

Effect of Bacteriocin Produced by *Lactobacillus casei* with Probiotic Potential Isolated from Milk on the Ability of Biofilm Production by *Streptococcus salivarius* Obtained from Dental Plaque

Mohammad Mehdi Soltan Dallal^{1,2},
 Mohammad Reza Afradi³,
 Zahra Rajabi⁴,
 Katayoon Samimirad⁵,
 Youssef Erfani⁶

¹ Professor, Division of Food Microbiology, Department of Pathobiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

² Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ MSc in Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ PhD in Microbiology, Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Virology, School of Public Health, Tehran University of Medical Science, Tehran, Iran

⁶ Assistant Professor, Department of Medical Laboratory Sciences, School of Allied Medical Sciences, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

(Received June 16, 2020 ; Accepted February 1, 2021)

Abstract

Background and purpose: Dental plaque is a biofilm that is formed on the surface of the tooth. Carious lesions are caused by inappropriate ecological changes in microbial flora of the plaque biofilm. In this study, the effect of *Lactobacillus casei* bacteriocin, isolated from dairy products, was investigated on *Streptococcus salivarius* biofilm formation.

Materials and methods: In this experimental study, MRS Broth and MRS Agar medium were used to isolate three strains of *Lactobacillus casei* probiotic from milk samples under microaerophilic conditions. The initial identification of *Lactobacillus casei* was performed by sugar fermentation and other biochemical tests. Then, 16SrRNA encoding gene was confirmed by PCR and sequenced. At last, Bacteriocin was isolated by ammonium sulfate sedimentation and its molecular weight was measured by SDS-PAGE and the antimicrobial activities were investigated. The *Streptococcus salivarius* were isolated from dental plaque and phenotypically and biotypically identified. Molecular confirmation of the isolates was performed using gtfK specific gene by PCR. The ability to form *Streptococcus salivarius* biofilm and the effect of bacteriocin on biofilm formation were measured by microtiter plate.

Results: After partial purification of *Lactobacillus casei* probiotic from dairy products, two LC3 and LC1 protein samples formed bands (35-40 kDa and about 75 kDa, respectively). The supernatant fluid from the cultivation of *Lactobacillus casei* and bacteriocins showed antibacterial effects against *Streptococcus salivarius* isolates from dental plaque and the formation of biofilm by this bacterium.

Conclusion: According to this study, bacteriocin and supernatant fluid from *Lactobacillus casei* cultures could inhibit the growth of *Streptococcus salivarius* and also reduced biofilm formation, so, it could be used in oral care products.

Keywords: probiotics, *Lactobacillus casei*, bacteriocin, biofilm, tooth decay, *Streptococcus salivarius*, dental plaque

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 31 (196): 23-35 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Mehdi Soltan Dallal- School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran (E-mail: msoltandallal@gmail.com)

بررسی اثر باکتریوسین تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس کازئی* جدا شده از شیر با پتانسیل پروبیوتیکی بر توانایی تشکیل بیوفیلم توسط *استرپتوکوکوس سالیواریوس* جدا شده از پلاک دندانی

محمد مهدی سلطان دلال^{1,2}

محمد رضا افرادی³

زهرار جبی⁴

کتایون صمیمی راد⁵

یوسف عرفانی⁶

چکیده

سابقه و هدف: پلاک دندان در واقع یک بیوفیلم است که در سطح دندان ایجاد می‌شود. ضایعات پوسیدگی به علت تغییرات اکولوژیکی نامناسب در فلور میکروبی بیوفیلم پلاک، ایجاد می‌شود. در این مطالعه اثر باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیک جدا شده از شیر بر تشکیل بیوفیلم توسط *استرپتوکوکوس سالیواریوس* مورد بررسی قرار گرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی، جداسازی 3 سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیک از نمونه‌های شیر غنی‌سازی و کشت در محیط MRS Agar و MRS Broth در جار شمع‌دار (Candle jar) صورت گرفت. شناسایی اولیه *لاکتوباسیلوس کازئی* با تست‌های تخمیری قند و سایر تست‌های بیوشیمیایی مربوطه صورت پذیرفت، سپس با PCR و سکانس 16srDNA توالی‌های به دست آمده، تایید شد. تخلیص نسبی باکتریوسین از روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم انجام و وزن مولکولی آن به وسیله SDS-PAGE اندازه‌گیری و فعالیت آن سنجیده شد. جدایه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* از پلاک دندانی جداسازی و به صورت فتوتیپی و بیوتیپی شناسایی شدند. تایید مولکولی جدایه‌های به دست آمده با استفاده از ژن اختصاصی gtfK با روش PCR انجام شد. توانایی تشکیل بیوفیلم *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و بررسی اثر باکتریوسین بر تشکیل بیوفیلم با میکروتیتراپلست سنجیده شد.

یافته‌ها: پس از تخلیص نسبی باکتریوسین 3 سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیک جداسازی شده از شیر، در سنجش وزن مولکولی آن‌ها به روش SDS-PAGE دو نمونه LC3 و LC1 باندهایی به ترتیب با وزن مولکولی 35 تا 40 کیلوالتون و حدود 75 کیلوالتون تشکیل دادند. مایع رویی حاصل از کشت *لاکتوباسیلوس کازئی* و باکتریوسین‌ها، اثرات ضدباکتریایی علیه جدایه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* از پلاک دندانی و تشکیل بیوفیلم توسط این باکتری را نشان دادند. **استنتاج:** طبق نتایج این مطالعه باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کازئی* توانایی مهار رشد *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و نیز کاهش تشکیل بیوفیلم را دارند و جایگزین مناسبی برای استفاده در صنایع بهداشت دهان می‌باشند.

واژه‌های کلیدی: پروبیوتیک، *لاکتوباسیلوس کازئی*، باکتریوسین، بیوفیلم، *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، پلاک دندانی

مقدمه

بیماری‌های پریدنتال و پوسیدگی دندان یکی از شایع‌ترین و مهم‌ترین مشکلات بهداشتی در سراسر جهان است. درمان این بیماری‌ها یا عوارض آن‌ها ممکن است نیاز به استفاده سیستمیک داروهای ضد میکروبی

مؤلف مسئول: محمد مهدی سلطان دلال - تهران: بلوار کشاورز، خ قدس، خ پورسینا، دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت E-mail: msoltandallal@gmail.com

1. استاد، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

2. مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

3. کارشناس ارشد میکروب شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

4. دکتری میکروب شناسی، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

5. دانشیار، گروه ویروس شناسی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

6. استادیار، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

تاریخ دریافت: 1399/3/27 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/5/1 تاریخ تصویب: 1399/11/13

داشته باشد، که باعث عوارض جانبی دستگاه گوارش به دلیل طیف وسیع آنتی‌بیوتیک‌ها، ایجاد مقاومت باکتریایی و واکنش‌های آلرژیک می‌شود (1). استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان عفونت‌ها منجر به ایجاد سویه‌های مقاوم در برابر میکروب‌ها می‌شود و این امر بیماران را در معرض خطر افزایش رشد باکتری‌های بیماری‌زا قرار می‌دهد. از این‌رو، نیاز فوری به رویکرد درمان جایگزین برای عفونت وجود دارد. این تمرکز جدید منجر به ظهور پری‌بیوتیک‌ها و یا پروبیوتیک‌ها برای مزایای بهداشتی درمانی شده است. به‌طور سنتی، پیش و پروبیوتیک‌ها به سمت ایجاد مزایای بهداشتی برای دستگاه گوارش متمرکز شده‌اند (2). با این حال در سال‌های اخیر، استفاده از هر کدام (یا هر دو) پری‌بیوتیک و پروبیوتیک برای کاربردهای غیر از گوارشی مانند درمان عفونت ادراری، نگهداری و سلامت پوست و در محصولات بهداشت دهان و دندان برای محافظت در برابر پوسیدگی دندان نیز به کار گرفته شده است (3).

پلاک باکتریایی یک اصطلاح عمومی است که تجمع میکروارگانیسم‌ها (عمدتاً باکتری‌ها) را که در ماتریکس پلیمری از بافت‌های بزاق و باکتری‌هایی که در سطوح دندان قرار دارد و در نقش بیماری‌زای پوسیدگی دندان و بیماری‌های پرودنتال نقش مهمی ایفا می‌کند، توصیف می‌کند. استرپتوکوک‌های دهانی اولین گونه تشکیل‌دهنده پلاک هستند. استرپتوکوکوس سنگوئیس یکی از اولین عوامل تشکیل و بلوغ پلاک باکتری است. استرپتوکوکوس سالیواریوس یک کلونیزه‌کننده معمولی از سطوح مخاطی دهان به ویژه در قسمت پشتی زبان، مخاط و بزاق است. استرپتوکوکوس موتانس و استرپتوکوکوس سالیواریوس نقش مهمی در رشد و بلوغ پوسیدگی دارند. خواص پوسیدگی‌زایی این باکتری‌ها به تولید گلوکان‌های نامحلول از ساکارز، توانایی آن‌ها در اتصال به سطوح دندان و تولید اسید آن‌ها بستگی دارد (۵،۴). پوسیدگی در کودکان به‌علت مصرف مکرر مواد قندی به‌خصوص هنگام شب مربوط

به عادات فرهنگی و اقتصادی جامعه و تربیت خانوادگی می‌باشد. از چهار فاکتور (میزبان، رژیم غذایی، میکروارگانیسم، زمان)، فاکتور میکروارگانیسم‌های مولد پوسیدگی، نوع و تعداد به‌عنوان عامل مهم پوسیدگی ثابت شده است (6). موثر بودن گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس به عنوان پروبیوتیک در تعداد زیادی از مطالعات به اثبات رسیده است و این باکتری‌ها به عنوان پروبیوتیک در صنعت غذا و نیز به عنوان عامل پیشگیری‌کننده استفاده شده‌اند (۸،۷). در حال حاضر فرآورده‌های پروبیوتیکی مختلفی در جهان تولید و عرضه می‌شوند که محصولات لبنی از محصولاتی هستند که به‌عنوان یک فرآورده پروبیوتیک بالقوه توجه زیادی به خود جلب کرده‌اند. این محصولات پروبیوتیک علاوه بر تامین باکتری‌های زنده، مواد مغذی با ارزشی همچون کلسیم و پپتیدهای بیولوژیک در اختیار بدن قرار می‌دهند (۱۰،۹). با توجه به مکانیسم رقابت و مهار باکتری‌های بیماری‌زا توسط استرپتوکوکوس‌های ویریدانس، می‌توان از متابولیت‌های لاکتوباسیلوس‌هایی که دارای توان پروبیوتیکی هستند برای ممانعت از تشکیل پلاک دندان با استفاده از سویه‌هایی با اثر مهاري بیش‌تر، در محصولات دارویی و بهداشتی مانند، خمیردندان‌ها، دهان‌شویه‌ها و خوراکی‌های پروبیوتیکی جهت از بین بردن پلاک دندان استفاده نمود (11).

هدف از این مطالعه بررسی اثر باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی با پتانسیل پروبیوتیکی جدا شده از شیر بر بیوفیلم تشکیل شده ناشی از استرپتوکوکوس سالیواریوس به‌دست آمده از پلاک دندان می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری

این مطالعه مقطعی طی 6 ماه با دو مرحله نمونه‌برداری انجام شد. مرحله اول نمونه‌گیری و کشت از شیر جهت جداسازی لاکتوباسیلوس کازئی (12) و مرحله دوم نمونه‌برداری از پلاک دندان جهت جداسازی

استرپتوکوکوس سالیواریوس (13) صورت گرفت. جهت جداسازی لاکتوباسیلوس کازئی با توان پروبیوتیکی، نمونه‌های مواد لبنی از سطح مراکز عرضه در شهر تهران تهیه شد. جمع‌آوری نمونه پلاک دندان از پلاک‌های تشکیل شده بر روی دندان و ضایعات پوسیدگی دندان توسط دندانپزشک از مراجعین درمانگاه دانشکده دندانپزشکی علوم پزشکی تهران انجام شد. 85 نمونه پلاک دندان در لوله‌های حاوی محیط ترانسپورت (PBS) قرار داده شده و در دمای مناسب نگهداری و به آزمایشگاه بخش میکروب‌شناسی انتقال داده شد. سویه‌های استاندارد لاکتوباسیلوس کازئی ATCC 39392 با قدرت تولید باکتریوسین و سویه استرپتوکوکوس سالیواریوس ATCC: 13419 ایجادکننده بیوفلم از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران و نیز انستیتو پاستور ایران تهیه شد.

جداسازی لاکتوباسیلوس کازئی از نمونه شیر

پس از نمونه‌گیری، نمونه‌ها طی دو ساعت در شرایط زنجیره سرد به آزمایشگاه منتقل و جهت غنی‌سازی و کشت اولیه یک میلی‌لیتر از آن‌ها به 9 میلی‌لیتر محیط MRS Broth افزوده شدند و 24 ساعت در جار شمعدار (Candle jar) با دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس نمونه‌ها روی پلیت MRS Agar کشت داده و پلیت‌ها به مدت 48 ساعت در Candle jar و دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس بر روی کلنی‌های مشکوک تست‌های تکمیلی اولیه جهت جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از جمله رنگ‌آمیزی گرم (بررسی مورفولوژی)، کاتالاز (توانایی تجزیه هیدروژن پراکسید (H₂O₂) به آب و اکسیژن در تنفس هوازی) انجام شد. باکتری‌های باسیلی شکل، گرم مثبت و کاتالاز منفی جداسازی و پس از تهیه کشت خالص به عنوان جدایه‌های محتمل به لاکتوباسیلوس جهت انجام مراحل بعدی در محیط نگهدارنده MRS Broth حاوی 20

درصد گلیسرول در فریزر 20- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند (14).

انجام تست‌های بیوشیمیایی جهت تشخیص گونه‌های لاکتوباسیلوس

برای بررسی پروفایل تخمیری کربوهیدرات‌ها از 13 قند (مرک، آلمان) استفاده شد. این قندها شامل ال-آرابینوز، سلوبیوز، سوربیتول، ساکارز، رافینوز، گالاکتوز، گزیلوز، ریوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانوز و ملیبوز بودند. جهت انجام این تست از محیط MRS Broth اصلاح شده (فاقد گلکز) به عنوان محیط پایه قندی استفاده شد (جدول شماره 1 و 2 و 3).

جدول شماره 1: میزان مقاومت لاکتوباسیلوس کازئی در شرایط اسیدی و صفرا

سویه	مقاومت به شرایط اسیدی pH 2		مقاومت به صفرا (Cinh)
	h ₀	h ₃	
LC1	2/4×10 ⁹	4/4×10 ⁹	0/04
LC2	2/4×10 ⁷	1/2×10 ⁹	0/40
LC3	1/4×10 ⁸	2/2×10 ⁸	0/1

جدول شماره 2: قطر هاله عدم رشد باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی بر علیه سویه‌های استرپتوکوکوس سالیواریوس

قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس سالیواریوس			سویه <i>Lactobacillus casei</i>
Str 3	Str 2	*Str 1	
7mm	17mm	11mm	باکتریوسین LC1
7mm	15mm	10mm	باکتریوسین LC3

*Str مخفف *Streptococcus salivarius* می‌باشد

جدول شماره 3: تعیین MIC و MBC باکتریوسین LC1 و LC3 بر استرپتوکوکوس سالیواریوس

غلظت		باکتری‌بیماری‌زا	نمونه باکتریوسین
MBC	MIC		
0/20	0/1	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC: 13419	باکتریوسین LC1
0/20	0/20	<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC: 13419	باکتریوسین LC3

سپس برای هر یک از قندها محیط پایه قندی با غلظت 0/5 درصد تهیه شد و 200 میکرولیتر از هر محیط پایه قندی در شرایط استریل، به چاهک‌های میکروپلیت 96 خانه اضافه شد. از یک سویه لاکتوباسیلوس برویس که قبلاً با روش توالی‌یابی ژن

16SrDNA مورد شناسایی و تأیید قرار گرفته بود، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. محیط پایه قندی حاوی معرف برموکروزل پرپل (مرک، آلمان) می باشد که در pH برابر 6 تا 6/4 در محیط اولیه، باعث بنفش شدن رنگ محیط می شود. در صورتی که جدایه مورد نظر قند را تخمیر نماید، تولید اسید نموده و باعث تغییر رنگ محیط به زرد می شود. سپس تست هیدورلیز آرژنین و رشد در دماهای 15 و 45 درجه سانتی گراد جهت تکمیل تست های فنوتیپی انجام شد.

تایید مولکولی لاکتوباسیلوس کازنی

تایید تشخیص جدایه ها در سطح گونه با روش توالی یابی ژن 16S rDNA انجام گرفت. استخراج DNA با روش جوشاندن (boiling) انجام شد (15). جهت انجام PCR از یک جفت پرایمر 27F (5'-CTCGTTGCGGGACTTAA-3') و 1522R (5'-GCAGCAGTAGGGAATCTTC-3') استفاده شد، سویه لاکتوباسیلوس کازنی ATCC به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد و محصولات PCR توالی یابی و در NCBI بلاست شدند (16).

بررسی توان پروبیوتیکی ایزوله های لاکتوباسیلوس

برای بررسی مقاومت جدایه های لاکتوباسیلوس به شرایط اسیدی ابتدا جدایه ها در محیط MRS Broth (شارلو، اسپانیا) کشت داده شدند و به مدت 48 ساعت در شرایط candle jar و دمای 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. سپس غلظت باکتری های موجود در این محیط کشت، حدود 10^9 CFU/ml تنظیم شد.

مقاومت به شرایط اسیدی

یک میلی لیتر از این محیط کشت که حاوی حدود 10^9 CFU/ml باکتری بود را به 9 میلی لیتر PBS Saline (phosphate buffered) دارای pH برابر 2 اضافه شد. جهت تنظیم pH از 0/1 HCL نرمال (مرک،

آلمان) استفاده شد. در زمان صفر (کنترل) جهت شمارش تعداد باکتری های موجود (CFU) در PBS، با استفاده از روش رقت سازی کشت بر روی MRS آگار تهیه شد. جدایه هایی از لاکتوباسیلوس کازنی که در pH برابر 2 زنده مانده و تعداد کلنی شمارش شده آنها کم تر از 10^6 CFU/ml نبود، به عنوان مقاوم به اسید نظر گرفته شدند (17، 18).

مقاومت به نمک های صفراوی

جدایه هایی از لاکتوباسیلوس کازنی که شرایط اسیدی را تحمل نموده اند، جهت بررسی مقاومت به نمک صفراوی (Oxgall) انتخاب شدند. جهت انجام این تست از روش Gilliland and Walker استفاده شد (18). برای هر جدایه دو لوله، یکی حاوی MRS Broth دارای 0/3 درصد (W/V) نمک صفراوی Oxgall (سیگما-آلدریچ، آلمان) و دیگری حاوی 9 میلی لیتر MRS Broth بدون Oxgall (کنترل) در نظر گرفته شد. به هر دو لوله مقدار 1 درصد (90 میکرولیتر) از کشت تازه جدایه لاکتوباسیلوس به هر لوله MRS Broth اضافه شد و لوله ها در جار شمع دار در 37 درجه سانتی گراد گرماگذاری شدند. میزان رشد جدایه ها در زمان 0 و 8 ساعت توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 630 نانومتر اندازه گرفته شد. مقاومت جدایه ها به صفرا با فرمول ضریب مهار (Cinh) محاسبه گردید. جدایه های با ضریب مهار کم تر از 0/4، مقاوم به صفرا در نظر گرفته شدند (17).

جداسازی باکتریوسین از لاکتوباسیلوس کازنی جدا شده به منظور بررسی اثر باکتریوسین تولید شده از لاکتوباسیلوس علیه سویه های استرپتوکوکوس سالیواریوس، این باکتری ها توسط رسوب دهی با آمونیوم سولفات تغلیظ و تخلیص نسبی شدند. بدین منظور بعد از کشت سویه های مولد باکتریوسین، خنثی سازی اثر اسید و جداسازی توده میکروبی، باکتریوسین تولید شده توسط رسوب دهی با سولفات آمونیوم،

رسوب داده و تغلیظ شد. سپس باکتریوسین تغلیظ شده دیالیز و فعالیت آن سنجیده شد.

کشت و جداسازی استرپتوکوکوس سالیواریوس از پلاک دهان

نمونه های پلاک دندان پس از هموژنیزه در محیط کشت میتیس سالیواریوس آگار کشت داده شد و 48 ساعت در دمای 37 درجه سانتی گراد در انکوباتور CO_2 دار (Memmert) به مدت 24 ساعت در قرار داده شد. بر روی کلنی های مشکوک تست های بیوشیمیایی هیدرولیز آرژنین، هیدرولیز اسکولین و قندهای گلوکز، مانیتول، لاکتوز، رافینوز، آرژنین، ملویوز و سوریتول انجام شد (18). جهت تایید مولکولی استرپتوکوکوس سالیواریوس بر اساس از ژن اختصاصی *gtfK* و توالی یابی از NCBI استفاده شد. جهت انجام PCR از یک جفت پرایمر 5'GTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG3' و *gtfK* forward primer- 5'CGTTGATGTGCTTGAAAGGGCACCATT *gtfK* reverse primer 3' استفاده شد (19). از سویه استرپتوکوکوس سالیواریوس ATCC: 13419 بعنوان کنترل مثبت استفاده شد.

تشخیص فعالیت ضد میکروبی باکتری لاکتوباسیلوس کازنی با روش نقطه گذاری (Agar spot)

در این روش 10 میکرولیتر از کشت تازه باکتری استرپتوکوکوس سالیواریوس جدا شده در 7 میلی لیتر محیط کشت BHI نیمه جامد (با 0/7 درصد آگار) با دمای 47 درجه سانتی گراد ریخته شد. سپس 5 میکرولیتر از باکتری لاکتوباسیلوس کازنی و باکتریوسین و مایع رویی جدا شده به صورت تکی و توأم در مرکز پلت ها نقطه گذاری شدند. بعد از گذشت 24 ساعت، بررسی تولید هاله عدم رشد توسط باکتریوسین بر علیه سویه استرپتوکوکوس سالیواریوس ثبت گردید (20).

تعیین کم ترین غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازنی

تعیین کم ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) رشد باکتریوسین مورد بررسی با استفاده از روش Microdilution broth در میکروپلیت 96 خانه ای انجام شد. ابتدا درون چاهک ها 100 میکرولیتر محیط کشت MRS Broth ریخته شد. سپس از باکتریوسین سویه لاکتوباسیلوس کازنی 100 میکرولیتر به چاهک اول اضافه شد و سری رقت از آن تهیه شد. به طوری که غلظت نهائی مایع رویی از کشت، در چاهک ها از 1 تا تعیین شد. سپس 100 میکرولیتر از سوپانسیون سلولی از هر کدام از سویه های استرپتوکوکوس سالیواریوس در محیط مولر هیتون برات با رقت $1/5 \times 10^6$ CFU/ml به هر چاهک اضافه شد. این آزمون سه بار تکرار شد و پلیت 96 خانه ای در انکوباتور CO_2 دار 37 درجه سانتی گراد به مدت 24 ساعت گذاشته شد. پس از طی زمان گرماگذاری میزان رشد سویه استرپتوکوکوس سالیواریوس بر اساس تعیین کدورت چاهک ها با استفاده از الیزا ریدر با جذب 590 نانومتر ارزیابی شد. پائین ترین غلظت جلوگیری کننده از رشد استرپتوکوکوس سالیواریوس با مشاهده اولین چاهکی که عدم رشد در آن مشاهده شد و با جذب نوری صفر، به عنوان MIC در نظر گرفته شد (21).

تعیین کم ترین غلظت کشندگی باکتری (MBC) باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازنی

از محتویات چاهک های مختلف که حاوی غلظت های کم تر باکتریوسین بوده و رشد باکتری استرپتوکوکوس سالیواریوس در آن مشاهده نشده بود، به میزان 10 میکرولیتر به محیط بلاد آگار کشت داده شد. تمام آزمایش ها سه بار تکرار شد و میزان MBC به عنوان غلظتی از باکتریوسین که در آن تمام باکتری ها کشته شده بودند، در نظر گرفته شد (21).

یافته ها

از بین 33 جدایه لاکتوباسیلوس کازئی جداسازی شده از مواد لبنی، 7 جدایه لاکتوباسیل کازئی شرایط اسیدی ($\text{pH}=2$) را تحمل نمودند. در مرحله بعدی این 7 سویه مقاوم به اسید از نظر مقاومت به نمک صفراوی 0/3 درصد oxgall، مورد بررسی قرار گرفتند. از بین این جدایه‌ها، نهایتاً 3 سویه مقاوم به هر دو شرایط اسیدی و نمک صفراوی بودند و این سویه‌ها به عنوان سویه‌هایی با پتانسیل پروبیوتیکی تأیید شدند. طبق استاندارد پروبیوتیک‌های ایران، شماره 19459، جدایه‌هایی از لاکتوباسیلوس کازئی که در pH برابر 2 زنده مانده و تعداد کلنی شمارش شده آن‌ها بیش از 10^6CFU/ml بود و نیز جدایه‌هایی که دارای ضربب بازدارندگی (C_{inh}) کم‌تر از 0/4 بودند، به عنوان جدایه‌های مقاوم به نمک صفراوی در نظر گرفته و به عنوان سویه پروبیوتیک مشخص شدند (جدول شماره 1). لاکتوباسیلوس کازئی‌های جداسازی شده با تست‌های تخمیر قند در هر دو دمای 15 درجه و 45 درجه سانتی گراد رشد نمودند.

پس از شناسایی مولکولی، 3 جدایه مقاوم به اسید و صفرا و با توانایی رشد در دو دمای 15 و 45 درجه سانتی گراد، به روش مولکولی PCR و توالی‌یابی ژن 16SrDNA انجام گرفت. محصولات PCR پس از انجام الکتروفورز، جهت توالی‌یابی به شرکت پیشگام (MACROGEN، کره جنوبی) ارسال شد و نتایج حاصل از توالی‌یابی با سایر توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI بلاست شد. هر سه سویه بیش از 98 درصد به لاکتوباسیلوس کازئی تعلق داشتند.

باکتریوسین تولید شده توسط رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم، رسوب داده شده و رسوب حاصله دیالیز شد و وزن مولکولی آن به وسیله SDS-PAGE سنجیده شد. همان‌طور که در تصویر شماره 1 دیده می‌شود دو نمونه LC1 یک باند حدود 35 تا 40 کیلو دالتونی و LC3 بانندی در محدوده 75 کیلو دالتون تشکیل شده است.

بررسی تشکیل بیوفیلم توسط استریتوکوکوس سالیواریوس و بررسی اثر باکتریوسین بر تشکیل بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت

ابتدا نمونه‌ها را در محیط BHI agar کشت داده و به مدت 24 ساعت گرماگذاری کرده، سپس از کلنی‌های تک رشد کرده بر روی محیط جامد به 10 میلی‌لیتر محیط مایع TSB حاوی 0/2 درصد گلوکز تلقیح کرده به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. سپس کدورت را به نیم مک فارلند ($1/5 \times 10^8$) رسانده و از سوسپانسیون تهیه شده 200 میکرولیتر و 50 میکرولیتر از باکتریوسین داخل چاهک‌های میکروپلیت ریخته و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد در انکوباتور CO_2 دار گرماگذاری شدند، سپس فازرویی هر چاهک را بیرون ریخته و چاهک‌ها سه مرتبه با PBS شست و شو داده شد. در مرحله بعد پلیت‌ها را به مدت یک ساعت در دمای 65 درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملاً خشک شود. سپس رنگ آمیزی با رنگ کریستال ویوله به مدت 20 دقیقه بر روی انکوباتور شیکردار با دور rpm 120 انجام گرفت و رنگ موجود در چاهک‌ها را بیرون ریخته و پلیت توسط آب شست و شو داده شد، سپس با جذب نوری در 590 نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد.

جدایه‌هایی که جذب نوری آن‌ها در این طول موج بیش از سه برابر انحراف معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (محیط TSB حاوی 0/2 درصد گلوکز بود، از نظر تولید بیوفیلم مثبت در نظر گرفته شد. نمونه‌های با OD کم‌تر از 0/1 فاقد بیوفیلم (غیرچسبنده)، نمونه‌های با OD بین 0/1 تا 0/2 به عنوان بیوفیلم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه‌های با OD بین 0/2 تا 0/3 به عنوان بیوفیلم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه‌های با OD بیش از 0/3 به عنوان بیوفیلم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی شدند (22).

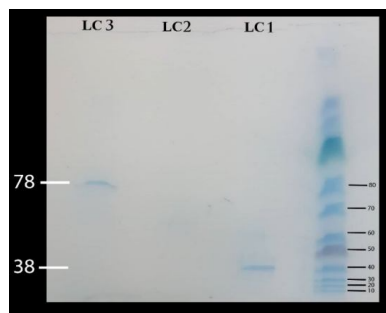
نتایج حاصل از مطالعه به کمک نرم افزار SPSS19 و روش Chi-Square test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

پس از جداسازی باکتریوسین و مایع رویی لاکتوباسیلوس کازئی که از مواد لبنی جدا شده بود و نیز جداسازی استرپتوکوکوس سالیواریوس از پلاک دندانی اثر باکتریوسین به صورت تکی و توأم با مایع رویی کشت به روش نقطه گذاری (agar spot) سنجیده شد. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی بر علیه سویه های استرپتوکوکوس سالیواریوس (*Streptococcus salivarius*) از 7 تا 17 میلی متر متفاوت بود (جدول شماره 2). اختلاف میان تاثیر گذاری باکتریوسین بر روی باکتری می تواند به دلیل میزان مقاومت سویه های استرپتوکوکوس سالیواریوس و نیز منبع جداسازی شده آن ها باشد.

پائین ترین غلظت جلوگیری کننده از رشد استرپتوکوکوس سالیواریوس با مشاهده اولین چاهکی که عدم رشد در آن مشاهده گردید و با جذب نوری صفر، به عنوان MIC در نظر گرفته شد. در گزارش نتایج نیز اولین چاهکی که در آن رشدی صورت نگرفته بود با همان نسبت باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی به محیط کشت MRS به صورت نسبت حجمی - حجمی و با درصد بیان شد، به این صورت که Va حجمی از باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی که داخل هر چاهک موجود می باشد و Vb حجم کل هر چاهک می باشد.

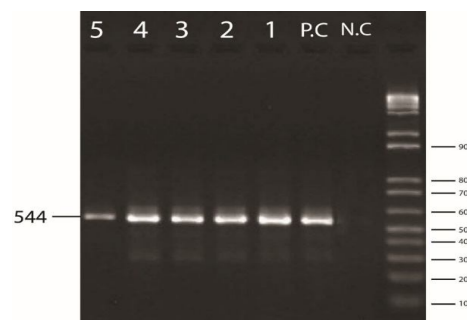
اثر گذاری باکتریوسین بر بیوفیلم تشکیل شده توسط استرپتوکوکوس سالیواریوس به روش میکرو تیر پلیت که با جذب نوری در 590 نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (جدول شماره 4).

در این جدول میزان جذب نوری میزان تولید بیوفیلم توسط سه جدایه استرپتوکوکوس سالیواریوس و نیز میزان جذب نوری پس از نیم ساعت مواجهه با باکتریوسین آورده شده است. سویه سودوموناس آئروژینوزا بعنوان سویه کنترل مثبت استفاده شد.



تصویر شماره 1: تصویر باندهای تشکیل شده باکتریوسین ها در SDS PAGE از سمت چپ به ترتیب مربوط به نمونه های LC2, LC1, LC3 می باشد که دو نمونه LC1 یک باند حدود 35 تا 40 کیلو دالتونی و LC3 باندهای در محدوده 75 کیلو دالتون تشکیل داده است و نمونه LC2 فاقد باند می باشد.

نمونه هایی که تست های بیوشیمیایی (تخمیر قندها) آن ها طبق پروفایل تخمیری استرپتوکوکوس سالیواریوس بود را جهت تایید مولکولی تست PCR ژن اختصاصی *gtfK* گذاشته شد. از 85 نمونه پلاک دندانی 35 نمونه مشکوک به استرپتوکوکوس سالیواریوس با توجه به مورفولوژی و تست های بیوشیمیایی جدا شد که از این تعداد 29 سویه استرپتوکوکوس سالیواریوس با تایید مولکولی با ژن اختصاصی *gtfK* جدا شد. تصویر شماره 2 تشکیل باندهای ژن *gtfK* با وزن مولکولی حدود 544 و مشابه نمونه کنترل مثبت نشان می دهد.



تصویر شماره 2: الکتروفورز ژن *gtfK* با وزن مولکولی 544 کیلو دالتون به ترتیب از سمت راست چاهک ابتدایی لدر با وزن مولکولی 100 کیلو دالتون - چاهک دوم نمونه کنترل منفی - چاهک سوم نمونه کنترل مثبت استرپتوکوکوس سالیواریوس ATCC: 13419 و چاهک 1 تا 5 نمونه های استرپتوکوکوس سالیواریوس

جدول شماره 4: بررسی میزان اثرگذاری باکتریوسین بر تشکیل بیوفیلم توسط استرپتوکوکوس سالیواریوس

طول موج	زمان گرم‌گذاری با رنگ	غلظت رنگ کریستال ویوله	St1	پس از مواجهه با باکتریوسین	St2	پس از مواجهه با باکتریوسین	St3	پس از مواجهه با باکتریوسین
590	0/5 ساعت	0/2 درصد	0/479	0/127	0/596	0/240	0/524	0/261
590	0/5 ساعت	0/2 درصد	0/479	0/181	0/596	0/201	0/524	0/384
590	0/5 ساعت	0/2 درصد		0/619			0/411	
590	0/5 ساعت	0/2 درصد				0/043		

بحث

از آنجایی که لاکتوباسیل‌ها از مهم‌ترین و فراوان‌ترین میکروب‌های پروبیوتیکی هستند (۹،۱۷،۲۳)، در این پژوهش، جداسازی باکتری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس کازئی از نمونه لبنیات سنتی در شهر تهران صورت پذیرفت و در نهایت 8 جدایه به عنوان لاکتوباسیلوس کازئی با کمک روش‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی جداسازی و شناسایی شدند. مطالعات بیش‌تر پس از بررسی پتانسیل پروبیوتیکی جدایه‌های جدا شده 3 جدایه به عنوان پروبیوتیک شناسایی شدند. این جدایه‌ها توانایی رشد در شرایط اسیدی ($\text{pH} \sim 2$) و مقاوم به نمک‌های صفراوی بودند. همچنین مطالعات توالی‌یابی قطعه ژنی 16srDNA نشان داد که هر سه جدایه متعلق به لاکتوباسیلوس کازئی هستند.

در مطالعه‌ای که توسط Maragkoudakis و همکارانش در سال 2006 در فرانسه انجام شد، جداسازی لاکتوباسیلوس‌ها از محصولات لبنی و بررسی خواص پروبیوتیک آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. در این گزارش، مجموعاً 29 جدایه لاکتوباسیلوس کازئی جداسازی و شناسایی شدند. تمامی جدایه‌ها توانایی مقاومت در برابر شرایط اسیدی $\text{pH}=3$ و نمک‌های صفراوی و پانکراتین را داشتند. در حالی که تعداد اندکی از سویه‌ها به $\text{pH}=1$ و آنزیم پروتئاز مقاومت داشتند. همچنین هیچ گونه فعالیت باکتریوسینی در این پژوهش گزارش نشده است (24). در مطالعه حاضر پس از جداسازی، تنها 3 جدایه از 8 جدایه لاکتوباسیلوس کازئی، مقاوم به شرایط اسیدی و تحمل نمک‌های صفراوی بودند و خواص پروبیوتیکی از خود نشان دادند که در حدود 37/5 درصد از کل جمعیت را شامل می‌شدند. تفاوت

در نتایج به‌دست آمده با پژوهش Maragkoudakis احتمالاً به دلیل تفاوت در نمونه‌های لبنی و شرایط نگهداری مواد غذایی همچنین آغازگرهای کشت مواد اولیه جهت تهیه مواد لبنی مورد آزمایش و نحوه انجام تست‌ها بوده است. لذا گونه‌های لاکتوباسیلوس در پژوهش Maragkoudakis تعیین نشده است. در پژوهش حاضر 2 جدایه از 3 جدایه با خواص پروبیوتیکی توانایی تولید باکتریوسین را داشتند، اختلاف دو پژوهش در این موضوع می‌تواند بخاطر تفاوت در گونه جدایه‌ها و منبع جداسازی و بیان ژن تولید باکتریوسین در سویه‌های آغازگر منابع باشد.

به طور کلی توانایی تولید باکتریوسین یکی از مهم‌ترین شاخص‌های سویه پروبیوتیک می‌باشد و تاثیر بالای باکتریوسین بر مزایای سلامتی باکتری پروبیوتیک به خوبی اثبات شده است (25). باکتریوسین‌ها، پپتیدها یا پروتئین‌هایی با خواص ضد میکروبی هستند که توسط ریبوزوم سنتز می‌شوند. باکتری‌های اسید لاکتیک به عنوان یکی از منابع غنی از باکتریوسین به شمار می‌روند و مورد توجه بسیاری از محققان بوده‌اند و تحقیقات متعددی در زمینه جداسازی و شناسایی باکتریوسین‌های تولید شده توسط باکتری‌های اسید لاکتیک صورت پذیرفته است. از جمله کاربردهای باکتریوسین می‌توان به استفاده به عنوان مواد نگهدارنده غذایی و عوامل ضد پوسیدگی دندان در خمیر دندان‌ها اشاره کرد (۲۶، ۲۷). یکی از توانایی‌های لاکتوباسیلوس کازئی مقاومت در برابر شرایط دستگاه گوارش، رشد و ایجاد کلنی در روده است. همین امر منجر به تاثیر مستقیم این دسته از باکتری‌ها بر سلامت انسان می‌شود. اگر چه نقش ترکیبات تولیدی توسط گروه لاکتوباسیلوس کازئی را نمی‌توان

نادیده گرفت. اثرات غیر مستقیم گروه لاکتوباسیلوس کازئی را در درمان بیماری‌ها از طریق ترکیبات تولیدی از جمله باکتریوسین‌ها و اهمیت مطالعات بیش تر در این زمینه را به اثبات می‌رساند.

از سه سویه لاکتوباسیلوس کازئی جدا شده در پژوهش حاضر باکتریوسین استخراج و با کمک رسوب‌دهی آمونیوم سولفات به صورت جزئی خالص سازی گردید. تولید باکتریوسین در دو سویه LC1 و LC3 مشاهده شد و وزن تقریبی این باکتریوسین‌ها با کمک روش SDS PAGE به ترتیب 35 ± 5 و 78 ± 5 کیلو دالتون تخمین زده شد.

در پژوهشی که توسط میردامادی و همکارانش صورت پذیرفت، سویه‌های لاکتوباسیل جدا شده از فرآورده‌های شیری سنتی ایرانی برای تولید باکتریوسین برعلیه 8 سویه استاندارد باکتری گرم مثبت، گرم منفی و مخمر با روش انتشاری غربالگری شدند. دو سویه لاکتوباسیلوس کازئی انتخاب و باکتریوسین‌های تولید شده توسط دو سویه فوق‌الذکر با استفاده از رسوب‌دهی با ایزوپروپانول و آمونیوم سولفات و سپس دیالیز و کروماتوگرافی تخلیص شد. آزمایش ژل الکتروفورز وجود باکتریوسین‌هایی با وزن مولکولی 45 تا 66/2 کیلودالتون را در این سویه‌ها مشخص نمود. این مطالعه نشان داد، باکتریوسین‌های تولید شده توسط این لاکتوباسیل‌ها قادر به مهار طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای موجود در مواد غذایی می‌باشند (28). همان‌طور که اشاره شد باکتریوسین‌ها گروه هتروژن هستند و پپتیدها و پروتئین‌ها با اندازه و ساختار متنوع در این گروه جای می‌گیرند. نتایج حاصل از اندازه باکتریوسین‌های مورد مطالعه در این پژوهش با سایر پژوهش‌ها در توافق به سر می‌برند (28).

پلاک دندان یکی از عوامل مهم در پوسیدگی دندان به شمار می‌رود و مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها و ظهور سویه‌های مقاوم به آنتی بیوتیک منجر به افزایش پوسیدگی دندان شده است. یکی از راه کارهای جلوگیری

و درمان پوسیدگی دندان استفاده از پروبیوتیک‌ها در رژیم غذایی و باکتریوسین‌های تولیدی توسط این دسته از باکتری‌ها در لوازم بهداشتی مراقبت از دندان مانند خمیر دندان و دهان شویه می‌باشد (29). در نتیجه در پژوهش حاضر تاثیر باکتریوسین تولید شده توسط دو جدایه لاکتوباسیلوس کازئی LC1 و LC2 بر باکتری استرپتوکوکوس جدا شده از پلاک دندان در دندانپزشکی‌های سطح کلان شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت.

بیوفیلم دندان یکی فرایند بیولوژی است که طی آن باکتری‌های دهانی به پروتئین‌های سطحی دندان متصل شده و رشد و تکثیر آن‌ها منجر به ایجاد پلاک دندان می‌گردد. همچنین مطالعات نشان دادند که نوع و فراوانی باکتری‌های دهان با تغییر در رژیم غذایی و مصرف محصولات حاوی پروبیوتیک تغییر می‌کند (30). استرپتوکوکوس سالیواریوس یکی از فراوان‌ترین باکتری‌های دهانی است. مطالعات نشان دادند که این گونه باکتری از اولین باکتری‌هایی است که در دهان نوزاد چند روز پس از تولد اجتماع می‌کند (31) و به این گونه غالباً استرپتوکوکوس به عنوان یکی از فراوان‌ترین باکترهای فلور دهان، ابتدای مجرای تنفسی و روده باقی می‌ماند (32). گلوکوترانسفرازها دسته‌ای از آنزیم‌ها هستند که برای تولید ترکیباتی گلیکوکونژوگه ضروری هستند (33). این آنزیم در تجمع گونه‌های استرپتوکوک در دهان نقش ضروری دارد. باکتری استرپتوکوکوس سالیواریوس با تولید گلوکان نامحلول در آب از سوکروز توسط آنزیم گلوکوز ترانسفراز در ایجاد پوسیدگی دندان نقش ایفا می‌کند (34).

در مطالعه حاضر اثر بخشی باکتریوسین‌های تولید شده توسط دو جدایه LC1 و LC3 بر باکتری *Streptococcus salivarius* ATCC: 13419 با روش میکروتیت‌ر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. کم‌ترین غلظت مهارشده (MIC) برای این دو باکتریوسین به ترتیب 0/1 و 0/2 تخمین زده شد. همچنین مطالعات بررسی

باکتریوسین میزان تولید بیوفیلیم و تعداد استرپتوکوک‌های ویریدانس موثر بودند.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر نشان دادند که باکتریوسین‌ها و مایع رویی حاصل از کشت تولید شده توسط دو جدایه لاکتوباسیلوس کازئی پروبیوتیک دارای خواص ضد میکروبی هستند و توان مهار تشکیل بیوفیلیم در باکتری استرپتوکوکوس سالیواریوس را دارند و جایگزین مناسبی برای استفاده در صنایع بهداشت دهان می‌باشند و قابلیت جلوگیری از پوسیدگی دندان را دارند.

سپاسگزاری

این مقاله نتیجه بخشی از طرح مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد IR.TUMS.VCR.REC.1397.250 با کد اخلاق 37783 می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

تضاد منافع

هیچگونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Seminario Amez M, López López J, Estrugo Devesa A, Ayuso Montero R, Jané Salas E. Probiotics and oral health: A systematic review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2017; 22(3): e282-e288.
2. Tester RF, Al Ghazzewi FH. Role of prebiotics and probiotics in oral health. *Nutrition & Food Science* 2018; 48(1): 16-29.
3. Monteagudo Mera A, Rastall RA, Gibson GR, Charalampopoulos D, Chatzifragkou A. Adhesion mechanisms mediated by probiotics and prebiotics and their potential impact on human health. *Appl Microbiol Biotechnol* 2019; 103(1): 6463-6472.
4. Roger P, Delettre J, Bouix M, Béal C. Characterization of *Streptococcus salivarius* growth and maintenance in artificial saliva. *J Appl Microbiol* 2011; 111(3): 631-641.
5. Ousehal L, Lazrak L, Es Said R, Hamdoune H, Elquars F, Khadija A. Evaluation of dental plaque control in patients wearing fixed orthodontic appliances: a clinical study. *Int Orthod* 2011; 9(1): 140-155.
6. Holgerson PL, Romani Vestman N, Claesson

تشکیل بیوفیلیم باکتری استرپتوکوکوس سالیواریوس نشان داد که پس از تیمار با باکتریوسین‌های LC1 و LC3 تشکیل بیوفیلیم تا حدودی کاهش یافته است. در مطالعه Simmonds و همکارانش در سال 1995 اثر باکتریوسین Zoocin A تخلیص شده Streptococcus zooepidemicus strain 4881 بر روی استرپتوکوک‌های عامل پوسیدگی از جمله استرپتوکوکوس سالیواریوس، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سورینوس و استرپتوکوکوس سنگوئیس سنجیده شد. مواجهه حدود دو دقیقه‌ای پلاک‌های حاصله از باکتری‌های استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سنگوئیس و اکتینومایسز ویسکوز با این باکتریوسین با کاهش میزان پلاک و تعداد استرپتوکوکوس موتانس همراه بود. همچنین 18 درصد از جدایه‌های استرپتوکوکوس سالیواریوس به این باکتریوسین حساسیت نشان دادند (35). در مطالعه حاضر سویه‌های تولیدکننده بیوفیلیم همگی به باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی پروبیوتیکی حساسیت نشان دادند. وزن مولکولی باکتریوسین، جدایه‌های استرپتوکوکوس سالیواریوس، میزان آن‌ها و اخلاف در سویه تولیدکننده باکتریوسین عامل اخلاف در میزان تاثیر روی استرپتوکوکوس سالیواریوس‌ها باشد. با این حال در هر دو مطالعه

- R, Öhman C, Domellöf M, Tanner AC, et al. Oral Microbial Profile Discriminates Breastfed from Formula-Fed Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 56(2): 127-136.
7. Varma P, Dinesh KR, Menon KK, Biswas R. *Lactobacillus fermentum* isolated from human colonic mucosal biopsy inhibits the growth and adhesion of enteric and foodborne pathogens. *Journal of Food Science* 2010; 75(9): M546-M551.
 8. Soltan Dallal MM, Zamaniahari S, Davoodabadi A, Hosseini M, Rajabi Z. Identification and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from traditional persian pickled vegetables. *GMS Hyg Infect* 2017; 12.
 9. Sharifi Yazdi MK, Davoodabadi A, Khesht Zarin HR, Tajabadi Ebrahimi M, Soltan Dallal MM. Characterisation and probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from Iranian traditional yogurts. *Italian J Animal Sci* 2017; 16(2): 185-188.
 10. Markowiak P, Ślizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 2017; 9(9): 1021.
 11. Humphreys GJ, McBain AJ. Antagonistic effects of *Streptococcus* and *Lactobacillus* probiotics in pharyngeal biofilms. *Lett Appl Microbiol* 2019; 68(4): 303-312.
 12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). 2013. Probiotic Properties and Test Methods. ISIRI No. 19459. (Persian).
 13. Soltan Dallal MM, Dargahi H, Mehrani F, Sharifi Yazdi MK, Rahimi Forushani A, Miremadi SA. The role of *Streptococcus Mutants* in dental caries in two groups of sensitive and resistance children age between 3 to 5 years. *Payavard* 2013; 6(6): 467-477 (Persian).
 14. Soltan Dallal MM, Keshavarz M, Zamani S, Shirazi M. Evaluation of anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus ruteri* against entero-pathogenes by in vitro and in vivo methods. *J Gorgan Univ Med Sci* 2016; 18(1): 45-52 (Persian).
 15. Lashani E, Davoodabadi A, Soltan Dallal MM. Some probiotic properties of *Lactobacillus* species isolated from honey and their antimicrobial activity against foodborne pathogens. *Vet Res Forum* 2020; 11(2): 121-126 (Persian).
 16. Han H, Wang C, Li Y, Yu Z, Xu Q, Li G, et al. Identification of lactic acid bacteria in the feces of dairy cows fed whole crop maize silage to assess the survival of silage bacteria in the gut. *Anim Sci J* 2018; 89(1): 97-104.
 17. Davoodabadi A, Soltan Dallal MM, Rahimi Foroushani A, Douraghi M, Sharifi Yazdi MK, Amin Harati F. Antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of healthy infants against enteropathogenic bacteria. *Anaerobe* 2015; 34: 53-58.
 18. Gilliland S, Walker D. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci* 1990; 73(4): 905-911.
 19. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T, Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using gtf genes. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004; 48(3): 195-199.
 20. Shirazi L, Rahnema M, Soltan Dallal MM. Evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus ruteri* on the several Pathogens bacteria of the enterobacteriaceae family. *J Microbiol Biotech* 2011; 3(9): 29-34 (Persian).
 21. Soltan Dallal MM, Sharifi Yazdi MK, Avadisians S, Agha Mirzaei H, Sabaghi A. Efficacy of Ciprofloxacin, Ceftizoxims and

- Carbenicillin on *Klebsiella* spp isolated from hospital specimens. J Gorgan Univ Med Sci 2013; 15(3): 77-83 (Persian).
22. Ahmed A, Dachang W, Lei Z, Jianjun L, Juanjuan Q, Yi X. Effect of *Lactobacillus* species on *Streptococcus mutans* biofilm formation. Pak J Pharm Sci 2014; 27(5 Spec no): 1523-1528.
23. Liu W, Chen M, Duo L, Wang J, Guo S, Sun H, et al. Characterization of potentially probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from human colostrum. J Dairy Sci 2020; 103(5): 4013-4025.
24. Maragkoudakis PA, Zoumpopoulou G, Miaris C, Kalantzopoulos G, Pot B, Tsakalidou E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Inter Dairy J 2006; 16(3): 189-199.
25. Corr SC, Li Y, Riedel CU, O'Toole PW, Hill C, Gahan CG. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. Proc Natl Acad Sci U S A 2007; 104(18): 7617-7621.
26. Srinivasan S, Nandlal B, Rao MVS. Assessment of plaque regrowth with a probiotic toothpaste containing *Lactobacillus paracasei*: A spectrophotometric study. J Indian Soc Pedod Prev Dent 2017; 35(4): 307-311.
27. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Sci 2016; 120: 118-132.
28. Mirdamadi S, Tangestani M. Screening and characterization of bacteriocins produced by some strains of *Lactobacillus* spp isolated from Iranian dairy products. J Food Hygiene; 1(3): 55-69 (Persian).
29. Woraprayote W, Malila Y, Sorapukdee S, Swetwathana A, Benjakul S, Visessanguan W. Bacteriocins from lactic acid bacteria and their applications in meat and meat products. Meat Sci 2016; 120: 118-132.
30. Hu X, Huang Z, Zhang Y, Hong Y, Zheng Y. Effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on dental plaque microbiota. J Int Med Res 2019; 47(7): 3190-3202.
31. Könönen E, Jousimies Somer H, Bryk A, Kilpi T, Kilian M. Establishment of streptococci in the upper respiratory tract: longitudinal changes in the mouth and nasopharynx up to 2 years of age. J Med Microbiol 2002; 51(9): 723-730.
32. Nakajima T, Nakanishi S, Mason C, Montgomery J, Leggett P, Matsuda M. Population structure and characterization of viridans group streptococci (VGS) isolated from the upper respiratory tract of patients in the community. Ulster Med J 2013; 82(3): 164-168.
33. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. Caries Res 2011; 45(3): 243-263.
34. Xu X, Zhou XD, Wu CD. Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing gtf genes. Arch Oral Biol 2012; 57(6): 678-683.
35. Simmonds RS, Naidoo J, Jones CL, Tagg JR. The Streptococcal Bacteriocin-like Inhibitory Substance, Zoocin A, Reduces the Proportion of *Streptococcus mutans* in an Artificial Plaque. Microb Ecology Health Dis 1995; 8(6): 281-292.