



## جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک موجود در دهان افراد و بررسی اثر

### بازدارندگی شان بر روی برخی از باکتری های بیماریزای روده ای

دکتر جمیله نوروزی<sup>۱\*</sup>، دکتر آنتیا خنافری<sup>۲</sup>، شیرین بیگلری<sup>۲</sup>

گروه میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی ایران،<sup>۱</sup> گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال

#### چکیده

سابقه و هدف: استرپتوکوک های دهانی، ارگانیزم های غالب در پلاک دندانی هستند و استرپتوکوکوس میوتانس، مهم ترین گونه در ایجاد پوسیدگی اولیه دندان است. لاکتوباسیل ها در مرحله بعدی پوسیدگی دندان دخالت دارند. هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری های اسید لاکتیک موجود در دهان افراد در گروه های مختلف سنی، تعیین pH و بررسی اثر مهارتی لاکتوباسیل ها بر روی تعدادی از باکتری های بیماریزای روده ای (سالمونلا، شیگلا و اشریشیاکلی) می باشد.

مواد و روش ها: در این بررسی، نمونه برداری از بزاق و اطراف دندان ۷۵ نفر در گروه های مختلف سنی توسط سواب انجام شد و در محیط MRS کشت داده شد. لاکتوباسیل ها و استرپتوکوک ها با روش استاندارد (شکل ظاهر کلنی، میکروسکوپی، تخمیر قندها و انجام تست های بیوشیمیایی) جداسازی و شناسایی شدند. همچنین pH مناسب رشد لاکتوباسیل ها و استرپتوکوک ها اندازه گیری گردید و اثر بازدارندگی لاکتوباسیل ها بر باکتری های بیماریزای روده ای (اشریشیاکلی، سالمونلا، شیگلا) با روش نقطه گذاری، دیسک گذاری و ایجاد چاهک تعیین شد. یافته ها: لاکتوباسیل های جدا شده شامل شش گونه، لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس کازنی، لاکتوباسیلوس گاسری، لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و استرپتوکوک جدا شده استرپتوکوکوس میوتانس بودند. لاکتوباسیل های جدا شده از دهان، رشد اشریشیاکلی را متوقف کردند، اما بر روی سالمونلا و شیگلا دارای اثر مهارتی ضعیف یا فاقد اثر بازدارندگی بودند.

نتیجه گیری: نتایج این بررسی نشان داد که برخی از لاکتوباسیل ها در شرایط آزمایشگاهی از رشد پاتوژن ها جلوگیری می کنند. بنابراین مصرف لبنیات در تغذیه روزانه به علت وجود لاکتوباسیل ها توصیه می شود.

واژگان کلیدی: استرپتوکوکوس میوتانس، لاکتوباسیلوس ها، دهان، اثر بازدارندگی

دریافت مقاله: فروردین ۱۳۸۷ پذیرش برای چاپ: مرداد ۱۳۸۷

#### مقدمه

پوسیدگی دندان است (۱، ۲ و ۳). گونه های مختلف لاکتوباسیلوس در پوسیدگی اولیه اهمیت چندانی ندارند. اما در ادامه پوسیدگی دندان اهمیت دارند (۲ و ۳). بعضی از گونه های لاکتوباسیل ها، جزء میکروفلورای کومنسال غشای مخاطی انسان در دهان، واژن و روده هستند. در دهان، این باکتری ها معمولاً کمتر از ۱٪ میکروفلورا را تشکیل می دهند، گرچه تعدادشان بستگی به مصرف قند دارد (۴). این باکتری ها به عنوان آغازگر به مواد غذایی تخمیری اضافه می شوند و در بهبود طعم و بافت فرآورده های غذایی مؤثرند و همچنین نقش عمده ای را در

حفره دهانی محیط گرم، مرطوب و غنی از مواد غذایی است که گونه های مختلف و فراوانی از میکروارگانیزم ها را در خود نگهداری می کند. بیش از ۱۰۰۰ گونه مختلف باکتری ها ممکن است در دهان افراد بالغ وجود داشته باشند. جنس های استرپتوکوکوس، ارگانیزم های غالب در پلاک دندان، هستند و از بین آن ها استرپتوکوکوس میوتانس، مهم ترین گونه در تشکیل

(\*آدرس برای مکاتبه: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه میکروبیولوژی

جلوگیری از رشد ارگانیزم های فاسد کننده مواد غذایی به عهد دارند (۵). توانایی باکتری های اسید لاکتیک در جلوگیری از رشد میکروب های ناخواسته ممکن است ناشی از عوامل متعددی مانند تولید اسیدهای آلی شامل اسید لاکتیک، اسید استیک، اسید پروپیونیک و اسید فرمیک یا اسیدهای چرب آزاد، آمونیاک، پراکسید هیدروژن، کاهش پتانسیل احیا و به ویژه سنتز آنتی بیوتیک ها و باکتریوسین ها باشد که همگی تحت عنوان آنتی بیوز (Antibios) تعریف شده اند (۶). Markla و همکاران نشان دادند که فعالیت ضد باکتریایی سویه هایی از لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس آمیلووروس، لاکتوباسیلوس کازنی، لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر علیه سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم SL1344 منحصراً مربوط به تولید اسید لاکتیک بوده و فعالیت ضد باکتریایی سویه هایی از لاکتوباسیلوس جانسونی و لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ارتباط با تولید اسید لاکتیک و یک یا چند ماده مهار کننده ناشناخته است که این ماده یا مواد فقط در صورت وجود اسید لاکتیک فعال می شدند (۷). لاکتوباسیل ها جزء میکروارگانیزم های پروبیوتیک هستند و با تولید ترکیبات آلی مثل اسید لاکتیک، هیدروژن پراکسید و اسید استیک و افزایش اسیدینه روده، از استقرار خیلی از باکتری های مضر جلوگیری می کنند. پروبیوتیک ها با کمک به عملکرد سیستم ایمنی بدن باعث افزایش مقاومت در برابر عفونت می شوند. لاکتوباسیلوس GG در کاهش تکرار و دوره اسهال ایجاد شده توسط روتاویروس در کودکان و در پیشگیری از اسهال در کودکان مؤثر است (۸ و ۹) و برای سلامت دستگاه تناسلی - ادراری و پیشگیری از پوسیدگی دندان قابل توجه هستند (۱۰ و ۱۱). همچنین نشان داده شده که شیرهای تخمیر شده با لاکتوباسیلوس GG باعث کاهش چسبیدن استرپتوکوکوس میوتانس به دانه های هیدروکسی آپاتیت پوشش بزاقی می شود (۸ و ۱۲). هدف از این پژوهش، جداسازی باکتری های اسید لاکتیک موجود در دهان افراد در گروه های مختلف سنی، تعیین pH و بررسی اثر مهار لاکتوباسیل ها بر روی تعدادی از باکتری های بیماریزای روده ای (سالمونلا، شیگلا و اشریشیا کلی) می باشد.

## مواد و روش ها

نمونه برداری از بزاق و اطراف دندان ۷۵ نفر در گروه های مختلف سنی توسط سواب انجام شد و در محیط MRS براث به مدت ۲۴ ساعت در  $37^{\circ}\text{C}$  نگهداری گردید. از کلنی های رشد

کرده در محیط MRS براث، برداشته و در محیط MRS آگار کشت داده شد و در  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت در شرایط میکروآنروفل نگهداری شد. کلنی های خالص ایجاد شده از نظر مورفولوژی، رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رنگ آمیزی کلنی ها، در زیر میکروسکوپ دو نوع باکتری دیده شد، یک سری باکتری های میله ای گرم مثبت فاقد اسپور و یک سری باکتری های کوکسی شکل گرم مثبت مشاهده شد. از کلنی باکتری های میله ای مجدد در محیط MRS آگار و از کلنی های کوکسی در محیط استرپتوکوک سلکتیو آگار کشت و در حرارت  $37^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در شرایط میکروآنروفل گرمخانه گذاری شدند. برای شناسایی و جداسازی استرپتوکوک ها از تست های اکسیداز، رشد در نمک های کلرور سدیم (NaCl) ۰.۴٪ و ۰.۶/۵٪، تولید استوئین (VP)، هیدرولیز اسکولین و همولیز بر روی محیط بلاد آگار و برای بررسی متابولیسم کربوهیدرات، از محیط پایه فنل رد به علاوه ۱٪ قند استفاده شد. برای شناسایی لاکتوباسیل ها و بررسی متابولیسم کربوهیدرات ها، قند مورد نظر به محیط MRS پایه فاقد عصاره گوشت و گلوکز اضافه شد و با افزودن فنل رد، کشت باکتری انجام گرفت. از محیط های SIM و زرده تخم مرغ آگار (yolk agar) و ژلاتین به ترتیب برای انجام آزمایش های حرکت، لسیتیناز و ژلاتیناز استفاده شدند. باکتری های اسید لاکتیک از دهان مطابق با کتاب Bergeys (۱۳) شناسایی شدند. در این بررسی pH رشد باکتری های اسید لاکتیک جدا شده نیز اندازه گیری شد. برای بررسی اثر بازدارندگی لاکتوباسیل ها، علیه سه باکتری اشریشیا کلی PTCC1399، شیگلا فلکسنری RTCC 1872 و سالمونلا پاراتیفی BRTCC1624، از سه روش نقطه گذاری، بلانک دیسک و ایجاد چاهک استفاده شد (۱۴). در بررسی اثر بازدارندگی به روش نقطه گذاری، از سوسپانسیون حاوی باکتری های اشریشیا کلی، شیگلا فلکسنری و سالمونلا پاراتیفی B در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده و سپس ۱۰ میکرو لیتر از کشت مایع صاف شده ۲۴ ساعته لاکتوباسیل به صورت نقطه ای بر روی سطح محیط مولر هینتون آگار قرار داده شد. در بررسی اثر بازدارندگی به روش بلانک دیسک، سوسپانسیون حاوی باکتری های اشریشیا کلی، شیگلا فلکسنری و سالمونلا پاراتیفی B در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده و سپس دیسک ها را بر روی محیط گذاشته و ۳۰ میکرو لیتر از کشت مایع صاف شده ۲۴ ساعته لاکتوباسیل بر روی دیسک ها ریخته شد. در بررسی اثر بازدارندگی

جدول ۱- توزیع فراوانی و ویژگی های افراد مورد پژوهش						
گروه سنی	افراد مورد بررسی	مصرف شیرینی	مصرف لبنیات	دفعات مسواک زدن در روز	استفاده از نخ دندان	تعداد دندان پوسیده
	مؤنث مذکر	هیچ متوسط زیاد	هیچ متوسط زیاد	هیچ یکبار دوبار سه بار	گاهی هفتگی روزانه	
کمتر از ۷ سال	۵ ۶	۲ ۳ ۶	۴ ۵ ۲	۳ ۲ ۶		۳
۷-۲۰	۷ ۱۰	۴ ۹ ۴	۴ ۱۳	۱ ۸ ۷ ۱	۲ ۱۵	۱۱
۲۱-۳۰	۵ ۱۲	۱۱ ۶	۱ ۱۰ ۶	۱ ۸ ۷ ۱	۷ ۴ ۷	۱۴
۳۱-۵۰	۷ ۹	۱ ۱۰ ۵	۴ ۸ ۴	۷ ۹	۴ ۱ ۱۱	۱۳
بیشتر از ۵۰ سال	۲ ۱۲	۴ ۱۰	۲ ۹ ۳	۵ ۳ ۱	۴ ۱ ۹	۷
مجموع %	%۳۴/۷ %۶۵/۳	%۴۱/۳ %۴۹/۳ %۹/۴	%۲۰ %۶۰ %۲۰	%۱۲ %۳۷/۳ %۴۱/۳ %۲/۷	%۸ %۷۰/۷ %۲۱/۳	%۶۴

بودند. ۶۷ لاکتوباسیل بر اساس تست تخمیر قندها و خواص بیوشیمیایی و ۸ مورد استرپتوکوک میوتانس بر اساس خواص بیوشیمیایی به دست آمدند. لاکتوباسیل ها شامل شش گونه، لاکتوباسیلوس فرمنتوم (۲۹/۸٪)، لاکتوباسیلوس کازنی (۲۰/۸٪)، لاکتوباسیلوس گاسری (۱۳/۴٪)، لاکتوباسیلوس برویس (۱۴/۹٪)، لاکتوباسیلوس پلانتروم (۱۱/۹٪) و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (۸/۹٪) بودند. در جدول شماره ۲، انواع و تعداد لاکتوباسیل های جدا شده در هر گروه سنی نشان داده شده است. در این بررسی، لاکتوباسیل های جدا شده از دهان، در شرایط آزمایشگاهی رشد اشریشیاکلی را متوقف کردند. اما بر روی سالمونلا و شیگلا دارای اثر مهاری ضعیف یا فاقد اثر بازدارندگی بودند. از میان ۶۷ لاکتوباسیل جدا شده، تنها ۲۸ مورد اثر مهاری داشتند. این لاکتوباسیل ها بیشتر از دهان افراد دارای پوسیدگی دندان، جداسازی شدند. pH رشد لاکتوباسیل ها و استرپتوکوک ها حدود ۴/۵-۳/۴ بود و کمترین pH مربوط به لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و بیشترین pH مربوط به لاکتوباسیلوس فرمنتوم بود.

#### بحث

در این بررسی، نمونه برداری از بزاق و اطراف دندان ۷۵ نفر در گروه های مختلف سنی توسط سواب انجام شد. با توجه به این که در دهان تمام افراد، باکتری های اسید لاکتیک در پوسیدگی دندان نقش دارند، هدف از این پژوهش یافتن باکتری های اسید لاکتیک موجود در دهان افراد بود. در سال ۲۰۰۵ Motisukic و همکاران، برای جداسازی لاکتوباسیل ها و استرپتوکوک های دهانی، به بررسی سه روش جمع آوری بزاق با سواب، جمع آوری دو میلی لیتر بزاق و جمع آوری پلاک از سطوح دندان ها پرداختند و برای

به روش ایجاد چاهک، ابتدا با انتهای پپت پاستور استریل بر روی محیط مولر هینتون آگار ایجاد چاهک کرده و سپس سوسپانسیون حاوی باکتری های اشریشیاکلی، شیگلا فلکسنری و سالمونلا پاراتیفی B در سطح محیط مولر هینتون آگار کشت داده و سپس ۳۰ میکرولیتر از کشت مایع صاف شده ۲۴ ساعته لاکتوباسیل درون چاهک ها ریخته شد. در هر سه روش، محیط ها در ۳۷ °C به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند.

#### نتایج

از فروردین ۱۳۸۵ تا مرداد ۱۳۸۵ جداسازی و شناسایی باکتری های اسید لاکتیک از دهان افراد انجام گرفت. جدول شماره ۱، تعداد کل نمونه های مورد بررسی را برحسب سن، جنس، مصرف شیرینی و لبنیات، رعایت بهداشت دهان و تعداد دندان پوسیده نشان می دهد. همان گونه که ملاحظه می شود، ۶۴٪ از افراد دارای پوسیدگی دندان و ۲۹/۳٪ فاقد دندان پوسیده و ۶/۷٪ از آن ها دارای دندان مصنوعی بودند. همچنین ۹۳/۳٪ از افراد دارای هر دو نوع تغذیه گیاهی و گوشتی بودند.

پس از جمع آوری نمونه ها توسط سواب از دهان افراد و کشت آن ها در محیط MRS براث و انتقال کلنی ها به محیط MRS آگار، در بعضی نمونه ها دو نوع کلنی ایجاد شد که یک سری کلنی های کوچک، صاف، براق و مات و یک سری کلنی های ریز و سفید بودند. پس از رنگ آمیزی گرم در زیر میکروسکوپ باسیل های گرم مثبت، بدون اسپور، فاقد حرکت و کوکسی های گرم مثبت مشاهده شدند. باسیل ها کاتالاز و اکسیداز منفی، ژلاتین منفی و لسیتیناز مثبت بودند و کوکسی های مورد بررسی در محیط استرپتوکوک سلکتیو آگار متعلق به استرپتوکوکوس میوتانس

**جدول شماره ۲: فراوانی و نسبت در صد لاکتوباسیل های جدا شده در دهان افراد مورد پژوهش**

گروه سنی	انواع لاکتوباسیلوس	لاکتوباسیلوس فرمنتوم	لاکتوباسیلوس کازئی	لاکتوباسیلوس برویس	لاکتوباسیلوس گاسری	لاکتوباسیلوس پلانتاروم	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	جمع کل %
کمتر از ۷ سال	۹ (٪۱۲)	۲ (٪۲/۶)	۴ (٪۵/۲)	۱ (٪۱/۴)	۱ (٪۱/۴)	-	۱ (٪۱/۴)	۱۱ (٪۱۴/۶)
۷-۲۰ سال	۱۳ (٪۱۷/۳)	۷ (٪۹/۳)	۴ (٪۵/۲)	۲ (٪۲/۶)	-	۱ (٪۱/۴)	-	۱۷ (٪۲۲/۶)
۲۱-۳۰ سال	۱۷ (٪۲۲/۶)	۴ (٪۵/۲)	۲ (٪۲/۶)	۱ (٪۱/۴)	۳ (٪۴)	۳ (٪۴)	۳ (٪۴)	۱۷ (٪۲۲/۶)
۳۱-۵۰ سال	۱۵ (٪۲۰)	۶ (٪۸)	۲ (٪۲/۶)	۴ (٪۵/۲)	۱ (٪۱/۴)	۲ (٪۲/۶)	-	۱۶ (٪۲۱/۳)
۵۱ سال به بالا	۱۳ (٪۱۷/۳)	۱ (٪۱/۴)	۲ (٪۲/۶)	۲ (٪۲/۶)	۴ (٪۵/۲)	۲ (٪۲/۶)	۲ (٪۲/۶)	۱۴ (٪۱۸/۶)
جمع	۶۷ (٪۸۹/۳)	۲۰ (٪۲۶/۶)	۱۴ (٪۱۸/۶)	۱۰ (٪۱۳/۳)	۹ (٪۱۲)	۸ (٪۱۰/۶)	۶ (٪۸)	۱۰۰

پاراکازئی، لاکتوباسیلوس گاسری و لاکتوباسیلوس فرمنتوم را از افرادی که دارای دندان پوسیده و بدون دندان پوسیده جدا کنند (۱۷).

در سال ۲۰۰۷، Strahinic و همکاران به بررسی لاکتوباسیل های جدا شده از دهان انسان به عنوان سویه های پروبیوتیک پرداختند. آن ها نمونه ها را از چهار قسمت مختلف حفره دهانی جدا کردند و با توالی یابی ژن های 16S rDNA و واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR) به تعیین گونه ها پرداختند. گونه های غالب جدا شده شامل لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس سالیاریوس و لاکتوباسیلوس پاراکازئی زیرگونه پاراکازئی بودند. همچنین گونه های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس سلویوسوس، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیرگونه لاکتیس و لاکتوباسیلوس گاسری وجود داشتند (۱۸).

لاکتوباسیل های جدا شده در این بررسی با لاکتوباسیل های جدا شده در پژوهش های انجام شده در سایر کشورها تا حدی یکسان بود و احتمالاً دلیل تفاوت های اندک آن نیز می تواند به دلیل متفاوت بودن نوع رژیم غذایی در کشورهای مختلف باشد. با توجه به این که نمونه ها از کودکان بالای دو سال گرفته شد و آن ها دارای تغذیه مشابه با بزرگسالان بودند، بنابراین لاکتوباسیل های

یافتن استرپتوکوکوس میوتانس از محیط SB20 و برای مشاهده لاکتوباسیل ها از محیط Rogosa Agar و نگهداری در حرارت ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت استفاده نمودند. محققین یاد شده نتیجه گرفتند برای ردیابی لاکتوباسیل در دهان، بهترین روش، جمع آوری بزاق به مقدار زیاد و برای یافتن استرپتوکوکوس میوتانس، هر دو روش جمع آوری مقدار زیاد بزاق و پلاک دندانی می باشد (۱۵).

در این بررسی، از ۷۵ نمونه جمع آوری شده، ۶۷ نوع لاکتوباسیلوس جدا شد. لاکتوباسیل ها شامل شش گونه؛ لاکتوباسیلوس فرمنتوم (٪۲۹/۸)، لاکتوباسیلوس کازئی (٪۲۰/۸)، لاکتوباسیلوس گاسری (٪۱۳/۴)، لاکتوباسیلوس برویس (٪۱۴/۹)، لاکتوباسیلوس پلانتاروم (٪۱۱/۹)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (٪۸/۹) بودند و ۸ مورد استرپتوکوکوس میوتانس شناسایی شد که ۶۴٪ افراد دارای دندان پوسیده و ۲۹/۳٪ فاقد دندان پوسیده و ۶/۷٪ آن ها دارای دندان مصنوعی بودند. در سال ۲۰۰۲، Krishnakumr و همکاران با جمع آوری بزاق از ۱۰ کودک دارای پوسیدگی دندان و فاقد پوسیدگی نشان دادند که استرپتوکوکوس میوتانس در آغاز پوسیدگی و لاکتوباسیل ها ادامه دهنده پوسیدگی دندان می باشند (۱۶).

Hojo و همکاران در سال ۲۰۰۳ موفق شدند لاکتوباسیلوس

لاکتوباسیلوس واژینالیس، لاکتوباسیلوس فرمتوم و لاکتوباسیلوس سالیاریوس از چهار نفر از شش مورد جداسازی شدند. این بررسی نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌های مداخله‌کننده در پوسیدگی دندان از عوامل خارجی و فرصت طلب هستند که همراه با غذا و دیگر مواد خارجی وارد دهان می‌شوند (۲۰).

در این پژوهش، pH رشد لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوک‌ها نیز مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که لاکتوباسیل‌های مورد بررسی pH حدود ۶/۵ - ۳/۴ را دارند. این امر نشان می‌دهد که لاکتوباسیل‌ها و استرپتوکوک‌های دهانی اسید دوست هستند و شرایط اسیدی را به راحتی تحمل می‌کنند. در بررسی حاضر، اثر بازدارندگی لاکتوباسیل‌ها بر روی سه باکتری اشریشیا کلی، سالمونلا و شیگلا بررسی شد. اما لاکتوباسیل‌های جدا شده فقط بر روی اشریشیا کلی اثر بازدارندگی داشتند و بر روی سالمونلا و شیگلا، یا فاقد اثر مهاری بودند یا اثر مهاری بسیار ضعیفی داشتند. Smith و دیگر همکاران در سال ۲۰۰۱، لاکتوباسیل‌های جدا شده از افراد دارای دندان پوسیده که شامل لاکتوباسیلوس برویس، لاکتوباسیلوس فرمتوم، لاکتوباسیلوس کازئی، لاکتوباسیلوس دلبروکی، لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس جانسونی، لاکتوباسیلوس سالیاریوس و لاکتوباسیلوس گاسری بود را برای تولید باکتریوسین علیه اشریشیا کلی، گونه‌های سالمونلا، شیگلا دیسانتری، شیگلا سونئی، کلبسیلا، کمپیلوباکتر بررسی کردند. تمام لاکتوباسیل‌ها به جز لاکتوباسیلوس جانسونی، علیه حداقل یکی از ارگانسیم‌ها، تولید باکتریوسین می‌کردند (۲۱). همچنین Almendarez در سال ۲۰۰۰ مشخص کرد که لاکتوباسیلوس پلانتروم علیه پاتوژن‌های غذایی تولید باکتریوسین می‌کند (۱۴).

در سال ۲۰۰۷، Strahinic و همکاران مشخص کردند که لاکتوباسیلوس‌های جدا شده از حفره دهانی که شامل لاکتوباسیلوس سالیاریوس BGHO1، لاکتوباسیلوس فرمتوم BGHO36 و BGHO64، لاکتوباسیلوس گاسری BGHO89، لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه لاکتیس BGHO99 بودند بر روی رشد استافیلوکوکوس اورئوس، انتروکوکوس فکالیس، میکروکوکوس فلاووس، سالمونلا انتریدیس، استرپتوکوکوس نمونیه، استرپتوکوکوس میوتانس اثر آنتاگونیسمی دارند اما بر روی رشد کاندیدا آلیکنس اثری نداشتند (۱۸).

با توجه به نتایج به دست آمده از این بررسی، مشخص شد که لاکتوباسیل‌ها جزء میکروفلورای ثابت دهان هستند و انواع

جدا شده در این گروه سنی، نیز مشابه با بزرگسالان بود. در این پژوهش، مصرف شیرینی و لبنیات در نمونه‌های جمع‌آوری شده بررسی شد و با توجه به این که ۶۴٪ از نمونه‌های جمع‌آوری شده دارای دندان پوسیده بودند، ۵۲٪ از آن‌ها دارای مصرف شیرینی به طور متوسط و ۱۲/۵٪ از آن‌ها دارای مصرف زیاد و ۳۵/۵٪ از آن‌ها دارای مصرف کم شیرینی بودند. همچنین، ۶۲/۵٪ از آن‌ها دارای مصرف متوسط و ۲۷٪ دارای مصرف کم و ۱۰/۵٪ دارای مصرف زیاد لبنیات بودند. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که مصرف رژیم قند و لبنیات به احتمال زیاد در پوسیدگی دندان نقش دارند. باید توجه داشت که لبنیات به دلیل دارا بودن کلسیم، باعث استحکام مینای دندان می‌شود. اما به علت داشتن میکروارگانسیم‌های تخمیری، دو مطلب قابل توجه است. یکی این که میکروارگانسیم‌های تخمیری موجود در لبنیات از یک جهت به خاطر دارا بودن خاصیت پروبیوتیکی برای بدن و دستگاه گوارش مفید هستند و از طرفی به دلیل کاهش pH دهان شرایط برای ایجاد پوسیدگی دندان را فراهم می‌کنند. بنابراین مصرف لبنیات باید متناسب باشد و پس از مصرف لبنیات ضرورت مسواک زدن و یا شستشو با دهان شویه وجود دارد. همچنین استفاده از مواد قندی می‌تواند منجر به تولید اسید توسط باکتری‌های دهانی گردد. از جمله این باکتری‌ها می‌توان به استرپتوکوکوس میوتانس و لاکتوباسیل‌ها اشاره نمود که این باکتری‌ها تولیدکننده پوسیدگی دندان هستند (cariogenic)، یعنی این باکتری‌ها با مصرف قند و تولید اسید، مینای دندان را تخریب کرده و باعث پوسیدگی می‌شوند. در سال ۲۰۰۲، Santosm و همکاران، ارتباط بین مصرف روزانه قند، ترکیب پلاک‌دندانی و پوسیدگی دندان را ارزیابی کردند. نامبردگان مشاهده نمودند که غلظت فلوراید، کلسیم و فسفات معدنی در کودکان دارای پوسیدگی دندان، کمتر است. از طرفی میزان پلی‌ساکاریدهای نامحلول و استرپتوکوکوس میوتانس در پلاک‌های دندانی این افراد بیشتر بود. در این صورت می‌توان نتیجه‌گیری نمود که مصرف رژیم قندی می‌تواند ترکیب بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی پلاک‌دندانی را تغییر دهد (۱۹).

در سال ۲۰۰۷، Caufield و همکاران به بررسی ویژگی‌های لاکتوباسیل‌های جدا شده از بزاق شش خانم دارای پوسیدگی دندان با استفاده از روش‌های شناسایی ژنتیکی پرداختند. آن‌ها ۳۰ باکتری جدا شده از هر فرد را بر روی محیط Rogosa کشت دادند و لاکتوباسیل‌ها را آنالیز کردند. از ۱۸۰ مورد، ۱۷۶ مورد به وسیله بیوتیپ، نقطه ذوب DNA، ژنوتیپ و فیلوژنیک شناسایی شدند و

می یابد، لذا امروزه از خواص رقابتی باکتری های پاتوژن با باکتری های پروبیوتیک از جمله باکتری های اسید لاکتیک و به خصوص لاکتوباسیلوس جهت ممانعت از رشد آن ها استفاده می شود. برای جلوگیری از ایجاد پوسیدگی دندان، رعایت تمام نکات از جمله رعایت بهداشت دهان، مصرف کم شیرینی، استفاده بیشتر از لبنیات، و نوع تغذیه را باید در نظر گرفت و رعایت یک نکته به تنهایی برای پیشگیری از پوسیدگی دندان کافی نیست.

### پیشنهادات

۱. استفاده از باکتری های اسید لاکتیک، به ویژه لاکتوباسیل های دارای خاصیت ضد میکروبی به عنوان آغازگر در غذاهای تخمیری مانند لبنیات، سوسیس و کالباس.
۲. استفاده از شیوه های غیر آنتی بیوتیکی برای از بین بردن عفونت و استفاده از باکتری های غیر پاتوژن و پروبیوتیک.
۳. ساختن و ارائه خمیر دندان هایی که علاوه بر فلوراید دارای خاصیت پروبیوتیکی و خواص ضد میکروبی علیه باکتری های ایجاد کننده پوسیدگی دندان باشند.

لاکتوباسیل را می توان از دهان جدا سازی کرد که این مسأله بیشتر مربوط به نوع تغذیه افراد می شود و همان طور که مشخص شد ۹۳/۳٪ از افراد دارای هر دو نوع تغذیه گیاهی و گوشتی بودند. لاکتوباسیل ها اگرچه به عنوان عامل ثانویه در پوسیدگی دندان نقش دارند اما از طرفی جزء میکروارگانیزم های پروبیوتیک نیز هستند و با تولید مواد بازدارنده از رشد پاتوژن ها جلوگیری می کنند. عامل اولیه در ایجاد پوسیدگی دندان، استرپتوکوکوس میوتانس است که با رعایت نکردن شرایط بهداشت دهان، مصرف کم لبنیات، مصرف زیاد شیرینی و شرایط دیگری مانند سن و جنس دندان، شرایط برای رشد این باکتری های میکروفلورای دهانی فراهم می شود. همچنین تولید اسید حاصل از تخمیر کربوهیدرات ها، شرایط مناسبی را برای فعالیت سایر باکتری ها به ویژه لاکتوباسیل های ایجاد کننده پوسیدگی دندان فراهم می کند.

### نتیجه گیری

باکتری های گرم منفی روده ای به ویژه سالمونلا، شیگلا و اشریشیاکلی از مهم ترین عوامل ایجاد کننده بیماری ناشی از غذا و اسهال به ویژه در کشورهای در حال توسعه می باشند. از طرفی چون مقاومت های دارویی در این باکتری ها روز به روز افزایش

### References

1. Russell, R.R.B. Oral infections: In sussman max: Molecular Medical Microbiology. 2002;Vol 2. 1065.
2. Nester, E. W., Roberts C., Pearsall N. (1998). Microbiology: A human Perspective. WCB McGraw - Hill, Boston. See information in: <http://sciweb.hfcc.edu/Biology/jacobs/micro/caries/caries.htm#9>
3. Holt J. G., Kreig N. R., Sneath P., Staley J., and Williams S. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Nineth Edition. Williams & Wilkins, Baltimore. See information in: <http://sciweb.hfcc.edu/Biology/jacobs/micro/caries/caries.htm#9>
4. Topley and Wilson's. Microbiology and Microbial Infections . 2005;Vol 1. 848-881.
5. De Vuyst L. (1994). Bacteriocins and bacteriocin like substances from lactobacillus. P: 319-329. In De Vuyst and Vandamme E.J. (ed): Bacteriocins of lactic acid bacteria. Genetics and application. Blackie Academic and professional London.
6. Wood B. J. B., (1992): The lactic acid bacteria, vol 1. The lactic acid bacteria in health and disease. Elsevier Applied Science: UK.
7. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou Tsakalidou E, Servin A, De Vuyst L Res Microbiol. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. 2006;157 (3): 241-7.
8. Vanderhoof J. A., Whitney D. B., Antonsson D. L., Hanner T. L., Lupo J. V. & Young R. J. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children. Journal of Pediatrics.1999;135, 564-8.
9. Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkänen H., Salminen S., Maunula L. et al. Prophylactic Lactobacillus GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: a randomized study. Pediatrics.1999;104, 64.
10. Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. American Journal of Clinical Nutrition. 2001;73, Suppl., 437-43.
11. Famularo G., Pieluigi M., Coccia R., Mastroiacovo P. & De Simone C. (2001). Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotherapy. Medical Hypotheses 56, 421-30.
12. Comelli E. M., Guggenheim B., Stingle F. & Neeser J. R. Selection of dairy bacterial strains as probiotics for oral health. European Journal of Oral Sciences. 2002;110, 218-24.
13. Kandler O, Weiss N. Regular, non-sporing Gram positive rids. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Eilkins, USA. 1986;Vol. 2. Section 14. 1208-1260.
14. Garcia - Almendarez B E., Regalado - Gonzalez C I J. Detection and partial purification of a bacteriocin produced by

- Lactobacillus plantarum BAL-1 isolated from locally kefir. Division De Estudios De Posgrade., 2000;pp: 1.
15. Motisuki C, Lima LM, Spolidorio DM, Santos-Pinto L. Arch Oral Biol . Influence of sample type and collection method on Streptococcus mutans and Lactobacillus spp. counts in the oral cavity. 2005;50(3): 341-5.
  16. Krishnakumar R, Singh S. Indian Soc Pedod Prev Dent . Composition of levels of mutans streptococci and lactobacilli in children with nursing bottle caries, rampant caries, healthy children with 3-5 dmft/DMFT and healthy caries free children. 2002;20(1): 1-5.
  17. Hojo K., Taketomo N., Ohshima T. (2003). 0492 Lactobacillus species isolated from the mouths Healthy Subjects.
  18. Strahinic I, Busarcevic M, Pavlica D, Milasin J, Golic N, Topisirovic L. Molecular and biochemical characterizations of human oral lactobacilli as putative probiotic candidates. 2007,22(2): 111-7
  19. Nobre dos Santos M, Melo dos Santos L, Francisco SB, Cury JA. Caries Res. Relationship among dental plaque composition, daily sugar exposure and caries in the primary dentition. 2002 ;36(5): 347-52.
  20. Caufield PW, Li Y, Dasanayake A, Saxena D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. 2007;41(1): 2-8.
  21. Smith SI, Aweh AJ, Coker AO, Savage KO, Abosedo DA, Oyedeji KS. Microbios. Lactobacilli in human dental caries and saliva. 2001; 105 (411): 77-85.



[www.jmw.ir](http://www.jmw.ir)





## Isolation and identification of Lactic Acid Bacteria in the people's mouth and studying on their inhibitory effect on some entropathogenic bacteria

Noroozi J<sup>1\*</sup>, Hanafari A<sup>2</sup>, Beiglari Sh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Science Faculty, Azad University North Branch, Tehran, Iran

### Abstract

**Background and objectives:** Predominant organisms in plaques are of the genus *Streptococcus*, with *Streptococcus mutans* being the species most important in the formation of dental caries. Another organism that is important in the development of caries is the lactobacillus. *Lactobacillus* species are not important in the initiation of caries but in the continuation. The aim of this study was to isolate and identify of lactic acid bacteria from the mouth in different ages, determination of pH and study the inhibitory effect of isolated *Lactobacilli* on some entropathogens bacteria (*Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli*).

**Material and Methods:** From 75 persons in different ages, the samples were collected from saliva and around dental and were cultured in MRS medium. *Lactobacilli* and *Streptococci* were isolated and identified by standard methods (morphology, microscopic shape and chemical characteristics and fermentation of carbohydrates). Growth pH of isolated *Lactobacillus* was determined. Inhibitory effects of isolated bacteria were evaluated by spot on the lawn, blank disk and well-diffusion methods on *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli*.

**Results:** Isolated *Lactobacillus* were including *L. fermentum*, *L. casei*, *L. gasseri*, *L. brevis*, *L. plantarum* and *L. acidophilus*, and isolated *Streptococci* was *Streptococcus mutans*. Isolated *Lactobacilli* had inhibitory effect on *Escherichia coli* but they didn't have any inhibitory effect on *Salmonella* and *Shigella*.

**Conclusion:** Our results showed that some *Lactobacilli* had inhibitory effect on some pathogenic in vitro. So, consumption of dairy (because of the presence of *Lactobacilli*) is recommended.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, Mouth, Inhibitory effect