ORIGINAL ARTICLE

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 Afradi[3],
Zahra Rajabi[4],
Katayoon Samimirad[5],
Yousef Erfani[6]

[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)

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و یکم شماره 196 اردیبهشت سال 1400 (35-23)

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[1و2]
محمد رضا افرادی[3]
زهرا رجبی[4]
کتایون صمیمی راد[5]
یوسف عرفانی[6]

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 3سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیک از نمونه‌های شیر غنی‌سازی و کشت در محیط MRS Broth و MRS Agar 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 16srDNAتوالی‌های به‌دست آمده، تایید شد. تخلیص نسبی باکتریوسین از روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم انجام و وزن مولکولی آن به‌وسیله SDS-PAGE اندازه‌گیری و فعالیت آن سنجیده شد. جدایه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* از پلاک دندانی جداسازی و به‌صورت فنوتیپی و بیوتیپی شناسایی شدند. تایید مولکولی جدایه‌های به‌دست 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 میکروتیترپلیت سنجیده شد.

یافته‌ها: پس از تخلیص نسبی باکتریوسین 3 سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیک جداسازی شده از شیر، در سنجش وزن مولکولی آن‌ها به روشSDSPAGE دو نمونه LC3 و LC1 باندهایی به ترتیب با وزن مولکولی 35 تا 40 کیلودالتون و حدود 75 کیلو دالتون 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.

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

مقدمه

بیماری پریودنتال 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 از داروهای ضد میکروبی

مولف مسئول: محمدمهدی سلطان دلال - تهران: بلوارکشاورز، 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 ازمایشگاهی، 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 پری بیوتیک‌ها 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 به‌کار گرفته شده است(3).

پلاک باکتریایی یک اصطلاح عمومی است که تجمع میکروارگانیسم‌ها (عمدتا باکتری‌ها) را که در ماتریکس پلیمری از بافت‌های بزاق و باکتری‌هایی که در سطوح دندان قرار دارد و در نقش بیماری‌زای پوسیدگی دندان و بیماری پریودنتال 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 دندانی 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 مهاری بیش‌تر، در محصولات دارویی و بهداشتی مانند، خمیردندان‌ها، دهان شویه‌ها 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 دندانی 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 دندانی 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 دندانی 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 بیوفیلم 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 جدا سازی لاکتوباسیلوس‌ها از جمله رنگ‌آمیزی گرم (بررسی مورفولوژی)، کاتالاز (توانایی تجزیه هیدروژن پراکسید (H_2O_2) 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، ریبوز، فروکتوز، لاکتوز، مالتوز، مانوز و ملیبوز بودند. جهت انجام این تست از محیط MRS Broth اصلاح شده (فاقد گلوکز) به عنوان محیط پایه قندی استفاده شد (جداول شماره 1و2و3).

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

سویه	مقاومت به شرایط اسیدی pH: 2		مقاومت به صفرا (Cinh)
	h_3	h_0	
LC1	$2/4\times10^9$	$4/4\times10^9$	0/04
LC2	$2/4\times10^7$	$1/2\times10^9$	0/40
LC3	$1/4\times10^8$	$2/2\times10^8$	0/1

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

سویه *Lactobacillus casei*	قطر هاله عدم رشد استرپتوکوکوس سالیواریوس		
	*St1	St 2	St 3
باکتریوسین LC1	11mm	17mm	7mm
باکتریوسین LC3	10mm	15mm	7mm

*St مخفف Streptococcus salivarius می باشد

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

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

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 قبلا 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) می‌باشد که در pH برابر 6تا 6/4 در محیط اولیه، باعث بنفش شدن رنگ محیط می‌شود. در صورتی‌که جدایه مورد نظر قند را تخمیر نماید، تولید اسید نموده و باعث تغییر رنگ محیط به زرد می‌شود. سپس تست هیدورلیز آرژنین و رشد در دماهای 15 و 45 درجه سانتی‌گراد جهت تکمیل تست‌های فنوتیپی انجام شد.

تایید مولکولی لاکتوباسیلوس کازئی

تایید تشخیص جدایه‌ها 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′) 1522R (5′- GCAGCAGTAGGGAATCTTC-3′) استفاده شد، سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* ATCC به‌عنوان کنترل مثبت درنظر گرفته شد و محصولات PCR توالی یابی و درNCBI بلاست شدند(16).

بررسی توان پروبیوتیکی ایزوله‌های لاکتوباسیوس

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

مقاومت به شرایط اسیدی

یک میلی‌لیتر از این محیط کشت که حاوی حدود 10^9CFU/mlباکتری بود را به 9 میلی‌لیتر PBS Saline (phosphate buffered) دارای pH برابر 2 اضافه شد. جهت تنظیم pH ازHCL 0/1 نرمال (مرک، آلمان) استفاده شد. در زمان صفر (کنترل) جهت شمارش تعداد باکتری‌های موجود (CFU) در PBS، با استفاده از روش رقت‌سازی کشت بر روی MRS آگار تهیه شد. جدایه‌هایی از *لاکتوباسیلوس کازئی* که در pH برابر 2 زنده مانده و تعداد کلنی شمارش شده آن‌ها کم‌تر از 10^6 CFU/ml نبود، به عنوان مقاوم به اسید نظر گرفته شدند(۱۷،۱۲).

مقاومت به نمک‌های صفراوی

جدایه‌هایی از *لاکتوباسیلوس کازئی* که شرایط اسیدی را تحمل نموده‌اند، 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 میلی‌لیتر 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 لوله‌ها در جار شمع‌دار در 37 درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شدند. میزان رشد جدایه‌ها 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. جدایه‌های با ضریب مهار کم‌تر از 0/4، مقاوم به صفرا در نظر گرفته شدند(17).

جداسازی باکتریوسین از لاکتوباسیلوس کازئی جداشده

به منظور بررسی اثر باکتریوسین تولید شده از لاکتوباسیلوس علیه سویه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، این باکتری‌ها توسط رسوب‌دهی با آمونیوم سولفات تغلیظ و تخلیص نسبی شدند. بدین منظور بعد از کشت سویه‌های مولد باکتریوسین، خنثی سازی اثر اسید و جداسازی توده میکروبی، باکتریوسین تولید شده توسط رسوب‌دهی 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 کلنی‌های مشکوک تست‌های بیوشیمیایی هیدرولیز آرژنین، هیدرولیز اسکولین و قندهای گلوکز، مانیتول، لاکتوز، رافینوز، آرژنین، ملوبیوز و سوربیتول 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 کازئی با روش نقطه گذاری (Agar spot)

در این روش 10 میکرولیتر از کشت تازه باکتری *استرپتوکوکوس سالیواریوس* جدا شده در 7 میلی‌لیتر محیط کشت BHI نیمه جامد (با 0/7 درصد آگار) با دمای 47 درجه سانتی گراد ریخته شد. سپس 5 میکرولیتر از باکتری *لاکتوباسیلوس کازئی* و باکتریوسین و مایع‌رویی جدا شده به صورت تکی و تواماً در مرکز پلیت‌ها نقطه‌گذاری شدند. بعد از گذشت 24 ساعت، بررسی تولید هاله عدم رشد توسط باکتریوسین بر علیه سویه *استرپتوکوکوس سالیواریوس* ثبت گردید(20).

تعیین کم‌ترین غلظت مهارکنندگی رشد (MIC) باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی

تعیین کم‌ترین غلظت مهارکنندگی (MIC) رشد باکتریوسین مورد بررسی با استفاده از روش Microdilution broth در میکروپلیت 96 خانه‌ایی انجام شد. ابتدا درون چاهک‌ها 100 میکرولیتر محیط کشت MRS Broth ریخته شد. سپس از باکتریوسین سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* 100 میکرولیتر به چاهک اول اضافه شد و سری رقت از آن تهیه شد. به‌طوری که غلظت نهائی مایع رویی از کشت، در چاهک‌ها از 1 تا $\frac{1}{512}$ تعیین شد. سپس 100 میکرولیتر از سوسپانسیون سلولی از هرکدام از سویه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* در محیط مولر هینتون براث با رقت $1/5\times10^6$CFU/ml به هر چاهک اضافه شد. این آزمون سه بار تکرارشد و پلیت 96 خانه‌ای در انکوباتور Co_2 دار 37 درجه سانتی گراد به‌مدت 24 ساعت گذاشته شد. پس از طی زمان گرماگذاری میزان رشد سویه *استرپتوکوکوس سالیواریوس* براساس تعیین کدورت چاهک‌ها با استفاده از الایزا ریدر با جذب 590 نانومتر ارزیابی شد. پائین‌ترین 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 کم‌ترین غلظت کشندگی باکتری (MBC) باکتریوسین لاکتوباسیلوس کازئی

از محتویات چاهک‌های مختلف که حاوی غلظت‌های کم تر باکتریوسین بوده و رشد باکتری *استرپتوکوکوس سالیواریوس* در آن مشاهده نشده بود، به میزان 10میکرولیتر به محیط بلاد آگار کشت داده شد. تمام آزمایش‌ها سه بارتکرار شد و میزان MBC به عنوان غلظتی از باکتریوسین که در آن تمام باکتری‌ها کشته شده بودند، در نظر گرفته شد(21).

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

ابتدا نمونه‌ها را در محیط BHI agar کشت داده و به‌مدت 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 ($1/5\times10^8$) 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 درانکوباتور 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 سانتی گراد قرار داده تا کاملا خشک شود. سپس رنگ‌آمیزی با رنگ کریستال ویوله به مدت 20 دقیقه بر روی انکوباتور شیکردار با دور 120 rpm 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 الایزا ریدر قرائت شد.

جدایه‌هایی که جذب نوری آن‌ها در این طول موج بیش ازسه برابر انحراف‌معیار مربوط به نمونه کنترل منفی (محیط TSB حاوی0/2 درصد گلوکزبود، 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 تا0/2 به‌عنوان بیوفیلم ضعیف (چسبنده ضعیف)، نمونه‌های با OD بین0/2 تا0/3 به عنوان بیوفیلم متوسط (چسبنده متوسط) و نمونه‌های با OD بیش از 0/3 به عنوان بیوفیلم قوی (چسبنده قوی) ارزیابی شدند(22).

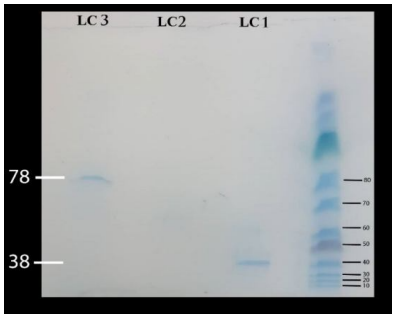
نتایج حاصل از مطالعه به کمک نرم افزار SPSS19 و روش Chi-Square test مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

یافته ها

از بین33 جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی* جداسازی شده از مواد لبنی، 7 جدایه لاکتوباسیل کازئی شرایط اسیدی (PH=2) را تحمل نمودند. در مرحله بعدی این7 سویه مقاوم به اسید از نظر مقاومت به نمک صفراوی 0/3 درصد oxgall، مورد بررسی قرار گرفتند. از بین این جدایه‌ها، نهایتا3 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 ضریب بازدارندگی (C_{inh}) کم‌تر از 0/4 بودند، به‌عنوان جدایه‌های مقاوم به نمک صفراوی در نظر گرفته و به عنوان سویه پروبیوتیک مشخص شدند (جدول شماره1). *لاکتوباسیلوس کازئی*‌های جداسازی شده با تست‌های تخمیر قند در هر دو دمای 15 درجه و 45 درجه سانتی‌گراد رشد نمودند.

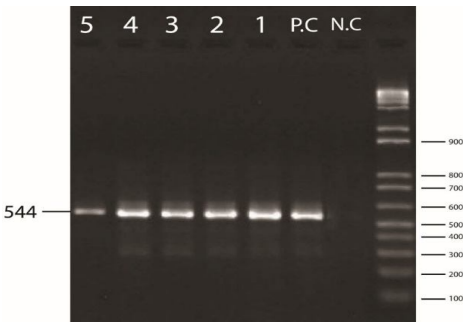
پس از شناسایی مولکولی، 3 جدایه مقاوم به اسید و صفرا و با توانایی رشد در دو دمای 15 و 45 درجه سانتی گراد، به روش مولکولی PCR و توالی‌یابی ژن 16SrDNA انجام گرفت. محصولات PCR پس از انجام الکتروفورز، جهت توالی‌یابی به شرکت پیشگام (MACROGENکره جنوبی) ارسال شد و نتایج حاصل از توالی‌یابی با سایر توالی‌های موجود 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 به‌وسیله SDS-PAGE سنجیده شد. همان‌طور که در تصویر شماره 1 دیده می‌شود دو نمونه LC1 یک باند حدود 35 تا 40 کیلودالتونی و LC3 باندی در محدوده 75 کیلو دالتون تشکیل شده است.



تصویر شماره 1: تصویر باندهای تشکیل شده باکتریوسین‌ها در SDS PAGE از سمت چپ به ترتیب مربوط به نمونه‌های LC2, LC1، LC3 می‌باشد که دو نمونه LC1یک باند حدود 35 تا 40 کیلودالتونی و LC3 باندی در محدوده 75 کیلو دالتون تشکیل داده است و نمونه LC2 فاقد باند می باشد.

نمونه‌هایی که تست‌های بیوشیمیایی (تخمیر قندها) آن‌ها 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 تست‌های 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 می‌دهد.



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

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 به‌صورت تکی و تواماً با مایع رویی کشت به روش نقطه گذاری (agar spot) سنجیده شد. میانگین قطر هاله عدم رشد باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کازئی* بر علیه سویه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* (*Streptococcus salivarius*) از 7 تا 17 میلی‌متر متفاوت بود (جدول شماره 2). اختلاف میان تاثیرگذاری باکتریوسین بر روی باکتری می‌تواند به دلیل میزان مقاومت سویه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس* و نیز منبع جداسازی شده آن‌ها باشد.

پائین‌ترین غلظت جلوگیری‌کننده 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 به‌صورت نسبت حجمی- حجمی و با درصد بیان شد، به این‌صورت که Va حجمی از باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کازئی* که داخل هر چاهک موجود می‌باشد و Vb حجم کل هر چاهک می‌باشد.

اثرگذاری باکتریوسین بر بیوفیلم تشکیل شده توسط *استرپتوکوکوس سالیواریوس* به روش میکروتیتر پلیت که با جذب نوری در 590 نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر قرائت شد (جدول شماره4).

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.

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

	طول موج	زمان گرماگذاری با رنگ	غلظت رنگ کریستال ویوله	St1	پس از مواجهه با باکتروسین	St2	پس از مواجهه با باکتروسین	St3	پس از مواجهه با باکتروسین
جذب نوری با باکتریوسین LC1	590	0/5 ساعت	0/2 درصد	0/479	0/127	0/596	0/240	0/524	0/261
جذب نوری با باکتریوسین LC2	590	0/5 ساعت	0/2 درصد	0/479	0/181	0/596	0/201	0/524	0/384
سویه کنترل مثبت *سودوموناس آئروژینوزا*	590	0/5 ساعت	0/2 درصد		0/619			0/411	
کنترل منفی	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 (pH~ 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 قرارگرفت. در این گزارش، مجموعا 29 جدایه *لاکتوباسیلوس کازئی* جداسازی و شناسایی شدند. تمامی جدایه‌ها توانایی مقاومت در برابر شرایط اسیدی pH=3 و نمک‌های صفراوی و پانکراتین را داشتند. در حالی که تعداد اندکی از سویه‌ها به 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 احتمالا به‌دلیل 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 حاضر2 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 ضدمیکروبی 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 خمیردندان‌ها اشاره کرد(۲۷،۲۶). 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 به‌صورت جزئی خالص‌سازی گردید. تولید باکتریوسین در دو سویه LC1 و LC3 مشاهده شد و وزن تقریبی این باکتریوسین‌ها با کمک روش SDS PAGE به‌ترتیب 5± 35 و 5± 78 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 الکتروفوز 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). همان‌طورکه 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 دندانی 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 راه‌کارهای 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 لاکتوباسلوس کازئی LC1 و LC2 بر باکتری استرپتوکوکوس جدا شده از پلاک دندانی در دندانپزشکی‌های سطح کلان شهر تهران مورد بررسی قرار گرفت.

بیوفیلم دندانی یک فرایند بیولوژی است که طی آن باکتری‌های دهانی به پروتئین‌های سطی دندان متصل شده و رشد و تکثیر آن‌ها منجر به ایجاد پلاک دندانی 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 غالبا استرپتوکوکوس به عنوان یکی از فراوان ترین 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 مهاری رشد (MIC) برای این دو باکتریوسین به ترتیب 0/1 و 0/2 تخمین زده شد. همچنین مطالعات بررسی

تشکیل بیوفیلم باکتری *استرپتوکوکوس سالیواریوس* نشان داد که پس از تیمار با باکتریوسین‌های LC1 و LC3 تشکیل بیوفیلم 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 ازجمله *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، استرپتوکوکوس موتانس، استرپتوکوکوس سوربینوس 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 بیوفیلم همگی به باکتریوسین *لاکتوباسیلوس کازئی* پروبیوتیکی حساسیت نشان دادند. وزن مولکولی باکتریوسین، جدایه‌های *استرپتوکوکوس سالیواریوس*، میزبان آن‌ها و اخلاف در سویه تولیدکننده باکتریوسین عامل اخلاف در میزان تاثیر روی *استرپتوکوکوس سالیواریوس*‌ها باشد. با این حال در هر دو مطالعه باکتریوسین میزان تولید بیوفیلم 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 ضدمیکروبی هستند و توان مهار تشکیل بیوفیلم 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 37783 با کد اخلاق IR.TUMS.VCR.REC.1397.250 می‌باشد. بدین‌وسیله 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

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, Śliżewska 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, Keshtvarz M, Zamani S, Shirazi M. Evaluation of anti-microbial activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus ruteri* against entero-pathoges 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, Rahnama M, Soltan Dallal MM. Evaluation of antimicrobial activity of Lactobacillus *acidophilus* and Lactobacillus routerion 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 Mirazaei 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, Swetwiwathana 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, Swetwiwathana 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.