش سانتریفوژ استخراج شده و توسط روش لیوفیلیزاسیون، پایدار گردید. بررسی فعالیت ضدمیکروبی با استفاده از روش انتشار-دیسک انجام شد. نتایج با استفاده از نرم افزار SPSS و با سطح معناداری $P < 0.05$ مورد آنالیز قرار گرفت. تفاوت معناداری بین تمام عوامل ضد میکروبی وجود داشت ($P < 0.05$). یافته‌ها نشان می‌داد که LPE قادر بود باکتری‌های پاتوژن مقاوم را کنترل نماید. بیشترین اثر مهارکنندگی LPE علیه باکتری /ستافیلوکوکوس/ اورئوس با قطر هاله عدم رشد ۲۶ میلیمتر و در مقابل، کمترین اثر علیه باکتری /شرشیا کلی/ با قطر هاله عدم رشد ۱۳/۳ میلیمتر ارزیابی شد. هرچند که LPE، در مقایسه با عوامل آنتی بیوتیک علیه ۳ سویه باکتریایی بیشترین اثر را دارا بود ولی در مورد <i>سالمونلا تایفی</i>، از جنتامایسین و استرپتومایسین ضعیف‌تر بود. با وجود اثرات قابل توجه ضدباکتریایی از LPE علیه چند سویه باکتری گرم منفی و گرم مثبت، مطالعات بیشتری قبل از تجویز بالینی آن و اثبات نقش مفید آن در درمان بیماری‌های عفونی ضروری است.
کلمات کلیدی: پروبیوتیک، آنتی بیوتیک، پاتوژن.	
DOI:10.22034/FSCT.21.157.100. * مسئول مکاتبات: afsaadat@gmail.com	

۱-مقدمه

آنجایی که شناسایی کل ترکیبات، مشکل و وقتگیر بوده و نیاز به جداسازی، خالص سازی و ارزیابی شمار زیادی از مواد دارد و نیز بخش عمده ای از این متابولیت ها را اسیدهای آلی شامل می شود، شناسایی این اسیدها با استفاده از روش های کروماتوگرافیک یا آنزیماتیک بعنوان شاخص مدنظر قرار می گیرد. حال با توجه به مطالعات متعددی که در خصوص اثبات اثرات آنتی پاتوژنیک پروبیوتیک ها انجام شده است، پیش بینی می شود که می توان از آن ها بعنوان جایگزین مناسب و موثری برای آنتی بیوتیک ها با هدف غلبه بر آثار سوء جانبی آنتی بیوتیک ها و مقاومت باکتریایی نسبت به آن ها استفاده نمود.

سلولهای زنده و خشک شده پروبیوتیک ها به دو فرم مصرف می شوند:

۱- به صورت مکمل های دارویی به شکل پودر، شربت یا قرص

۲- مواد غذایی غنی شده با پروبیوتیک ها [۶، ۷].

مطالعات بالینی مختلف انجام شده بر روی انسان نشان داده اند که مصرف باکتری های تولید کننده اسید لاکتیک به میزان 10^{11} - 10^9 عدد در روز، می تواند میزان بروز، طول مدت و نیز شدت تعدادی از بیماری های دستگاه گوارش را کاهش دهد. مشاهده شده است که پروبیوتیک ها یکنواختی روده را حفظ کرده و عوارض تعدادی از بیماری های گوارشی مانند اسهال وابسته به آنتی بیوتیک ها، بیماری های التهابی روده، اسهال کودکان، اسهال مسافرتی، عدم تحمل لاکتوز، عفونت ناشی از هلیکوباکتر پیلوری، سندرم روده تحریک پذیر و بیماری روده ای ناشی از کلستری دیوم دیفیل را تعدیل می کنند. علاوه بر آن، بررسی های آزمایشگاهی و بالینی مختلف نشان داده اند که پروبیوتیک ها در پیشگیری یا درمان عفونت های ادراری - تناسلی، چربی خون بالا، آلرژی و سرطان اثر بخشی امیدوارکننده ای داشته اند [۸-۱۰].

از جمله فواید بالقوه استفاده از پروبیوتیک ها در درمان بیماری های مختلف علاوه بر هزینه نسبتاً کم،

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده و مشخصی هستند که در صورت مصرف در انسان یا حیوان، با تعدیل فلور میکروبی بدن باعث اعمال اثرات مفید بر سلامتی میزبان می شوند [۱]. این میکروارگانیسم ها، عموماً از منابع انسانی بوده و بعنوان باکتری های غیر بیماری زا محسوب می شوند و راه حل مناسبی برای بهبود و حفظ سلامتی مجاری گوارش، کاهش مصرف آنتی بیوتیک ها، پیشگیری از بروز بیماری ها، افزایش قدرت سیستم ایمنی و از بین بردن عوامل پاتوژن از طریق رقابت یا تولید ترکیبات ضد میکروبی و تولید مواد مغذی و فاکتورهای رشد می باشند [۲، ۳].

بر اساس مطالعات بسیاری ثابت شده است که اثرات پروبیوتیک ها به واسطه تولید ترکیبات بیولوژیکی فعالی است که متابولیت های آنها قلمداد می شوند. این متابولیت ها در سوپرناتانت کشت باکتری ها وجود دارند و با شستشوی محیط، جدا کردن سوپرناتانت و خشک کردن آن می توان به فرم های خشک این متابولیت ها دسترسی پیدا کرد. این متابولیت ها شامل طیف وسیعی از اسیدهای آلی، باکتریوسین ها و ترکیبات پلی آمینی می باشند. مطالعات نشان می دهد که این ترکیبات بر روی میکروفلورهای پاتوژن فرصت طلب گرم مثبت و منفی موجود در سیستم گوارشی انسان و حیوان، اثرات باکتریواستاتیک و باکتریوسیدال دارند. به دلیل ویژگی های درمانی پروبیوتیک ها و متابولیت های آن ها، افزودن این مواد به محصولات لبنی مثل شیر، پنیر و ماست، بسیار مورد توجه است. به همین دلیل، امروزه فرآورده های دارویی و غذایی بسیاری با هدف درمانی و تقویتی در دست تولید است که حاوی پروبیوتیک ها می باشند از جمله ترکیباتی که حاوی سلول های خشک شده پروبیوتیکی هستند. البته کاربرد متابولیت ها بعنوان جایگزین سلول های زنده هم ایده نوینی است که در دست بررسی می باشد [۲، ۴، ۵].

مساله مهمی که باید مورد توجه قرار داد، شناسایی متابولیت های تهیه شده جهت تعیین مقدار دقیق مصرف آن ها در فرمولاسیون های حاوی متابولیت های بیولوژیکی است. از

در دهه های اخیر، گونه های باکتریایی اسید لاکتیک روده‌ای که دارای ویژگی‌های سلامت بخش اثبات شده هستند، بعنوان پروبیوتیک‌ها معرفی شده‌اند که از آن جمله می‌توان به *لاکتوباسیلوس رامنوسوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس جانسونی* اشاره کرد [۱۴، ۱۵].

آنتی‌بیوتیک‌ها موادی هستند که توسط گونه‌های مختلف میکروارگانیسمی تولید می‌شوند و قادرند مانع رشد میکروارگانیسم‌ها شوند. امروزه تمام یا بخشی از آنتی‌بیوتیک‌ها توسط راه‌های مختلف شیمیایی سنتز می‌شوند [۱۶].

خصوصیات فیزیکی، شیمیایی و دارویی آنتی‌بیوتیک‌ها کاملاً متفاوت است که این تفاوت بیانگر طیف ضد میکروبی آن‌ها و مکانیسم عملشان می‌باشد. نکته قابل توجه این است که از هزاران آنتی‌بیوتیک تولید شده در طبیعت که خالص شده‌اند، فقط تعداد محدودی غیر سمی بوده و در نتیجه از آن‌ها به عنوان دارو استفاده می‌شود. آنتی‌بیوتیک‌ها برای اعمال فعالیت مهارکنندگی خود در سلول، اهداف گوناگونی دارند. این مواد در سنتز دیواره، عمل غشاء، سنتز پروتئین، متابولیسم اسیدهای نوکلئیک و واکنش‌های آنزیمی مداخل می‌کنند. برخی از این مواد ممکن است بیش از یک محل هدف یا مکانیسم عمل داشته باشند [۱۷]. هدف از این مطالعه بررسی خصوصیات ضد میکروبی عصاره سلولی باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس کازئی* و مقایسه تاثیرات آن با آنتی‌بیوتیک‌های رایج علیه چهار سویه پاتوژن مقاوم می‌باشد.

۲- مواد و روش

سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس کازئی* (PTCC 1608) از کلکسیون قارچ‌ها و باکتریهای صنعتی و بیماری‌زا از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، به صورت لیوفیلیزه تهیه و در محیط (MRS (Merck Cat. No. 1.1.0660.0500

می‌توان به ایمنی و مکانیسم‌های متعددی که پروبیوتیک‌ها از طریق آن پاتوژن‌ها را مهار کرده و در نتیجه شانس توسعه مقاومت در برابر پروبیوتیک‌ها را کاهش می‌دهند، اشاره نمود [۸، ۱۱].

از مهمترین پروبیوتیک‌هایی که در صنایع لبنی استفاده می‌شود، *لاکتوباسیلوس*‌ها را می‌توان نام برد. در سال ۱۹۰۶ دکتر ایلیا ایلچ مچنیکف^۱ برنده جایزه نوبل، طول عمر مردم بالکان را در نتیجه مصرف مقادیر زیاد غذاهای تخمیری غنی شده با *لاکتوباسیلوس*‌ها و دیگر ارگانیسم‌های تولید کننده‌ی اسید لاکتیک به خصوص ماست دانست و مشخص کرد که باکتری‌های موجود در ماست از فعالیت پاتوژن‌ها ممانعت کرده و خاصیت ضد سمی دارند [۶].

بعد از مرگ مچنیکف در سال ۱۹۱۶، مرکز فعالیت‌های تحقیقاتی در این مورد به ایالات متحده منتقل شد و اثبات شد که باکتری‌های با منشأ روده‌ای به احتمال زیاد اثر مطلوبی در روده می‌گذارند. در سال ۱۹۳۵ بعضی از سبوس‌های *لاکتوباسیلوس* / *اسیدوفیلوس* کشف شدند که در دستگاه گوارش انسان فعالیت زیادی داشتند. ادامه روند آزمایشات با استفاده از این میکروارگانیسم دنبال شد و نتایج قابل توجهی مخصوصاً در تسکین یبوست مزمن بدست آمد [۶، ۱۲].

اصطلاح پروبیوتیک‌ها اولین بار در سال ۱۹۵۳ بیان شد. بر خلاف آنتی‌بیوتیک‌ها، پروبیوتیک‌ها عواملی میکروبی تعریف می‌شوند که رشد میکروارگانیسم‌های دیگر را تحریک می‌کنند. در سال ۱۹۸۹ اری فولر تعریفی از پروبیوتیک‌ها بیان کرد که بطور گسترده‌ای مورد استفاده قرار گرفت: مکمل غذایی میکروبی زنده‌ای که با بهبود توازن میکروبی در روده، اثرات مطلوبی را در میزبان خود ایجاد می‌نماید. تعریف فولر بر لزوم قابلیت زیستی پروبیوتیک‌ها تاکید کرده و جنبه اثر سلامت بخش روی میزبان را بیان می‌کند [۶، ۱۳].

برای بررسی فعالیت ضد باکتریایی (ضد پاتوژن) باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، از محیط مولر هیتون آگار استفاده شد. برای این منظور از روش چاهک^۳ برای تعیین میزان مهارکنندگی باکتری‌های اسید لاکتیکی استفاده شد و اثر آنتاگونیستی این باکتری‌ها بر سویه‌های پاتوژن مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد. در روش چاهک، از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری-زای کشت داده شده در محیط نوترینت برات (۰/۵ مک فارلند) با سوآپ استریل روی محیط مولر هیتون آگار کشت داده شد. سپس با استفاده از سیلندر استریل چاهک‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر روی محیط ایجاد کرده و از مایع رویی یا (سوپرناتانت) باکتری لاکتوباسیلوس کازئی و نیز مقادیر ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم LPE در هر چاهک تلقیح شد. در تست بررسی اثرات ممانعت‌کنندگی از رشد پاتوژن عصاره تام، از ۱۰۰ میکرولیتر عصاره تام یا سوپرناتانت باکتری استفاده شد. بعد از خشک شدن محیط، پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. سپس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیکی علیه هر یک از باکتری‌های بیماری‌زا توسط خط کش میلی‌متری، اندازه گیری و ثبت گردید [۶، ۲۱].

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل از این مطالعه توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ انجام شد. برای آزمون اختلاف میانگین در چند گروه کیفی از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد. برای افزایش میزان معنی‌داری از آزمون Post Hoc Tukey استفاد شد که نشان دهنده بیشترین اختلاف معناداری می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

نتایج حاصل از بررسی اثرات ممانعت‌کنندگی عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

بر روی باکتری پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا

Table 1- The diameter of non-growth halo resulting from the effect of total extract and LPE as well as common antibiotics on halo diameter on *Pseudomonas aeruginosa* in millimeters (n=3)

آگار کشت داده شد. کلونی باکتری رشد کرده روی آگار به محیط MRS مایع انتقال داده شده و به صورت شبنه کشت داده شد. سپس مقدار ۱ میلی لیتر از کشت شبنه در ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت تازه MRS مجدداً کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با دور ۲۵۰×rpm گرمخانه-گذاری شدند. جذب نوری محیط کشت به صورت دوره‌ای در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد تا میزان جذب محیط کشت باکتری به یک برسد. بعد از خالص‌سازی کلنی-ها، با تست‌های بیوشیمیایی، تخمیر قندها، مطالعات میکروسکوپی، رشد در دمای ۴۵، ۳۷، ۱۵ درجه سانتیگراد، باکتری لاکتوباسیلوس کازئی شناسایی و تأیید شد [۱۸].

تهیه عصاره تام و LPE^۱ از محیط کشت باکتری لاکتوباسیلوس کازئی

لاکتوباسیلوس کازئی خالص شده در محیط MRS both، در شرایط کم هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شد تا کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند بدست آید. برای تهیه سوپرناتانت کشت، باکتری‌ها به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد با دور ۳۵۰۰×rpm سانتریفیوژ شدند. سپس با استفاده از روش لیوفیلیزاسیون به صورت عصاره خشک و پایدار پروبیوتیکی یا LPE بدست آمد [۱۸، ۱۹].

آماده‌سازی باکتری‌های پاتوژن

سویه‌های باکتریایی زیر به صورت آمپول لیوفیلیزه استاندارد و خالص از مرکز پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و پس از تهیه و کشت در محیط نوترینت برات با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند به عنوان پاتوژن مورد استفاده قرار گرفتند [۲۰]:

۱- استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431)

۲- سودوموناس آئروژینوزا (PTCC 27853)

۳- سالمونلا تیفی موریوم (PTCC 1639)

۴- اشرشیا کلی (PTCC 1399)

بررسی فعالیت ضد میکروبی

³ Well Diffusion Agar

1 Lyophilized Probiotic Extract

Bacteria	Antibacterial agent	Average	Standard deviation (±SD)
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	18.66	3.51
	Gentamicin	17.66	0.57
	Meropenem	20	4.58
	Total extract	18.33	1.15
	LPE (200 µg)	25.00	1.00
	LPE (400 µg)	22.33	0.57
	LPE (600 µg)	20	1.52

نتایج حاصل از بررسی اثرات ممانعت کنندگی عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر روی باکتری پاتوژن
اشریشیا کلی

Table 2- The diameter of non-growth halo resulting from the effect of total extract and LPE as well as common antibiotics on halo diameter on *Escherichia coli* in millimeters (n=3)

Bacteria	Antibacterial agent	Average	Standard deviation (±SD)
<i>E. coli</i>	Ciprofloxacin	0	0.00
	Imipenem	6	4
	Trimethoprim	9.33	3.05
	Total extract	12.66	2.08
	LPE (200 µg)	14.33	1.15
	LPE (400 µg)	16.66	0.57
	LPE (600 µg)	13.33	0.57

نتایج حاصل از بررسی اثرات ممانعت کنندگی عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر روی باکتری پاتوژن
سالمونلا تیفی موریوم

Table 3- The diameter of non-growth halo resulting from the effect of total extract and LPE as well as common antibiotics on halo diameter on *Salmonella Typhimurium* in millimeters (n=3)

Bacteria	Antibacterial agent	Average	Standard deviation (±SD)
<i>S. Typhimurium</i>	Streptomycin	19	6
	Gentamicin	22	2
	Trimethoprim	5.66	5.5
	Total extract	12.66	2.08
	LPE (200 µg)	13.66	0.57
	LPE (400 µg)	16.33	1.15
	LPE (600 µg)	15.33	0.57

نتایج حاصل از بررسی اثرات ممانعت کنندگی عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی بر روی باکتری پاتوژن
استافیلوکوکوس اورئوس

Table 4- The diameter of the non-growth halo resulting from the effect of total extract and LPE and also the common antibiotic methicillin on *Staphylococcus aureus* in millimeters (n=3)

Bacteria	Antibacterial agent	Average	Standard deviation (±SD)
<i>S. aureus</i>	Methicillin	0.66	1.15
	Total extract	13.33	2.88
	LPE (200 µg)	16.66	0.57
	LPE (400 µg)	17.66	1.52
	LPE (600 µg)	26	1.00

توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ضد میکروبی وجود دارد. به منظور بررسی دقیق تر و مقایسه دو به دوی آنتی بیوتیک ها، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا عبارتی آزمون LSD آورده شده است.

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی عوامل آنتی باکتریال بر روی باکتری پاتوژن سودوموناس آئروژینوزا
با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا می

Table 5. The results of comparison of halo diameter for two by two antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*

Bacteria	Antibacterial agent 1	Antibacterial agent 2	Average differences	Standard error	Significant
<i>P. aeruginosa</i>	Imipenem	Gentamicin	2.00000	1.91899	0.315
		Meropenem	-1.33333	1.91899	0.499
		Total extract	.33333	1.91899	0.865
		LPE (200 µg)	-6.33333*	1.91899	0.005
		LPE (400 µg)	-3.66667	1.91899	0.077
		LPE (600 µg)	-1.66667	1.91899	0.400
	Gentamicin	Imipenem	-2.00000	1.91899	0.315
		Meropenem	-3.33333	1.91899	0.104
		Total extract	-1.66667	1.91899	0.400
		LPE (200 µg)	-8.33333*	1.91899	0.001
		LPE (400 µg)	-5.66667*	1.91899	0.010
		LPE (600 µg)	-3.66667	1.91899	0.077
	Meropenem	Imipenem	1.33333	1.91899	0.499
		Gentamicin	3.33333	1.91899	0.104
		Total extract	1.66667	1.91899	0.400
		LPE (200 µg)	-5.00000*	1.91899	0.021
		LPE (400 µg)	-2.33333	1.91899	0.244
		LPE (600 µg)	-.33333	1.91899	0.865
	Total Extract	Imipenem	-.33333	1.91899	0.865
		Gentamicin	1.66667	1.91899	0.400
		Meropenem	-1.66667	1.91899	0.400
		LPE (200 µg)p.	-6.66667*	1.91899	0.004
		LPE (400 µg)	-4.00000	1.91899	0.056
		LPE (600 µg)	-2.00000	1.91899	0.315
	LPE (200 µg)	Imipenem	6.33333*	1.91899	0.005
		Gentamicin	8.33333*	1.91899	0.001
		Meropenem	5.00000*	1.91899	0.021
		Total Extract	6.66667*	1.91899	0.004
		LPE (400 µg)	2.66667	1.91899	0.186
		LPE (600 µg)	4.66667*	1.91899	0.029

LPE (400 µg)	Imipenem	3.66667	1.91899	0.077
	Gentamicin	5.66667*	1.91899	0.010
	Meropenem	2.33333	1.91899	0.244
	Total Extract	4.00000	1.91899	0.056
	LPE (200 µg)	-2.66667	1.91899	0.186
	LPE (600 µg)	2.00000	1.91899	0.315
LPE (600 µg)	Imipenem	1.66667	1.91899	0.400
	Gentamicin	3.66667	1.91899	0.077
	Meropenem	.33333	1.91899	0.865
	Total Extract	2.00000	1.91899	0.315
	LPE (200 µg)	-4.66667*	1.91899	0.029
	LPE (400 µg)	-2.00000	1.91899	0.315

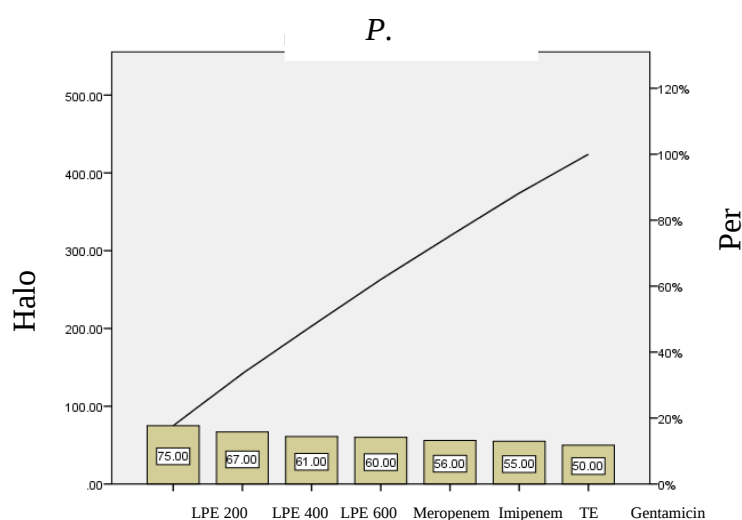


Figure 1- Prato diagram (ranking) to compare the killing power of antibacterial agents, gentamicin, imipenem, meropenem, total extract and LPE in concentrations of 200, 400 and 600 µg of *L. casei* supernatant against *P. aeruginosa*

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی عوامل آنتی

باکتریال بر روی باکتری پاتوژن/استافیلوکوکوس اورئوس

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا می توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ممانعت کنندگی عوامل آنتی باکتریال وجود دارد. به منظور بررسی دقیق تر و مقایسه دو به دو آنتی بیوتیک های مورد استفاده، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا عبارتی آزمون LSD آورده شده است.

همانطور که در جدول ۵ و شکل ۱ دیده می شود، بیشترین قدرت ضد میکروبی مربوط به LPE400 می باشد. تفاوت LPE400 با دیگر گروه های ضد میکروبی معنادار می باشد ($P < 0.05$). به عبارتی می توان گفت که LPE400 مقایسه با سایر عوامل ضد میکروبی شامل آنتی بیوتیک های جنتامایسین، عصاره تام پروبیوتیک، ایمی پنم و مروپنم، LPE200 (غلظت ۲۰۰ میکروگرم) از پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بیشترین قدرت ممانعت کنندگی را در برابر باکتری سودوموناس آئروژینوزا دارا بود.

Table 6. The results of comparison of halo diameter for two by two antibiotics on *S. aureus*

Bacteria	Antibacterial agent 1	Antibacterial agent 2	Average differences	Standard error	Significant
<i>S. aureus</i>	Total extract	LPE 200	-3.33333*	1.33333	0.031
		LPE 400	-4.33333*	1.33333	0.009
		LPE 600	-12.66667*	1.33333	0.000
		Methicillin	12.66667*	1.33333	0.000
	LPE 200	Total extract	3.33333*	1.33333	0.031
		LPE 400	-1.00000	1.33333	0.471
		LPE 600	-9.33333*	1.33333	0.000
		Methicillin	16.00000*	1.33333	0.000
	LPE 400	Total extract	4.33333*	1.33333	0.009
		LPE 200	1.00000	1.33333	0.471
		LPE 600	-8.33333*	1.33333	0.000
		Methicillin	17.00000*	1.33333	0.000
	LPE 600	Total extract	12.66667*	1.33333	0.000
		LPE 200	9.33333*	1.33333	0.000
		LPE 400	8.33333*	1.33333	0.000
		Methicillin	25.33333*	1.33333	0.000
	Methicillin	Total extract	-12.66667*	1.33333	0.000
		LPE 200	-16.00000*	1.33333	0.000
		LPE 400	-17.00000*	1.33333	0.000
		LPE 600	-25.33333*	1.33333	0.000

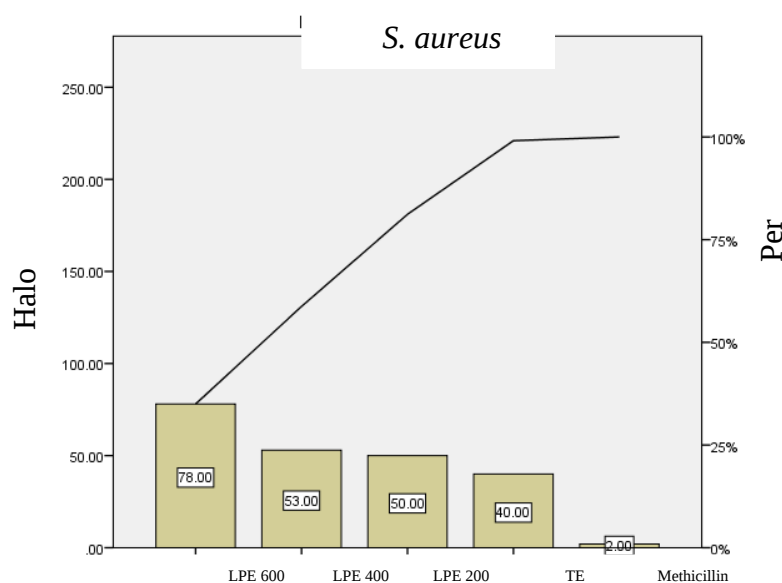


Figure 2- Prato diagram (ranking) to compare the killing power of antibacterial agents, Methicillin, total extract and LPE in concentrations of 200, 400 and 600 μg of *L. casei* supernatant against *S. aureus*

ضدمیکروبی معنادار می‌باشد ($P < 0.05$). به عبارتی می‌توان گفت که در مقایسه با سایر عوامل ضدمیکروب شامل آنتی بیوتیک متی سیلین که باکتری / استافیلوکوکوس اورئوس در برابر آن مقاومت

همانطور که در جدول ۶ و شکل ۲ دیده می‌شود، بیشترین قدرت ضدمیکروبی مربوط به LPE600 می‌باشد. تفاوت LPE600 با دیگر گروه‌های

توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ممانعت‌کنندگی عوامل ضد میکروبی وجود دارد. به منظور بررسی دقیق‌تر و مقایسه دو به دوی آنتی بیوتیک‌های مورد استفاده، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا عبارتی آزمون LSD آورده شده است.

از خود نشان داده است، عوامل پروبیوتیک حاصل از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* چه به صورت عصاره تام و چه به صورت LPE قدرت ممانعت‌کنندگی بالاتری دارد. همچنین هر چه غلظت ماده مؤثره در LPE بیشتر باشد، قدرت ضد میکروبی بالاتری را به دست می‌دهد.

مقایسه اثرات ممانعت‌کنندگی عوامل آنتی باکتریال بر روی باکتری پاتوژن *سالمونلا تیفی*

موریوم

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می‌باشد، لذا می

Table 7. The results of comparison of halo diameter for two by two antibiotics on *S. Typhimurium*

Bacteria	Antibacterial agent 1	Antibacterial agent 2	Average differences	Standard error	Significant
<i>S. typhimurium</i>	Gentamicin	Total extract	9.33333*	2.70214	0.004
		LPE (200 µg)	8.33333*	2.70214	0.008
		LPE (400 µg)	5.66667	2.70214	0.055
		LPE (600 µg)	6.66667*	2.70214	0.027
		Streptomycin	3.00000	2.70214	0.286
		Trimethoprim	16.33333*	2.70214	0.000
	Total Extract	Gentamicin	-9.33333*	2.70214	0.004
		LPE 200	-1.00000	2.70214	0.717
		LPE 400	-3.66667	2.70214	0.196
		LPE 600	-2.66667	2.70214	0.340
		Streptomycin	-6.33333*	2.70214	0.034
		Trimethoprim	7.00000*	2.70214	0.021
	LPE 200	Gentamicin	-8.33333*	2.70214	0.008
		Total Extract	1.00000	2.70214	0.717
		LPE 400	-2.66667	2.70214	0.340
		LPE 600	-1.66667	2.70214	0.547
		Streptomycin	-5.33333	2.70214	0.068
		Trimethoprim	8.00000*	2.70214	0.010
	LPE 400	Gentamicin	-5.66667	2.70214	0.055
		Total Extract	3.66667	2.70214	0.196
		LPE 200	2.66667	2.70214	0.340
		LPE 600	1.00000	2.70214	0.717
		Streptomycin	-2.66667	2.70214	0.340
		Trimethoprim	10.66667*	2.70214	0.001
	LPE 600	Gentamicin	-6.66667*	2.70214	0.027
		Total Extract	2.66667	2.70214	0.340
		LPE 200	1.66667	2.70214	0.547
		LPE 400	-1.00000	2.70214	0.717
		Streptomycin	-3.66667	2.70214	0.196
		Trimethoprim	9.66667*	2.70214	0.003
	Streptomycin	Gentamicin	-3.00000	2.70214	0.286
		Total Extract	6.33333*	2.70214	0.034
		LPE 200	5.33333	2.70214	0.068
		LPE 400	2.66667	2.70214	0.340
		LPE 600	3.66667	2.70214	0.196
		Trimethoprim	13.33333*	2.70214	0.000
	Trimethoprim	Gentamicin	-16.33333*	2.70214	0.000
		Total Extract	-7.00000*	2.70214	0.021
		LPE 200	-8.00000*	2.70214	0.010
		LPE 400	-10.66667*	2.70214	0.001
		LPE 600	-9.66667*	2.70214	0.003
		Streptomycin	-13.33333*	2.70214	0.000

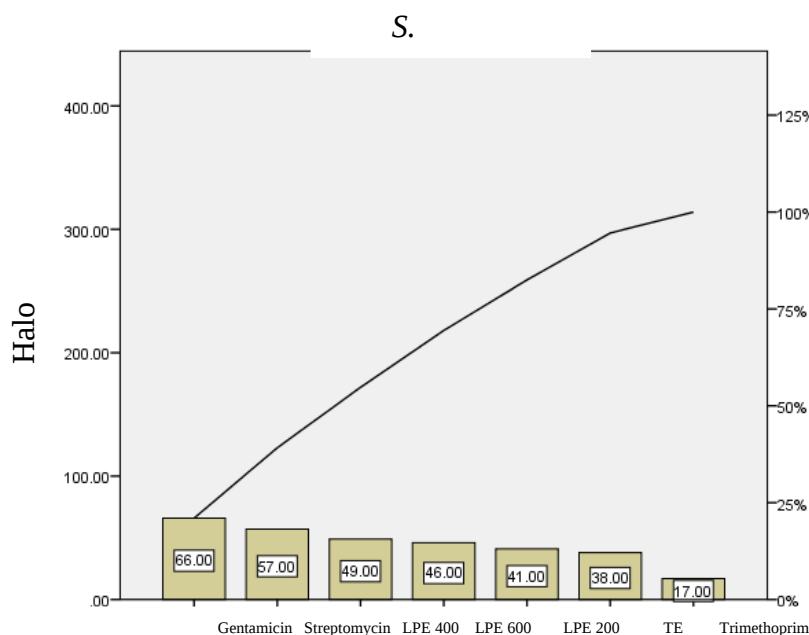


Figure 3-Prato diagram (ranking) to compare the killing power of antibacterial agents, Gentamicin, Streptomycin, Trimethoprim, total extract and LPE in concentrations of 200, 400 and 600 μg of *L. casei* supernatant against *S. Typhimurium*

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی عوامل ضد میکروبی

روی باکتری پاتوژن/شرشیا کلی

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا می توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ممانعت کنندگی عوامل ضد میکروبی وجود دارد. به منظور بررسی دقیق تر و مقایسه دو به دوی آنتی بیوتیک های مورد استفاده، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا عبارتی آزمون LSD آورده شده است.

همانطور که در جدول ۷ و شکل ۳ دیده می شود، بیشترین قدرت ضد میکروبی مربوط به آنتی بیوتیک جنتامایسین و استرپتومایسین می باشد ($P < 0.05$). آنتی بیوتیک تری متوپریم، در مقایسه با عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، از قدرت ممانعت کنندگی کمتری برخوردار بود. می توان گفت که آنتی بیوتیک جنتامایسین از قدرت ممانعت کنندگی بهتر و عملکرد مناسب تری در برابر باکتری سالمونلا تیفی موریوم برخوردار است.

Table 8. The results of comparison of halo diameter for two by two antibiotics on *E. coli*

Bacteria	Antibacterial agent 1	Antibacterial agent 2	Average differences	Standard error	Significant
<i>E. coli</i>	Imipenem	Total extract	-6.66667*	1.73663	0.002
		LPE (200 μg)	-8.33333*	1.73663	0.000
		LPE (400 μg)	-10.66667*	1.73663	0.000
		LPE (600 μg)	-7.33333*	1.73663	0.001
		Trimethoprim	-3.33333	1.73663	0.076
		Ciprofloxacin	6.00000*	1.73663	0.004
	Total extract	Imipenem	6.66667*	1.73663	0.002
		LPE (200 μg)	-1.66667	1.73663	0.353
		LPE (400 μg)	-4.00000*	1.73663	0.037
		LPE (600 μg)	-6.66667	1.73663	0.707

	Trimethoprim	3.33333	1.73663	0.076
	Ciprofloxacin	12.66667*	1.73663	0.000
LPE 200	Imipenem	8.33333*	1.73663	0.000
	Total extract	1.66667	1.73663	0.353
	LPE (400 µg)	-2.33333	1.73663	0.200
	LPE (600 µg)	1.00000	1.73663	0.574
	Trimethoprim	5.00000*	1.73663	0.012
	Ciprofloxacin	14.33333*	1.73663	0.000
LPE 400	Imipenem	10.66667*	1.73663	0.000
	Total extract	4.00000*	1.73663	0.037
	LPE (200 µg)	2.33333	1.73663	0.200
	LPE (600 µg)	3.33333	1.73663	0.076
	Trimethoprim	7.33333*	1.73663	0.001
	Ciprofloxacin	16.66667*	1.73663	0.000
LPE 600	Imipenem	7.33333*	1.73663	0.001
	Total extract	.66667	1.73663	0.707
	LPE (200 µg)	-1.00000	1.73663	0.574
	LPE (400 µg)	-3.33333	1.73663	0.076
	Trimethoprim	4.00000*	1.73663	0.037
	Ciprofloxacin	13.33333*	1.73663	0.000
Trimethoprim	Imipenem	3.33333	1.73663	0.076
	Total extract	-3.33333	1.73663	0.076
	LPE (200 µg)	-5.00000*	1.73663	0.012
	LPE (400 µg)	-7.33333*	1.73663	0.001
	LPE (600 µg)	-4.00000*	1.73663	0.037
	Ciprofloxacin	9.33333*	1.73663	0.000
Ciprofloxacin	Imipenem	-6.00000*	1.73663	0.004
	Total extract	-12.66667*	1.73663	0.000
	LPE (200 µg)	-14.33333*	1.73663	0.000
	LPE (400 µg)	-16.66667*	1.73663	0.000
	LPE (600 µg)	-13.33333*	1.73663	0.000
	Trimethoprim	-9.33333*	1.73663	0.000

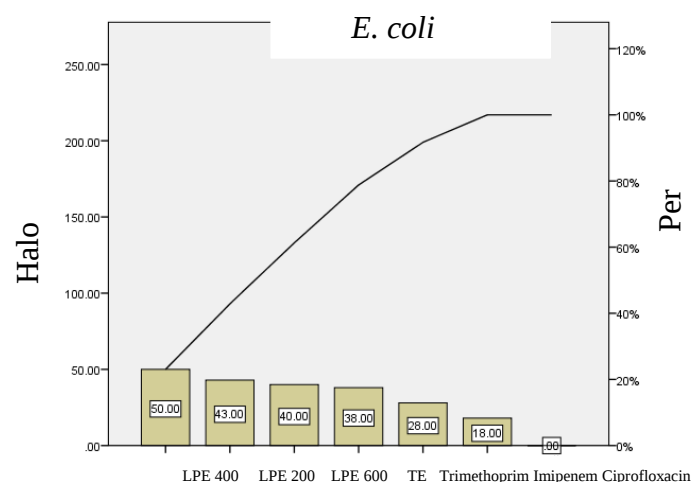


Figure 4-Prato diagram (ranking) to compare the killing power of antibacterial agents, Trimethoprim, Imipenem, Ciprofloxacin, total extract and LPE in concentrations of 200, 400 and 600 µg of *L. casei* supernatant against *E. coli*

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی عصاره تام

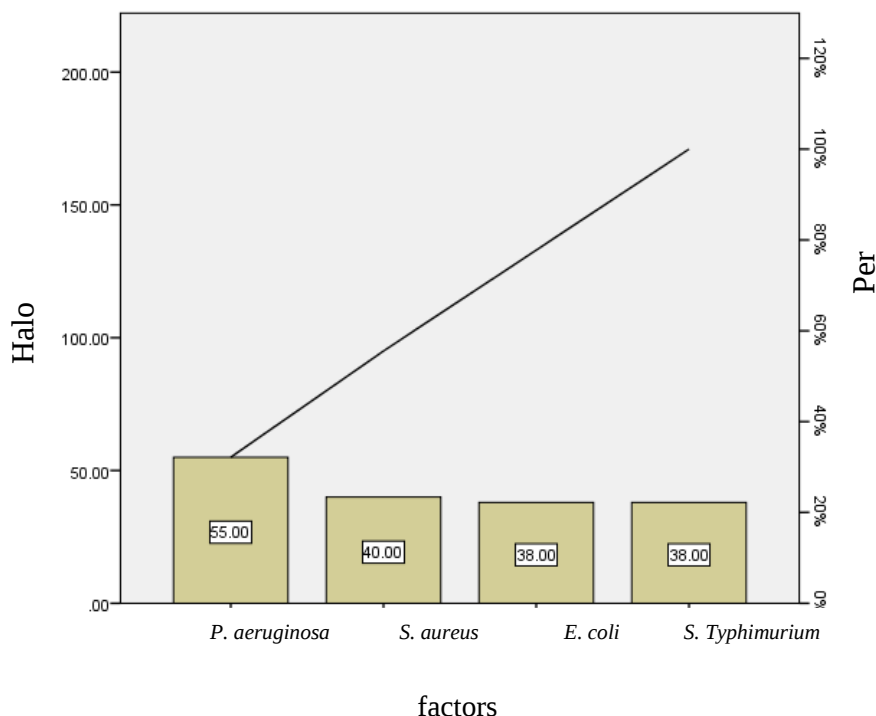
پروبیوتیک روی باکتری های مختلف

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا می توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ممانعت کنندگی عصاره تام لاکتوباسیلوس کازئی در برابر عوامل پاتوژن وجود دارد. به منظور بررسی دقیق تر و مقایسه دو به دوی باکتری های مورد استفاده، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا بعبارتی آزمون LSD آورده شده است.

همانطور که در جدول ۸ و شکل ۴ دیده می شود، بیشترین قدرت ضد میکروبی مربوط به آنتی بیوتیک جنتامایسین و استرپتومایسین می باشد ($P < 0.05$). آنتی بیوتیک تری متوپریم، در مقایسه با عصاره تام و LPE باکتری لاکتوباسیلوس کازئی، از قدرت ممانعت کنندگی کمتری برخوردار بود. می توان گفت که آنتی بیوتیک جنتامایسین از قدرت ممانعت کنندگی بهتر و عملکرد مناسبتری در برابر باکتری /شرشیا کلی برخوردار است.

Table 9-Results of the comparison of the halo diameter of the total extract antibiotic for two pairs of bacteria

Antibacterial	Bacteria 1	Bacteria 2	Average differences	Standard error	Significant
Total extract	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	5.00000*	1.74801	0.021
		<i>S. Typhimurium</i>	5.66667*	1.74801	0.012
		<i>E. coli</i>	5.66667*	1.74801	0.012
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-5.00000*	1.74801	0.021
		<i>S. Typhimurium</i>	.66667	1.74801	0.713
		<i>E. coli</i>	.66667	1.74801	0.713
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-5.66667*	1.74801	0.012
		<i>S. aureus</i>	-.66667	1.74801	0.713
		<i>E. coli</i>	.00000	1.74801	1.000
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-5.66667*	1.74801	0.012
		<i>S. aureus</i>	-.66667	1.74801	0.713
		<i>S. Typhimurium</i>	.00000	1.74801	1.000

Figure 5- Prato chart (ranking) to compare the inhibitory power of *L. casei* total extract on pathogenic

می توان نتیجه گرفت که تفاوت معناداری بین قدرت ممانعت کنندگی LPE200 در برابر عوامل پاتوژن مختلف وجود دارد. به منظور بررسی دقیق تر و مقایسه دو به دوی باکتری های مورد استفاده، در ادامه نتایج آزمون تعقیبی (post-hoc) و یا عبارتی آزمون LSD آورده شده است.

همانطور که در جدول ۹ و شکل ۵ دیده می شود، حساسیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به دیگر عوامل پاتوژن نسبت به عصاره تام پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر می باشد ($P < 0.05$).

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی LPE (۲۰۰)

میکروگرم) روی باکتری های مختلف

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا

Table 10-Results of comparing the halo diameter of LPE 200 antibiotic for bacteria two by two

Antibacterial	Bacteria 1	Bacteria 2	Average differences	Standard error	Significant
LPE 200	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	8.33333*	0.70711	0.000
		<i>S. Typhimurium</i>	11.33333*	0.70711	0.000
		<i>E. coli</i>	10.66667*	0.70711	0.000
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-8.33333*	0.70711	0.000
		<i>S. Typhimurium</i>	3.00000*	0.70711	0.003
		<i>E. coli</i>	2.33333*	0.70711	0.011
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-11.33333*	0.70711	0.000
		<i>S. aureus</i>	-3.00000*	0.70711	0.003
		<i>E. coli</i>	-.66667	0.70711	0.373
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-10.66667*	0.70711	0.000

<i>S. aureus</i>	-2.33333*	0.70711	0.011
<i>S. Typhimurium</i>	0.66667	0.70711	0.373

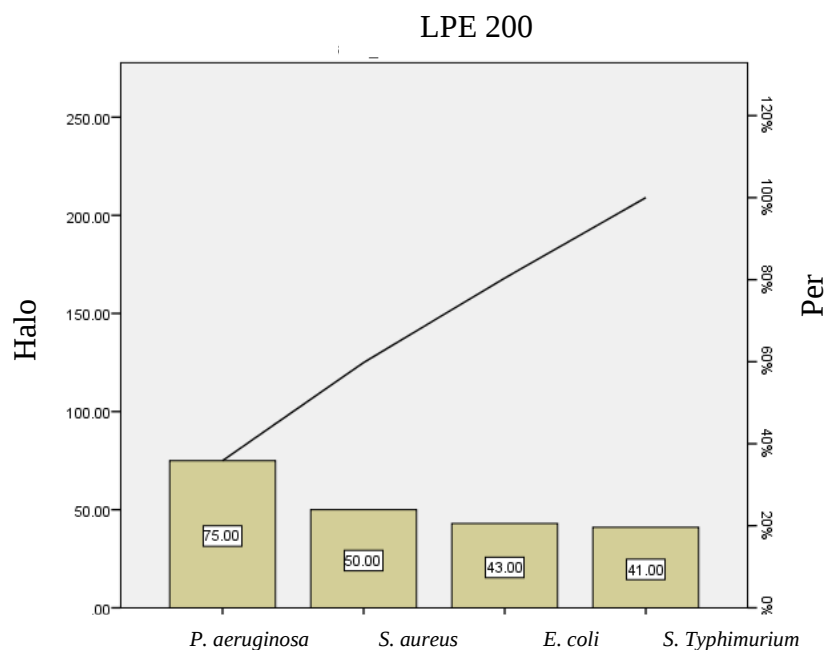


Figure 6 - Prato chart (ranking) to compare the inhibitory power of LPE 200 of *L. casei* on pathogenic agents

همانطور که در جدول ۱۰ و شکل ۶ دیده می شود، حساسیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به دیگر عوامل پاتوژن در برابر LPE200 لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر می باشد ($P < 0.05$).

مقایسه اثرات ممانعت کنندگی LPE (۴۰۰) میکروگرم) بر روی باکتری های مختلف

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می باشد، لذا می

Table 11-Results of comparing the halo diameter of LPE 400 antibiotic for bacteria two by two

Antibacterial	Bacteria 1	Bacteria 2	Average differences	Standard error	Significant
LPE 400	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	4.66667*	0.84984	0.001
		<i>S. Typhimurium</i>	6.00000*	0.84984	0.000
		<i>E. coli</i>	5.66667*	0.84984	0.000
		<i>P. aeruginosa</i>	-4.66667*	0.84984	0.001
	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	1.33333	0.84984	0.155
		<i>E. coli</i>	1.00000	0.84984	0.273
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-6.00000*	0.84984	0.000
		<i>S. aureus</i>	-1.33333	0.84984	0.155

	<i>E. coli</i>	-.33333	0.84984	0.705
	<i>P. aeruginosa</i>	-5.66667*	0.84984	0.000
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	-1.00000	0.84984	0.273
	<i>S. Typhimurium</i>	.33333	.84984	0.705

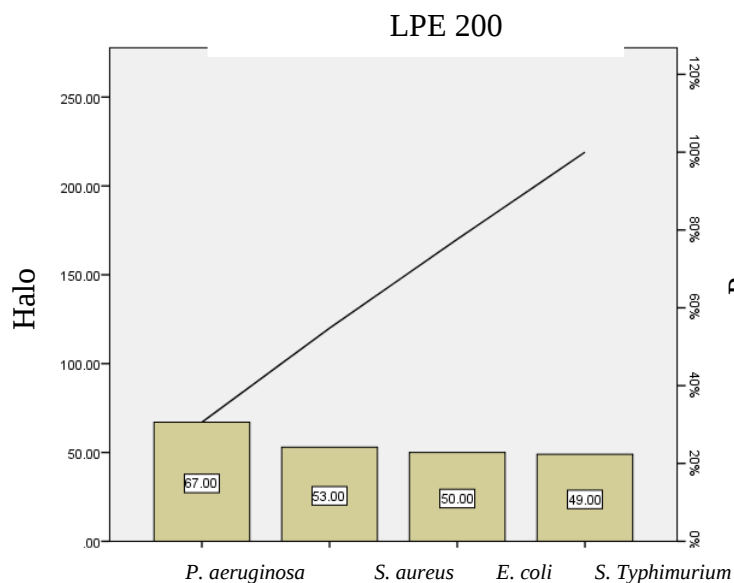


Figure 7- Prato chart (ranking) to compare the inhibitory power of LPE 200 *L. casei* on pathogenic agents

همانطور که در جدول ۱۱ و شکل ۷ دیده می‌شود، حساسیت باکتری سودوموناس آئروژینوزا نسبت به دیگر عوامل پاتوژن در برابر LPE400 لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر می‌باشد ($P < 0.05$).
مقایسه اثرات ممانعت کنندگی LPE (۶۰۰)

میکروگرم) بر روی باکتری‌های مختلف

با توجه به اینکه معناداری به دست آمده کوچکتر از سطح معناداری استاندارد ($p < 0.05$) می‌باشد، لذا می

Table 12-Results of the comparison of the diameter of the non-growth halo obtained from LPE 600 for two pairs of pathogens

Antibacterial	Bacteria 1	Bacteria 2	Average differences	Standard error	Significant
LPE 600	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	-5.66667*	0.81650	0.000
		<i>S. Typhimurium</i>	5.00000*	0.81650	0.000
		<i>E. coli</i>	7.00000*	0.81650	0.000
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	5.66667*	0.81650	0.000
		<i>S. Typhimurium</i>	10.66667*	0.81650	0.000
		<i>E. coli</i>	12.66667*	0.81650	0.000
	<i>S. Typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>	-5.00000*	0.81650	0.000
		<i>S. aureus</i>	-10.66667*	0.81650	0.000
		<i>E. coli</i>	2.00000*	0.81650	0.040

	<i>P. aeruginosa</i>	-7.00000*	0.81650	0.000
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	-12.66667*	0.81650	0.000
	<i>S. Typhimurium</i>	-2.00000*	0.81650	0.040

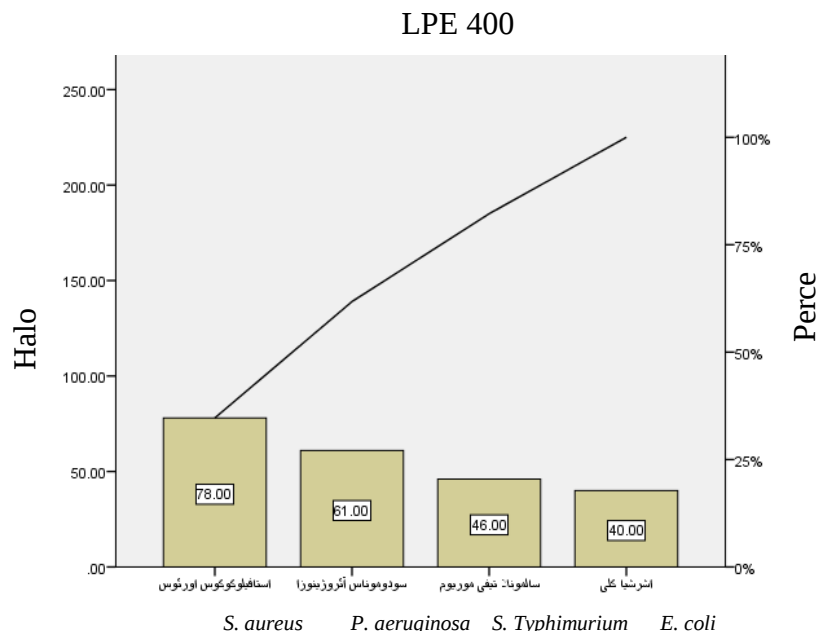


Figure 6 - Frato chart (ranking) to compare the inhibitory power of LPE 400 *L. casei* on pathogenic agents

نسبت به آنتی بیوتیک‌ها قدرت ممانعت کنندگی قوی‌تری داشت.

عصاره LPE همچنین در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم، اثر ممانعت کنندگی قوی‌تری نسبت به آنتی بیوتیک تری متوپریم در مهار باکتری *سالمونلا تایفی موریوم* داشت. ولی از آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و استرپتومایسین ضعیف‌تر بودند. بیشترین قطر هاله عدم رشد در پروبیوتیک‌ها مربوط به LPE400 با میانگین قطر هاله ۱۶ میلی‌متر بود که در مقایسه با قطر هاله جنتامایسین که ۲۲ میلی‌متر بود ضعیف‌تر بود.

عصاره LPE در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم، اثر ممانعت کنندگی قوی‌تری نسبت به آنتی بیوتیک‌های تری متوپریم، ایمپی پنم و سیپروفلوکسازین که بیشترین کاربرد را در درمان عفونت‌های اشریشیاکلی دارند را داراست. حتی

همانطور که در جدول ۱۲ و شکل ۸ دیده می‌شود، حساسیت باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به دیگر عوامل پاتوژن در برابر LPE600 لاکتوباسیلوس کازئی بیشتر می‌باشد ($P < 0.05$).

عصاره‌های خشک پروبیوتیک یا LPE در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم، اثر ممانعت کنندگی قوی‌تری نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. به طوریکه بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به LPE200 با میانگین قطر ۲۵ میلی‌متر بود.

از طرفی عصاره LPE در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ میکروگرم، اثر ممانعت کنندگی قوی‌تری نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های ناشی از *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد. بطوریکه بیشترین قطر هاله عدم رشد مربوط به LPE600 با میانگین قطر ۲۶ میلی‌متر بود. عصاره تام لاکتوباسیلوس کازئی

شدند. خاصیت ضد میکروبی مایع رویی کشت آنها علیه عوامل بیماری‌زای باکتریایی به کمک روش دیسک و چاهک مورد بررسی قرار گرفت. به منظور کاهش خطا هر آزمون سه بار تکرار شد و قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و توانایی ضد میکروبی آنها با هم مقایسه شد. از نمونه‌های ماست و قرص پروبیوتیکی شش گونه باکتری اسید لاکتیک شناسایی شد. این باکتری‌ها توان ضد میکروبی خوبی در مقابل هفت باکتری بیماری‌زا از خود نشان دادند. بیشترین اثر مهار کنندگی را لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بر علیه باسیلوس سرئوس طی روش چاهک با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۴ میلی‌متر از خود نشان داد. همچنین در مقایسه دو روش دیسک و چاهک، روش چاهک روشی به مراتب حساس‌تر از روش دیسک بود. طی این مطالعه، متابولیت‌های تولیدی توسط باکتری‌های اسید لاکتیک، توانستند از رشد باکتری-های بیماری‌زا جلوگیری کنند [۲۲].

سعادت‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۳، تحقیقاتی روی عصاره پروبیوتیکی بدست آمده از لاکتوباسیلوس کازئی انجام دادند، که اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی عصاره پروبیوتیکی، مورد مطالعه قرار گرفت. این گروه تحقیقاتی جهت افزایش پایداری و ماندگاری از عصاره پروبیوتیکی بدست آمده پروسه‌ی لیوفیلیزاسیون استفاده نمودند و ثابت کردند که قدرت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی این عصاره که به اختصار LPE خوانده شده است، حدود ۱۰ برابر افزایش می‌یابد. در طول این مطالعه محتوی اسیدلاکتیک عصاره پروبیوتیکی بعنوان شاخص بیولوژیک مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۳].

فرح بخش و همکاران در سال ۱۳۹۲، در تحقیق خود به جداسازی لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک از ماست‌های سنتی مناطق روستایی رفسنجان و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها پرداخت. در این تحقیق ۴ نمونه ماست محلی از چهار منطقه روستایی تهیه و با استفاده از

عصاره تام نیز قدرت ممانعت کنندگی بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک‌های رایج در درمان عفونت‌های ناشی از *شرشیا کلی* دارد.

نتایج همچنین ثابت می‌کند که بیشترین قدرت ممانعت کنندگی برای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* مربوط به LPE در غلظت ۲۰۰ میکروگرم بود و بیشترین قدرت ممانعت کنندگی برای باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مربوط به LPE در غلظت ۶۰۰ میکروگرم بود.

بیشترین قدرت ممانعت کنندگی برای باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* مربوط به آنتی بیوتیک‌های جنتامایسین و استرپتومایسین بود. البته قدرت ممانعت کنندگی LPE و عصاره تام لاکتوباسیلوس کازئی از تری متوپریم قوی‌تر بود.

بیشترین قدرت ممانعت کنندگی برای باکتری *شرشیا کلی* مربوط به LPE در غلظت ۴۰۰ میکروگرم بود.

عصاره تام پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی بیشترین قدرت ممانعت کنندگی را بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشت.

LPE در غلظت‌های ۲۰۰ و ۴۰۰ بیشترین قدرت ممانعت کنندگی را بر روی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند.

LPE در غلظت ۶۰۰ میکروگرم بیشتر قدرت ممانعت کنندگی را بر روی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و سپس *سودوموناس آئروژینوزا* داشت.

مطابق یافته‌های این مطالب می‌توان به مطالعات بسیاری اشاره نمود که طی سال‌های اخیر توسط تیم-های تحقیقاتی انجام شده از جمله کاظمی درستی و همکاران در سال ۱۳۸۹ در تحقیق خود به بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری‌های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم) پرداختند. در این مطالعه از نمونه ماست و قرص پروبیوتیکی، باکتری‌های اسید لاکتیک جداسازی و به کمک روش‌های بیوشیمیایی شناسایی

منظور کاهش خطا، هر آزمون حداقل سه بار تکرار گردید و میانگین قطر هاله عدم رشد روی محیط مولر هیتون آگار اندازه گیری و ثبت شد و خاصیت آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک با هم مقایسه گردید. بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوکوکوس لاکتیس* در روش چاهک بود و حداکثر میانگین قطر هاله عدم رشد آن‌ها ۱۸ میلی‌متر ارزیابی شد. بیشترین کمترین اثر مهاري بر علیه باکتری‌های پاتوژن به ترتیب روی *یرسینیا/توکولیتیکا* و *باسیلوس سرئوس* مشاهده شد. به طور کلی نتیجه این بررسی نشان داد که هر دو جنس *لاکتوباسیلوس* و *لاکتوکوک* اثر مهاري مناسبی روی باکتری‌های بیماری‌زای روده دارند. ولی *لاکتوباسیل*‌های موجود در ماست‌های محلی استان گلستان نسبت به *لاکتوکوک*‌ها توانایی بیشتری در مقابله با پاتوژن‌ها از خود نشان دادند و این اثر مهاري روی *یرسینیا/توکولیتیکا* مشهودتر بود [۲۵].

چاووشی فروشانی و همکاران در سال ۱۳۹۰، در تحقیق خود به بررسی اثرات ضد میکروبی جسم سلولی و مایع رویی *لاکتوباسیلوس کازئی* جدا شده از ماست بر ضد *شریشیا کلی* O157:H7 پرداخت. باکتری *شریشیا کلی* در کشورهای در حال توسعه یکی از عوامل مهم اسهال می‌باشد. لذا توجه به درمان آن ضروری است. به علت بروز مقاومت‌های دارویی از بین رفتن فلور طبیعی روده و القای تولید وروتوکسین توسط این باکتری در اثر مصرف برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها، نیاز به روش‌های نوین درمانی است. در تحقیق آنها *لاکتوباسیلوس کازئی* از ماست جداسازی شده و اثر جسم سلولی و مایع رویی حاصل از کشت آن بر روی باکتری پاتوژن فوق بررسی شد. مایع رویی حاصل از کشت سویه‌های مورد مطالعه، در حرارت ۵۶ تا ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ و ۶۰ دقیقه پایدار بودند و نیز در مقابل

محیط کشت اختصاصی (MRS)، روش‌های غربالگری انتخابی، تست کاتالاز و تست‌های بیوشیمیایی مربوطه *لاکتوباسیلوس*‌های پروبیوتیک جداسازی شدند. پس از جداسازی، با استفاده از روش دیسک دیفیوژن و چاهک، اثرات ضد باکتریایی این پروبیوتیک‌ها بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای شایعی همچون *استافیلوکوکوس اورئوس*، *شریشیا کلی*، *استرپتوکوک پیوژنز* و *پروتئوس ولگاریس* بررسی شد. از ۴۰ نمونه ماست محلی، در مرحله اول ۳۳ سویه باکتری مقاوم به اسید جداسازی شد و در مراحل بعدی نهایتاً ۹ سویه با مقاومت زیاد به اسید و املاح صفراوی جداسازی شدند. این باکتری‌ها شامل: *لاکتوباسیلوس‌های کازئی* (در دو محل)، *رامنسس*، *پلانتاروم*، *اسیدوفیلوس*، *بولگاریس*، *دلبروکی*، *فرمتوم*، و برویس همه سویه‌های پروبیوتیکی قادر به از بین بردن باکتری‌های بیماری‌زا شدند و بیشترین اثر ضد باکتریایی از *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* مشاهده شد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان داد که امکان وجود باکتری‌های پروبیوتیک با فعالیت ضد باکتریایی بر علیه بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا در ماست‌هایی که به صورت سنتی تهیه می‌شوند وجود دارند و می‌توان از آن‌ها در تولید فرآورده‌های لبنی صنعتی استفاده کرد [۲۴].

کیانی و همکاران در سال ۱۳۸۵، در تحقیق خود به بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا پرداختند. در این تحقیق از ۹۶ سویه باکتری لاکتیک جدا شده از ۳۴ نمونه ماست محلی بر علیه ۷ گونه مهم پاتوژن-های گوارشی به خصوص *شیگلا دیسانتری*، *یرسینیا/تروکولیکیتیکا*، *شریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی* موریوم با دو روش انتشار در آگار به کمک دیسک و روش چاهک با استفاده از محلول روئی تهیه شده از محیط کشت باکتری‌ها بررسی گردید. قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک و چاهک اندازه گیری شد و به

۴- نتیجه گیری کلی

با توجه به نتایج تحقیق، می توان چنین نتیجه گرفت که عصاره خشک پروبیوتیکی حاصل از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای قدرت ممانعت کنندگی بسیار مناسب بر ضد بسیاری از عوامل پاتوژن مهم در عفونت ها می باشند. به نظر می رسد که این عامل پروبیوتیک، قادر باشد عفونت های ناشی از پاتوژن های شایعی همچون *سودوموناس آئروژینوزا*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تایفی* و *شرشیا کلی* را مهار نموده و در مهار مقاومت های میکروبی رخ داده نسبت به آنتی بیوتیک ها، نقش موثری داشته باشد. هرچند، جهت کسب نتایج قطعی، تحقیقات بیشتری مورد نیاز است.

۵- تقدیر و تشکر

از همکاری صمیمانه آزمایشگاه کنترل دارو و غذای دانشکده داروسازی اهواز که در انجام این تحقیق نهایت همکاری را داشتند، کمال تشکر را دارم.

pH های ۳ تا ۱۰ پایدار بودند. حداقل غلظت کشنده و مهار کننده رشد مایع رویی *لاکتوباسیلوس* ها با استفاده از روش رقت در لوله به ترتیب رقت ۱/۱۶ و ۱/۸ بود. با توجه به نتایج بدست آمده، می توان از مایع رویی به عنوان نگهدارنده بیولوژیکی در صنایع غذایی استفاده کرد. همچنین به علت اثر ضد باکتریایی *لاکتوباسیلوس کازئی*، می تواند در درمان بیماری های ناشی از اشریشیاکلی مورد استفاده قرار گیرد [۲۶].

اوکانا و همکاران در سال ۲۰۰۴، در تحقیق خود فعالیت میکروبی و تولید باکتریوسین دو سویه پروبیوتیک *لاکتوکوکوس پلانتراروم* و *لاکتوباسیلوس* برویس را روی چند پاتوژن بررسی کردند که بیشترین اثر مهار کنندگی روی *باسیلوس سرئوس* (۸-۱۰ میلی متر) مشاهده شد. نتایج دیگر شامل اثر ممانعت کنندگی روی *شرشیا کلی* (۸-۶ میلی متر)، *یرسینیا ائروکولیتیکا* (۷-۶ میلی متر) بود [۲۷].

۵- منابع

- [۱] Ghazanfari N, Fallah S, Vasiee A, Yazdi FT. Optimization of fermentation culture medium containing food waste for l-glutamate production using native lactic acid bacteria and comparison with industrial strain. *LWT*. 2023;184:114871.
- [۲] Vasiee A, Falah F, Sankian M, Tabatabaei-Yazdi F, Mortazavi SA. Oral immunotherapy using probiotic ice cream containing recombinant food-grade *Lactococcus lactis* which inhibited allergic responses in a BALB/c mouse model. *Journal of Immunology Research*. 2020;2020.
- [۳] Behbahani BA, Noshad M, Vasiee A, Brück WM. Probiotic *Bacillus* strains inhibit growth, biofilm formation, and virulence gene expression of *Listeria monocytogenes*. *LWT*. 2024;191:115596.
- [۴] Falah F, Vasiee A, Tabatabaei-Yazdi F, Moradi S, Sabahi S. Optimization of γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Lactobacillus* spp. from agro-food waste. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2024 Feb;14(3):3425-37.
- [۵] Falah F, Zareie Z, Vasiee A, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B. Production of synbiotic ice-creams with *Lactobacillus brevis* PML1 and inulin: functional characteristics, probiotic viability, and sensory properties. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2021;15:5537-46.
- [۶] Behbahani BA, Noshad M, Vasiee A, Brück WM. Probiotic *Bacillus* strains inhibit growth, biofilm formation, and virulence gene expression of *Listeria monocytogenes*. *LWT*. 2024 Jan 1;191:115596.
- [۷] Falah F, Vasiee A, Alizadeh Behbahani B, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA. Optimization of gamma-aminobutyric acid production by *Lactobacillus brevis* PML1 in dairy sludge-based culture medium through response surface methodology. *Food science & nutrition*. 2021;9:3317-26.
- [۸] Gomes BC, Rodrigues MR, Winkelstroter LK, Nomizo A, de Martinis EC. In vitro evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei*. *Journal of food protection*. 2012;75:1083-9.
- [۹] Alebooye P, Falah F, Vasiee A, Yazdi FT, Mortazavi SA. Spent coffee grounds as a potential culture medium for γ -aminobutyric acid (GABA) production by *Levilactobacillus brevis* PML1. *Lwt*. 2023;189:115553.
- [۱۰] Rouhi A, Falah F, Azghandi M, Behbahani BA, Mortazavi SA, Tabatabaei-Yazdi F, et al. Investigating the effect of *Lactiplantibacillus plantarum* TW57-4 in preventing biofilm formation and expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* ATCC 191. *LWT*. 2024;191:115669.
- [۱۱] Kanmani P, Satish Kumar R, Yuvaraj N, Paari K, Pattukumar V, Arul V. Probiotics and its functionally valuable products—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2013;53:641-58.
- [۱۲] Mancuskova T, Medved'ova A, Ozbolt M. The medical functions of probiotics and their role in clinical nutrition. *Current Nutrition & Food Science*. 2018;14:3-10.
- [۱۳] Dobrogosz WJ, Peacock TJ, Hassan HM. Evolution of the probiotic concept: from conception to validation and acceptance in medical science. *Advances in applied microbiology*. 2010;72:1-41.
- [۱۴] Gogineni VK, Morrow LE, Gregory PJ, Malesker MA. Probiotics: history and evolution. *J Anc Dis Prev Rem*. 2013;1:1-7.
- [۱۵] Khaled JM. Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection :A review article. *Saudi journal of biological sciences*. 2021;28:865-9.
- [۱۶] Fenneman AC, Weidner M, Chen LA, Nieuwdorp M, Blaser MJ. Antibiotics in the pathogenesis of diabetes and inflammatory diseases of the gastrointestinal tract. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2023;20:81-100.
- [۱۷] de Souza ZN, de Moura DF, de Almeida Campos LA, Córdula CR,

Cavalcanti IMF. Antibiotic resistance profiles on pathogenic bacteria in the Brazilian environments. Archives of Microbiology. 2023;205:185.

[۱۸] Falah F, Vasiee A, Behbahani BA, Yazdi FT, Moradi S, Mortazavi SA, et al. Evaluation of adherence and anti-infective properties of probiotic *Lactobacillus fermentum* strain 4-17 against *Escherichia coli* causing urinary tract infection in humans. Microbial pathogenesis. 2019;131:246-53.

[۱۹] Vasiee A, Yazdi FT, Mortazavi A, Edalatian M. Isolation, identification and characterization of probiotic *Lactobacilli* spp. from Tarkhineh. 2014.

[۲۰] Yazdi FT, Behbahani BA, Vasiee A, Mortazavi SA, Yazdi FT. An investigation on the effect of alcoholic and aqueous extracts of *Dorema aucheri* (Bilhar) on some pathogenic bacteria in vitro. Archives of Advances in Biosciences. 2015;6.

[۲۱] Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Gholian MM, Zendeboodi F, Vasiee A. Antimicrobial effect of Carboxy Methyl Cellulose (CMC) containing aqueous and ethanolic *Eucalyptus camaldulensis* L. leaves extract against *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis*. Archives of Advances in Biosciences. 2014;5.

[۲۲] کاظمی درسنگی ر، قائمی ن، میرپور م. س. بررسی فعالیت ضد میکروبی باکتری های اسید لاکتیک جدا شده از محصولات پروبیوتیکی (لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم) (۲۰۱۱).

[۲۳] Saadatzaheh A, Fazeli MR, Jamalifar H, Dinarvand R. Probiotic properties of lyophilized cell free extract of *Lactobacillus casei*. Jundishapur journal of natural pharmaceutical products. 2013;8:131.

[۲۴] فرح بخش م، حکیمی ب، ذوالفقاری د. جداسازی لاکتوباسیل های پروبیوتیک از ماست های سنتی مناطق روستایی رفسنجان و بررسی اثرات ضد میکروبی آن ها- ۱۳۹۱. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان. ۲۰۱۳ Dec 10;12(9):733-46.

[۲۵] کیانی ا، مظفری نا، الادب حس، جندقی ن، قائمی عا. اثر آنتاگونیستی باکتری های لاکتیک جدا شده از ماست بر علیه باکتری های بیماریزا. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان. ۱۳۸۵؛ ۱.

[۲۶] چاووشی فروشانی م، ایمانی فولادی ع، سعادت مند س. اثرات ضد میکروبی جسم سلولی و مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی جدا شده از ماست بر ضد اشریشیاکلی H7: O157. مجله دانشگاه علوم پزشکی اردبیل. ۲۰۱۱؛ ۱۱.

[۲۷] Ocaña VS, Nader-Macías ME. Production of antimicrobial substances by lactic acid bacteria II: screening bacteriocin-producing strains with probiotic purposes and characterization of a *Lactobacillus* bacteriocin. Public Health Microbiology: Methods and Protocols. 2004:347-53.

 Scientific Research Homepage: www.fsct.modares.ir	Journal of Food Science and Technology (Iran)
---	--

***In vitro* comparison of antimicrobial effect of probiotic extract from
Lactobacillus casei with current antibiotics on four strains of pathogenic bacteria**

Afrooz Saadatzaheh^{1*}, Reza Honarmand², Sahar Gholipour²,

1-Assistant Professor, Ph.D. of Pharmaceutics, Department of Food and Drug Control, Faculty of Pharmacy,
Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

2- MD of Pharmacy, Department of Food and Drug Control, Faculty of Pharmacy, Jundishapur University of
Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2024/5/4 Accepted:2024/7/3 Keywords: Probiotic, Antibiotic, Pathogen DOI: 10.22034/FSCT.21.157.100. *Corresponding Author E- afsaadat@gmail.com	The purpose of this study was to investigate the activity of probiotic extract achieved from <i>Lactobacillus casei</i> against the growth of 4 standard drug-resistant bacterial strains and to compare its antimicrobial effect with some common antibiotics <i>in vitro</i>. <i>L. casei</i> was cultured in standard MRS medium and under anaerobic conditions. Probiotic dry extract was extracted after separating the mass of living cells by centrifugation and stabilized by lyophilization. The investigation of antimicrobial activity was done using the diffusion-disc method, the results were analyzed using SPSS software with a significance level of $P<0.05$. There was a significant difference between all antimicrobial agents ($P<0.05$). The findings showed that LPE was able to control resistant pathogenic bacteria. The highest inhibitory effect of LPE was evaluated against <i>Staphylococcus aureus</i> with a diameter of 26 mm of non-growth halo and on the other hand, the lowest effect was evaluated against <i>Escherichia coli</i> with a diameter of 13.3 mm of non-growth halo. Although LPE had the greatest effect compared to antibiotic agents against 3 bacterial strains, it was weaker than gentamicin and streptomycin in the case of <i>Salmonella typhi</i>. Despite the significant antibacterial effects of LPE against several strains of gram-negative and gram-positive bacteria, more studies are necessary before its clinical administration and to prove its beneficial role in the treatment of infectious diseases.