**Quarterly of the Horizon of Medical Sciences**
**Vol. 19, No. 2, Sum 2013**
**Pages: 89-95**

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

# Synergistic Antimicrobial Effect of *Lactobacillus plantarum* with Extracts of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens* on *Salmonella typhimurium*; *in vitro* and in Animal Model

**Tizfahm Tikmehdash H.[1] *MSc*, Nasiri Semnani Sh.* *PhD*, Tajabadi Ebrahimi M.[2] *PhD*, Alizadeh H.[3] *MSc*, Javadzade Y.[4] *PhD*, Hamed Yazdan S.[5] *PhD***

[*]Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[1]Biology Research Center, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[2]Department of Microbiology, Faculty of Sciences, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
[3]Yong Researchers & Elite Club, Zanjan Branch, Islamic Azad University, Zanjan, Iran
[4]Department of Pharmaceutics, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[5]Department of Pharmacognosy, Pharmacy Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

**Abstract**

**Aims:** Gastroenteritis caused by *Salmonella typhimurium* and the treatment of this disease with antibiotics follows by problems such as drug resistance and side effects emergence. Using herbs and probiotics can be a solution to this problem. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of *Lactobacillus plantarum* with extracts of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens* on *Salmonella typhimurium*; *in vitro* and in animal model.

**Methods:** In this experimental study, 35 female mice 6 to 8 weeks old were divided into 7 groups of 5. The mice infected with appropriate strains of *Salmonella typhimurium*. After extraction of *Satureia hortensis* and *Anethum geravolens*, antibacterial effect *on Salmonella typhimurium* was studied *in vitro*. Antibacterial activity of 5 strains of *Lactobacillus plantarum* that showed the highest amount of exopolysacharide production studied on *Salmonella typhimurium*. Mice were treated with oral and growths of *Salmonella typhimurium* in their feces were assessed. The results were analyzed by one-way ANOVA test in SPSS 18 software.

**Results:** Mice which treated with ethanolic extract of *Satureia hortensis* alone and in combination with probiotic showed significant decrease in the rate of excretion and colonization of *Salmonella typhimurium* in comparison with mice that treated with ethanolic extract of *Anethum geravolens* alone and in combination with neutralize probiotic and control groups.

**Conclusion:** Ethanolic extract of *Satureia hortensis* has a synergistic effect on antimicrobial effect of *Lactobacillus plantarum* neutralized supernatant against *Salmonella typhimurium*.

**Keywords:** Probiotic, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum*, *Satureia hortensis* extract, *Anethum geravolens* extract

[*]Corresponding Author: All requests Should be sent to: sh.nasiri92@yahoo.com
Received: 12 December 2011 Accepted: 18 June 2013

# هم‌افزایی اثر ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با عصاره‌های مرزه و شوید بر *سالمونلا تیفی‌موریوم*؛ در *شیشه* و در مدل حیوانی

**حسن تیزفهم تکمه‌داش MSc**
مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
**شهرزاد نصیری سمنانی* PhD**
مرکز تحقیقات زیست‌شناسی، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
**مریم تاج‌آبادی ابراهیمی PhD**
گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکز، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
**حامد علیزاده MSc**
باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد زنجان، دانشگاه آزاد اسلامی، زنجان، ایران
**یوسف جوادزاده PhD**
گروه داروشناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
**ساناز حامدیزدان PhD**
گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

## چکیده

**اهداف:** *سالمونلا تیفی‌موریوم* عامل بیماری گاستروآنتریت است که درمان آن با آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلاتی مانند مقاومت دارویی و بروز عوارض جانبی را به دنبال دارد. استفاده از گیاهان دارویی و پروبیوتیک‌ها می‌تواند راه حل این مشکل باشد. این پژوهش با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و عصاره گیاهان دارویی مرزه و شوید به صورت جداگانه و توام بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مدل آزمایشگاهی و حیوانی صورت گرفت.

**روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، از ۳۵ سر موش ماده BALB/c ۸–۶هفته‌ای در ۷ گروه ۵تایی استفاده شد. موش‌ها با استفاده از سوش مناسب *سالمونلا تیفی‌موریوم* مبتلا به عفونت شدند. پس از عصاره‌گیری از شوید و مرزه، اثر ضدباکتریایی آنها *در شیشه* بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی شد. اثر ضدباکتریایی ۵ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* که بالاترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را داشتند بر رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* بررسی شد. موش‌ها با مصرف خوراکی تیمار شده و میزان *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مدفوع آنها مورد بررسی قرار گرفت. یافته‌ها با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه تحلیل شدند.

**یافته‌ها:** موش‌هایی که با عصاره اتانولی مرزه به‌تنهایی و توام با سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک تیمار شده بودند نسبت به موش‌هایی که با عصاره اتانولی شوید به‌تنهایی و توام با عصاره خنثی پروبیوتیک تیمار شده بودند و گروه کنترل، کاهش معنی‌داری در میزان دفع و کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشتند.

**نتیجه‌گیری:** عصاره اتانولی مرزه تاثیر هم‌افزایی بر اثر ضدمیکروبی سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* دارد.

**کلیدواژه‌ها:** پروبیوتیک، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، عصاره مرزه، عصاره شوید

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۹/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲۸
* نویسنده مسئول: sh.nasiri92@yahoo.com

## مقدمه

بیماری‌های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان، از مهم‌ترین بیماری‌ها هستند. *سالمونلا تیفی‌موریوم* باسیل گرم‌منفی، هوازی یا بی‌هوازی اختیاری، به ابعاد ۰/۵ در ۳ میکرون، فاقد اسپور، متحرک و دارای فلاژل پری‌تریش از شایع‌ترین عوامل باکتریایی در عفونت‌های گوارشی و به عنوان رایج‌ترین عامل سالمونلوزیس به شمار می‌رود [۴–۱]. تغییر فلور بی‌هوازی روده‌ای با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها، میزبان را بیشتر در معرض عفونت‌های سالمونلایی قرار می‌دهد. مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها برای درمان و پیش‌گیری از عفونت‌های ذکرشده، نه‌تنها باعث ایجاد مقاومت دارویی در آنها می‌شود، بلکه سبب به‌هم‌خوردن فلور نرمال مفید دستگاه گوارش شده و بدن را مستعد ابتلا به انواع بیماری‌های روده‌ای مثل اسهال می‌نماید. باکتری‌های پروبیوتیک با توانایی تغییر فلور میکروبی روده، نقش مهمی به عنوان باکتری‌های مفید در بدن ایفا می‌کنند. شواهد زیادی مبنی بر توان میکروأُرگانیسم‌های پروبیوتیک در حفظ فلور میکروبی مطلوب روده و اثرات درمانی آنها وجود دارد. مصرف خوراکی پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروأُرگانیسم‌هایی که در محیط زنده با عامل میکروبی پاتوژن مقابله می‌کنند، می‌توانند بدن را در برابر عوامل بیماری‌زا مصون نمایند [۴].

رایج‌ترین گونه‌های پروبیوتیک‌ها شامل لاکتوباسیلوس‌ها، ساکارومیسس‌ها، بیفیدوباکتریوم‌ها، انتروکوکوس‌ها و کلستریدیوم‌ها هستند [۵، ۶]. لاکتوباسیلوس‌ها باکتری‌های غیرپاتوژنی هستند که با کاهش pH محیط و تولید موادی مانند باکتریوسین، پراکسید هیدروژن، دی‌استیل، استالدئید، آمونیاک و اسیدهای چرب آزاد می‌توانند اثر بازدارندگی روی رشد بسیاری از میکروأُرگانیزم‌ها داشته باشند [۷]. تغذیه با پروبیوتیک‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی منجر به تحریک ایمنی سلول‌ها می‌شود. این باکتری‌ها موجب افزایش تعداد گلبول‌های قرمز، لنفوسیت‌ها و فعالیت لیزوزیم شده و همانند واکسن‌های خوراکی عمل می‌نمایند [۱۲–۸]. پری‌بیوتیک‌ها قادرند ترکیب فلور میکروبی روده را بعد از یک دوره کوتاه تغذیه‌ای تغییر دهند. اثرات مثبت پری‌بیوتیک‌ها روی بهبود روند هضم (تشدید جذب مواد معدنی)، تقویت سیستم ایمنی، جذب کلسیم و سایر مواد معدنی، تنظیم pH و حرکات روده‌ای به اثبات رسیده است [۱۳، ۱۴]. مصرف پری‌بیوتیک‌ها علاوه‌بر تحریک و تقویت رشد و فعالیت پروبیوتیک‌ها در بدن، ممکن است مستقیماً اثرات سودمند و



Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

سلامت‌بخش نیز به همراه داشته باشند. مهم‌ترین پری‌بیوتیک‌های طبیعی شامل ترکیبات گیاهی فیتو (مانند اسیدفیتیک)، مالتودکسترین‌ها، اولیگوساکاریدها، پکتین، زایلان، لاکتیتول، استاکیز، رافینوز، گلوکوزیل ساکاروز، اسیدهای چرب غیراشباع لاکتوبیونیک‌اسید و فیبرهای رژیمی غلات و حبوبات (مانند همی‌سلولز، پنتوزان‌ها یا آرابینوزایلان‌ها و β- گلوکان‌ها) هستند [۱۵، ۱۶].

کاربرد همزمان پری‌بیوتیک و پروبیوتیک (سین‌بیوتیک) با هدف به‌وجود آوردن هم‌افزایی در اثرات سلامت‌بخش آنها، تاثیر قابل ملاحظه‌ای در افزایش تولید مواد غذایی سین‌بیوتیک، به ویژه در غذای نوزادان و سالخوردگان داشته است [۱۷]. گیاهان دارویی به دلیل داشتن مقادیر زیادی از ترکیبات فرار آروماتیک، دارای خاصیت ضداکسایشی و ضدمیکروبی بوده و به صورت یک جز عملگر، یک طعم‌دهنده و نیز به عنوان یک نگهدارنده در مواد غذایی عمل می‌کنند [۱۸].

مرزه (*Satureia hortensis L.*) از خانواده نعناع (Labiatae) بوده و با داشتن کارواکرول در اسانس خواص ضدقارچی، ضدمیکروبی، خلط‌آور، ضداسپاسم و ضداسهال دارد [۱۹، ۲۰]. شوید (*Anethum graveolens*) از خانواده چتریان (Umbelliferae) که غنی از ترکیبات فلاوونوئیدی (کوئرستین ۳-۰- بتا دی‌گلوکوروئید و ایزورامنتین ۳-۰- بتا دی‌گلوکوروئید) بوده و اثرات ضدقارچی و ضدباکتری دارد. مطالعات نشان می‌دهند که پروبیوتیک‌ها پس از مصرف به صورت خوراکی توسط اتصال به گیرنده‌ها، با پاتوژن‌هایی نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس*، سالمونلا، شیگلا، اشریشیا، انتروباکتر، ویبریوکلرا و هلیکوباکتر پیلوری رقابت نموده و می‌توانند از طریق ترکیب با عوامل ضدمیکروبی مانند گیاهان اثر هم‌افزایی ایجاد کرده و مانع از اتصال و کلونیزاسیون این باکتری‌ها شوند [۲۶-۲۱].

این پژوهش با هدف بررسی فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و عصاره گیاهان دارویی مرزه و شوید به صورت جداگانه و توام بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* در مدل آزمایشگاهی و حیوانی صورت گرفت.

## روش‌ها

در این مطالعه تجربی، از ۳۵ سر موش ماده BALB/c ۸-۶هفته‌ای (انستیتو پاستور کرج؛ ایران) در ۷ گروه ۵تایی استفاده شد. پیش از شروع آزمایش، یک گرم مدفوع از هر موش برای تایید وجود یا عدم وجود آلودگی به *سالمونلا تیفی‌موریوم* نمونه‌برداری شد. موش‌های گروه I و II هیچ مداخله‌ای دریافت نکردند با این تفاوت که در گروه اول عفونت سالمونلایی ایجاد نشد ولی در گروه دوم عفونت سالمونلایی ایجاد شد. در ۵ گروه بعدی عفونت سالمونلایی ایجاد شد و موش‌های گروه III با عصاره الکلی مرزه، گروه IV با عصاره الکلی شوید، گروه V با عصاره خنثی سویه T14، گروه VI با عصاره الکلی مرزه و عصاره خنثی سویه T14 و گروه VII با عصاره الکلی شوید و عصاره خنثی سویه T14 تیمار شدند. پروتکل اخلاقی حقوق حیوانات آزمایشگاهی مورد تایید وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی در همه مراحل رعایت شد.

**آماده‌سازی سوش باکتری برای ایجاد عفونت در موش‌ها:** سوش *سالمونلا تیفی‌موریوم* برای ایجاد عفونت در موش‌ها با کشت ۲۴ساعته سویه میکروبی *سالمونلا تیفی‌موریوم* (ATCC ۱۴۰۲۸، مرکز تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد زنجان؛ ایران) در محیط نوترینت‌براث با کدورت ۰/۵مک‌فارلند حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر تهیه و برای تعیین غلظت مورد استفاده، میزان جذب آن با کدورت‌سنجی در طول موج ۶۰۰نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۷]. ۰/۵میلی‌لیتر از باکتری در روز اول به صورت خوراکی و سپس به‌مدت یک هفته هر ۸ ساعت، یک‌میلی‌لیتر از تیمارها با استفاده از سوزن گاواژ به موش‌ها ارایه شد [۲۸].

**انتخاب نوع عصاره گیاهی برای تیمار:** برگ‌های مرزه و شوید پس از جمع‌آوری (تیکمه‌داش، آذربایجان شرقی؛ ایران)، خشک و پودر شده و تا زمان عصاره‌گیری، در شیشه‌های مات نگهداری شدند. برای عصاره‌گیری، ۱۰۰گرم از پودر هر گیاه با ۷۰۰میلی‌لیتر حلال (آب‌مقطر، اتانول، استون) به‌مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه شیکر مخلوط و پس از صاف‌شدن با دستگاه تقطیر در خلاء، عصاره‌ها به‌میزان ml۵۰ (آبی)، ml۲۰ (اتانولی) و ml۲۰ (استونی) غلیظ شدند. عصاره‌های تغلیظ‌شده با فیلتر میکروبی ۰/۴۵میکرونی استریل و برای مصارف بعدی درون میکروتیوب‌های ۱/۵میلی‌لیتری استریل ریخته و در دمای ۸۰°C- نگهداری شدند [۲۹]. در هنگام مصرف، ۲میلی‌لیتر از حجم نهایی عصاره‌ها با ۲میلی‌لیتر DMSO حل شد. برای تعیین MIC و MBC عصاره‌های مرزه و شوید از روش ماکرودایلوشن استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت‌های ۲۰۰ تا ۳/۱۲۵میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر از عصاره‌ها در محیط مولرهینتون‌براث تهیه و یک‌میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی معادل با کدورت ۰/۵ مک‌فارلند به آن افزوده و در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. از لوله شامل باکتری در محیط فاقد عصاره به عنوان کنترل مثبت استفاده شد [۲۷، ۳۰، ۳۱].

**انتخاب سویه مناسب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* برای تیمار:** از میان ۲۲ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* جداشده از محصولات لبنی تخمیری (کلکسیون میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران مرکزی؛ ایران)، ۵ سویه که بالاترین تولید اگزوپلی‌ساکارید را بعد از کشت در محیط لاکتوباسیلی MRS آگار برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۷°C و ۸٪ دی‌اکسیدکربن داشتند،

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

انتخاب شدند [۳۲]. ۵ سویه لاکتوباسیل، به صورت جداگانه، در ۵ لوله محتوی ml۱۰ محیط MRSبراث تلقیح و به‌مدت ۷۲–۴۸ ساعت در انکوباتور $CO_2$دار در دمای ۳۷°C قرار داده شد؛ پس از سانتریفیوژ در rpm۵۰۰۰ به‌مدت ۲۰ دقیقه، سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با فیلتر استریل شدند [۳۲]. به ازای هر یک از ۵ سویه لاکتوباسیل، یک بلانک (شامل ml۵ محیط نوترینت براث و درصدی از محیط MRS براث معادل درصد سوپرناتانت)، یک شاهد (کنترل منفی)، یک نمونه با سوپرناتانت اسیدی و یک نمونه با سوپرناتانت خنثی در نظر گرفته شد. نمونه‌های خنثی و اسیدی هر یک شامل ml۵ محیط نوترینت‌براث، ۵، ۱۰ و ۱۵٪ از سوپرناتانت‌های سویه‌ها به صورت جداگانه و ۱٪ باکتری اندیکاتور (*سالمونلا تیفی‌موریوم* CFU/ml $۱\times۱۰^{۶}$) بود. در نهایت جذب نوری کنترل و نمونه‌های تیماری لوله‌های انکوبه‌شده (در دمای ۳۷°C به‌مدت ۲۴ ساعت)، در طول موج ۶۰۰نانومتر اندازه‌گیری شد [۲۲].

**بررسی اثر ضدباکتریایی توام:** برای بررسی اثرات ضدمیکروبی عصاره اتانولی مرزه یا شوید و سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط آزمایشگاهی، MIC برای هر کدام از عصاره‌ها به نسبت ۲۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰٪ با روش رقت در براث به‌دست آمد.

بعد از ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰، ۱۴۴ و ۱۶۸ ساعت از تلقیح *سالمونلا تیفی‌موریوم* و انجام مراحل تیمار یک گرم از مدفوع نمونه‌ها در نرمال‌سالین استریل حل و یک‌میلی‌لیتر از سوسپانسیون رقت‌های ۱:۱۰، ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰، ۱:۱۰۰۰۰ در محیط XLD کشت و پس از گذشت ۲۴ ساعت انکوباتور در دمای ۳۷°C کلنی‌های رشدیافته بر حسب CFU/g اندازه‌گیری شد [۳۳].

یافته‌ها با نرم‌افزار SPSS 18 و آزمون آماری تحلیل واریانس یک‌طرفه در سطح معنی‌داری $p<۰/۰۱$ تحلیل شدند.

## نتایج

در هیچ کدام از موش‌ها قبل از آزمایش عفونت به *سالمونلا تیفی‌موریوم* مشاهده نشد. عصاره‌های اتانولی گیاهان مورد استفاده نسبت به عصاره‌های آبی و استونی اثر مهاری بیشتری بر رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشتند، در نتیجه عصاره‌های اتانولی گیاهان برای بررسی فعالیت ضدمیکروبی بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* انتخاب شد. سوپرناتانت خنثی سویه T14 و سوپرناتانت اسیدی سویه TD4 بیشترین مهار رشد *سالمونلا تیفی‌موریوم* را نسبت به سایر سوپرناتانت‌ها داشتند و سوپرناتانت خنثی T14 برای انجام فعالیت‌های ضدمیکروبی به همراه عصاره‌های گیاهان انتخاب شد (جدول ۱).

**جدول ۱)** میزان جذب نوری سویه *سالمونلا تیفی‌موریوم* در ۳ غلظت مختلف از سوپرناتانت‌های اسیدی و خنثی ۵ سویه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*

| سویه | ۱۵٪ | ۱۰٪ | ۵٪ |
|---|---|---|---|
| **Y2b4** | | | |
| اسیدی | ۰/۰۲۶ | ۰/۰۱۹ | ۰/۱۱۳ |
| خنثی | ۰/۴۴۳ | ۰/۳۹۱ | ۰/۳۶۰ |
| **C6i4** | | | |
| اسیدی | ۰/۳۵۷ | ۰/۳۱۲ | ۰/۳۲۸ |
| خنثی | ۰/۴۰۳ | ۰/۳۵۱ | ۰/۳۴۷ |
| **T14** | | | |
| اسیدی | ۰/۰۳۴ | ۰/۰۵۵ | ۰/۰۶۵ |
| خنثی | ۰/۲۸۸ | ۰/۱۶۹ | ۰/۲۶۲ |
| **TD4** | | | |
| اسیدی | ۰/۰۲۸ | ۰/۰۱۳ | ۰/۰۰۳ |
| خنثی | ۰/۲۸۷ | ۰/۳۰۹ | ۰/۲۵۱ |
| **TD10** | | | |
| اسیدی | ۰/۰۳۲ | ۰/۰۲۶ | ۰/۲۱۴ |
| خنثی | ۰/۴۱۰ | ۰/۴۸۱ | ۰/۳۸۶ |
| **کنترل** | ۰/۴۷۱ | ۰/۵۰۷ | ۰/۴۴۱ |

تاثیر توام سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه عصاره گیاه بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* بیشتر از تاثیر هر کدام از عصاره‌ها و سوپرناتانت به‌تنهایی بر *سالمونلا تیفی‌موریوم* بود و عصاره اتانولی شوید و مرزه بر سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اثر هم‌افزایی داشتند. افزایش درصد عصاره *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث افزایش اثر هم‌افزایی تا محدوده غلظت ۵۰٪ شد و با افزایش بیشتر تاثیری بر اثر سینرژیستی مشاهده نشد.

**جدول ۲)** تعداد کلونی‌های رشدکرده از *سالمونلا تیفی‌موریوم* در کشت مدفوعی موش‌های تیمارشده در گروه‌های مختلف در زمان‌های مختلف پس از ایجاد عفونت و دریافت تیمار بر حسب CFU/g

| گروه | ۲۴ساعت | ۴۸ساعت | ۷۲ساعت | ۹۶ساعت | ۱۲۰ساعت | ۱۴۴ساعت | ۱۶۸ساعت |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **II** | $(۸/۵\pm۱)\times۱۰^{۷}$ | $(۸/۲\pm۱)\times۱۰^{۷}$ | $(۶/۵\pm۰/۸)\times۱۰^{۷}$ | $(۴/۵\pm۰/۵)\times۱۰^{۷}$ | $(۴/۳\pm۰/۵)\times۱۰^{۷}$ | $(۴\pm۰/۸)\times۱۰^{۷}$ | $(۳/۸\pm۰/۷)\times۱۰^{۷}$ |
| **III** | $(۱/۹۶\pm۰/۵)\times۱۰^{۶}$ | $(۱/۰۵\pm۰/۹)\times۱۰^{۵}$ | $(۹\pm۱/۲)\times۱۰^{۴}$ | $(۸/۲\pm۱/۳)\times۱۰^{۴}$ | $(۴\pm۰/۷)\times۱۰^{۴}$ | $(۳\pm۰/۷)\times۱۰^{۳}$ | $(۲\pm۰/۹)\times۱۰^{۲}$ |
| **IV** | $(۴/۶\pm۰/۸)\times۱۰^{۷}$ | $(۲/۲\pm۰/۷)\times۱۰^{۷}$ | $(۵/۳\pm۱)\times۱۰^{۶}$ | $(۱/۸۶\pm۱/۳)\times۱۰^{۶}$ | $(۱/۲\pm۱/۱)\times۱۰^{۶}$ | $(۹\pm۰/۹)\times۱۰^{۵}$ | $(۳\pm۲/۲)\times۱۰^{۴}$ |
| **V** | $(۴/۲\pm۱/۲)\times۱۰^{۷}$ | $(۱/۹\pm۰/۹)\times۱۰^{۷}$ | $(۶/۵\pm۰/۸)\times۱۰^{۶}$ | $(۱/۵\pm۰/۷)\times۱۰^{۶}$ | $(۹\pm۰/۷)\times۱۰^{۵}$ | $(۶\pm۰/۹)\times۱۰^{۵}$ | $(۵\pm۰/۵)\times۱۰^{۵}$ |
| **VI** | $(۲\pm۰/۷)\times۱۰^{۵}$ | $(۹\pm۰/۷)\times۱۰^{۴}$ | $(۴\pm۱)\times۱۰^{۴}$ | $(۲\pm۱/۱)\times۱۰^{۴}$ | $(۱\pm۰/۹)\times۱۰^{۴}$ | $(۱\pm۰/۴)\times۱۰^{۳}$ | $(۹\pm۰/۴)\times۱۰^{۲}$ |
| **VII** | $(۱/۸\pm۰/۵)\times۱۰^{۷}$ | $(۱/۰۵\pm۰/۵)\times۱۰^{۷}$ | $(۵/۳\pm۱)\times۱۰^{۶}$ | $(۱/۲\pm۱/۱)\times۱۰^{۶}$ | $(۹/۵\pm۱/۲)\times۱۰^{۵}$ | $(۶/۵\pm۰/۷)\times۱۰^{۵}$ | $(۴/۵\pm۲)\times۱۰^{۴}$ |

نتایج حاصل از مدل حیوانی با نتایج شرایط آزمایشگاه همخوانی داشت. موش‌هایی که با عصاره اتانولی مرزه به‌تنهایی و توام با سوپرناتانت خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تیمار شده بودند نسبت به موش‌هایی که با عصاره اتانولی شوید به‌تنهایی و توام با عصاره خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تیمار شده بودند و گروه کنترل، کاهش معنی‌داری در میزان دفع و کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی‌موریوم* داشتند (جدول ۲).

## بحث

پروبیوتیک‌ها میکروب‌های زنده‌ای هستند که در درمان و پیشگیری برخی از بیماری‌های عفونی مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگر امکان استقرار اُرگانیسم مفید و بی‌ضرر در دستگاه گوارش وجود داشته باشد، می‌توان به این طریق از کلونیزاسیون عفونت‌های میکروبی مختلف جلوگیری نمود [۳۴، ۳۵]. اغلب مطالعات نشان می‌دهند که لاکتوباسیلوس‌ها در پیشگیری و درمان اختلال‌های دستگاه گوارش نقش مثبت داشته و قدرت اتصال به سلول‌های اپیتلیال دستگاه گوارش انسان و حیوان را دارند [۳۶]. لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا (بالای ۳۰٪) روی *اشریشیا کلی* TG1، *سالمونلا تیفی‌موریوم* E10، *اشریشیا کلی* ATCC 1775 و *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC 14028 بیشترین میزان مهار را دارد [۱۵]. *هی‌من* و همکاران نشان می‌دهند که در آلودگی موش‌ها با سویه *اشریشیا کلیِ* انتروتوکسوژنیک و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* موجب افزایش بقای موش‌ها می‌شود. همچنین استفاده پروبیوتیک مخلوط در غذاهای تخمیری، اثر حفاظتی بر موش‌های آلوده به *اشریشیا کلی* دارد و همزمان مدت عفونت نیز در موش‌ها کاهش می‌یابد [۳۷]. نتایج مطالعه دیگری که در آن موش‌ها از طریق دهان با *سالمونلا تیفی‌موریوم* آلوده شده‌اند، نشان می‌دهد که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* سویه $LA_1$ با داشتن یک عامل ضدباکتریایی به فاکتور حاضر در کشت سوپرناتانت باکتری‌های پروبیوتیک متصل می‌شوند. برخی از نتایج این مطالعه با تحقیق حاضر همخوانی دارد [۳۸]. *اوگان‌بانوو* و همکاران فعالیت ضدمیکروبی *لاکتوباسیلوس برویس* و تولید باکتریوسین *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را مورد بررسی قرار داده و با استفاده از روش *چاهک* نشان می‌دهند که این ۲ لاکتوباسیلوس از رشد *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* و *یرسینیا انتروکولیتیکا* جلوگیری می‌کنند [۳۹]. *کُون‌کُونی‌یر* و همکاران گزارش می‌کنند که مصرف محلول رویی کشت *لاکتوباسیلوس فرمنتوم*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اثر ضدباکتریایی روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی پاتوژن ایجاد می‌کنند [۲۳]. میزان کلی‌فرم‌ها در مدفوع موش‌هایی که از ماست حاوی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* استفاده می‌کنند کمتر است [۴۰].

*پل* و همکاران از اسانس‌های گیاهی به همراه نایسین و استرهای دی‌گلیسرید اسیدهای چرب برای مهار باکتری *لیستریا منوسیتوژن* استفاده نموده و بیان می‌کنند که می‌توان از نایسین و دی‌گلیسرول منولورات برای بالابردن اثر ضدلیستریایی ترکیبات گیاهی (کارواکرول، تیمول و اوژنول) استفاده نمود که در این حالت از مقدار (دوز) کمتری از اسانس گیاهی در ماده غذایی استفاده و در نتیجه از اثرات نامطلوب اسانس گیاهی روی طعم و مزه غذا جلوگیری شده است [۴۱]. نتایج بررسی *چی‌ژانگ* و همکاران مانند نتایج *پل* و همکاران نشان می‌دهد که استفاده توام از نایسین و کارواکرول به صورت سینرژیسم باعث کاهش تعداد باکتری‌های زنده *لیستریا منوسیتوژن* و *باسیلوس سرئوس* می‌شود [۳۱].

*میثاقی* و همکاران نشان می‌دهند که اسانس آویشن شیرازی و نایسین هر کدام به‌تنهایی روی *باسیلوس سرئوس* موثر هستند ولی استفاده آنها توام، روی مهار باکتری حالت سینرژیسم داشته و با کاهش درجه حرارت از ۳۰ به ۱۰ درجه سلسیوس، اثرات ضدمیکروبی هر کدام به‌تنهایی یا توام افزایش می‌یابد [۲۲]. *خنافری* و همکاران با بررسی اثر ضدمیکروبی رسوبات پروتئینی استخراج‌شده از باکتری‌های *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس روتری*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* به این نتیجه رسیده‌اند که قطر هاله عدم رشد حاصل از این ترکیبات روی باکتری *باسیلوس سرئوس*، طی ۲۴ ساعت گرماگذاری، به ترتیب ۱۰، ۱۰ و ۱۱میلی‌متر است. در نتایج به‌دست آمده از تحقیق *محبوبی* و همکاران در رابطه با تاثیر ضدمیکروبی رسوبات پروتئینی استخراج شده از باکتری *انتروکوکوس فکالیس* بر باکتری *باسیلوس سرئوس*، ۱۴میلی‌متر گزارش شده است [۴۲].

*لیفتریس* گزارش می‌کند که *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* مواد باکتریایی غیرباکتریوسین (ناشناخته و متفاوت با اسیدلاکتیک) تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی به گستردگی، مانع از رشد پاتوژن‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنس*، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، *شیگلا دیسانتره*، *کلبسیلا پنومونیا*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *آنتروباکتریاسه* می‌شود [۴۳].

مصرف سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک در صورت ممانعت از رشد سویه‌های باکتریایی، می‌تواند در ارتقای سطح سلامت میزبان بسیار مفید باشد. ضمناً اگر به همراه سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک، عصاره‌های الکلی مرزه و شوید استفاده شود، تاثیرات سینرژیستی بین آنها موجب کاهش کلونیزاسیون باکتری می‌شود. نتایج حاصل از این آزمایش بسیار جالب توجه بود. این تحقیق مانند سایر تحقیقات صورت گرفته در این زمینه این نظر را قوت می‌دهد که به جای آنتی‌بیوتیک‌ها بهتر است از پروبیوتیک‌ها به همراه مکمل‌های درمانی از جمله عصاره گیاهان برای درمان عفونت‌های سالمونلایی



Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

استفاده شود. همچنین عصاره گیاهان و سوپرناتانت پروبیوتیک به‌تنهایی اثر ضدباکتریایی در سویه *سالمونلا تیفی‌موریوم* ATCC۱۴۰۲۸ داشت ولی نسبت به مدل استفاده توام اختلاف چشم‌گیری نشان داد و بهترین نسبت مخلوط بین عصاره پروبیوتیک و عصاره گیاهان مورد آزمایش،۵۰:۵۰ بود. اثر هم‌افزایی عصاره خنثی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به همراه عصاره اتانولی مرزه به عنوان کاندیدای احتمالی در ساخت داروهای ترکیبی علیه *سالمونلا تیفی‌موریوم* معرفی می‌شود.

## نتیجه‌گیری

ترکیب توام سوپرناتانت خنثی پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و عصاره اتانولی گیاه مرزه باعث کاهش میزان کلونیزاسیون *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌شود.

**تشکر و قدردانی:** مقاله حاضر بخشی از نتایج پایان‌نامه کارشناسی ارشد است و نویسندگان بر خود لازم می‌دانند تا از همکاران مرکز تحقیقات زیست‌شناسی زنجان تشکر و قدردانی نمایند.

## منابع

1- Talan D, Moran GJ. Etiology of bloody diarrhea among patients presenting to United States emergency departments: Prevalence of Escherchia coli O 157: H7 and other enteropathogens. Clin Infect Dis. 2001;32(4):573.
2- Ray SM, Ahuga SD. Population, based, surveillance for yersinia entrocolitica infections in food net-sites, 1996-1999: Higher risk of disease in infants and minority populations. Clin Infect Dis. 2004;38(l3):5181.
3- Cetinkaya F, Cibik R, Soyutemiz GE, Ozakin C, Kayali R, Levent B. Shigella and Salmonella contamination in various foodstuffs in Turkey. Food Control. 2007;19(11):1059-63.
4- Weiss SH, Blaser MJ. Occurrence and distribution of serotypes of the Arizona subgroup of Salmonella strain in the United States from 1967 to 1976. J Clin Microbiol. 1986;23(6):1056-64.
5- Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics approaching a definition. Am J Clin Nutr. 2001;73(2):361-4.
6- Oyetayo VO, Oyetayo FL. Review potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. Afr J Biotechnol. 2005;4(2):123-7.
7- Kandler O. Bergey's manual of systematic bacteriology. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins; 1989.
8- Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. Nutr Res Rev. 2004;17(2):277-84.
9- Perdigon G, Alvarez S, Rachid M, Aguero G, Gobbato N. Immune system stimulation by probiotics. J Dairy Sci. 1995;78(7):1597-606.
10- Parves S, Malik KA, Kang A, Kim HY. Probiotic and fermented food products are beneficial for health. J Appl Microbiol. 2006;100(6):1171-85.
11- Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence from studies conducted in humans. Curr Pharm Des. 2009;15(11);1428-518.
12- Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela, R, Poussa T. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Allergy Clin Immunol. 2007;119(1):192-8.
13- Raymond R. Adipic acid: Handbook of pharmaceutical. Excipients. 2009;1:11-2.
14- Ertesvag H, Valla S. Biosynthesis and applications of alginates. Polym Degrod Stabil. 1998;59:85-91.
15- Oyetayo VO, Oyetayo, FL. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. African J Biotech. 2005;4(2):123-7.
16- Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. Int Dairy J. 1998;8:487-90.
17- Fooks LJ, Gibson GR. Probiotics as modulators of the gut flora. Br J Nutr. 2002;88(1):39-49.
18- Schuenzel KM, Harrison MA. Microbial antagonists of food borne pathogens on fresh, minimally processed vegetables. J Food Protect. 2002;65(12):1909-15.
19- Sefidkon F, Jamzad Z, Barazandeh M. Essential oil of Satureja bachtiarica Bunge: A potential source of carvacrol. Iran J Med Aromat Plant. 2005;20(4):425-39. [Persian]
20- Abbasi KH, Sefidkon F, Yamini Y. Comparison of oil content and composition of two Satureja species (Satureja hortensis L. and Satureja rechingeri Jamzad) by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. Iran J Med Aromat Plant. 2005;21(3):307-18. [Persian]
21- Singh G, Maurya S, Catalan C. Chemical constituent's antimicrobial investigations and antioxidant potentials of Anethum graveolens essential oil and acetone extract. J Food Sci. 2005;70(4):208-15.
22- Misaghi A, Basti AA. Effect of Zataria multiflora boiss: Essential oil and nisin on Bacillus cereus ATCC 11778. Food Control. 2007;1(9):1043-9.
23- Ogunbanwo ST, Sanni AI, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum Fl and Lactobacillus brevis OGI. Afr J Biotechnol. 2003;2(8):219-27.
24- Mahboubi M, Haghi G. Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil. J Ethnopharmacol. 2008;119(2):325-7.
25- Delaquis PJ, Stanich B, Mazza A, Girard G. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. Int J Food Microbiol. 2002;74(1-2):101-9.
26- Bahramikia S, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging activities of different fractions of Anethum graveolens leaves using in vitro models. Pharmacol Online. 2008;2:233-19.
27- Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human Lactobacillus acidophilus strain LB. Appl Environ Microbiol. 1998;64(11):4537-80.
28- Young-Hyo C, Jong-Keun K, Hong-Joong K, Won-Yong K, Young-Bae K, Yong-Ha P. Selection of a potential probiotic Lactobacillus strain and subsequent in vivo studies. Antonie van Leeuwenhoek. 2001;80:193-9.
29- Ziemer CJ, Gibson GR. An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: Perspectives and future strategies. J Dairy Sci. 1998;8(5-6):473-9.
30- Hagiwara M, Kataoka K, Arimochi H, Kuwahara T, Nakayama H, Ohnishi Y. Inhibitory effect of fluvastatin on ileal ulcer formation in rats induced by nonsteroidal anti-inflammatory drug. World J Gastroenterol.



Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019

they affect intestinal pathophysiology. Cell Mol Life Sci. 2002;59:1151-65.

38- Lefteris M, Luc DV. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by Bifidobacteria is caused by the production of organic acid. Int Dairy J. 2004;16(9):1049-57.

39- Bodana AR, Rao DR. Antimutagenic activity of milk fermented by Strptococcus thermophilus and Lactobacillus. J Dairy Sci. 1990;73:3379-84.

40- Akalin As, Gonc S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice. J Dairy Sci. 1997;80(11):2721-5.

41- Pol IE, Krommer J, Smid EJ. Bioenergetics consequences of nisin combined with caracole towards Bacillus cereus. Innov Food Sci Emerg Technol. 2002;3(1):55-61.

42- Khanafari A, Hosseini F. Practical microbiology and biochemical principles of reactions. Tehran: Poorsina Publication; 2009. [Persian]

43- Lefteris M, Luc DV. The in vivo inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by Bifidobacteria is caused by the production of organic acid. Int Dairy J. 2006;16(9):1049-57.

2005;11(7):1040-3.

31- Chi-Zhang Y, Yam K, Chikindas MS. Effective control of Listeria monocytogenes by combination of nisin formulated and slowlyreleased into a broth system. Int J Food Microbiol. 2004;90(1):15-22.

32- Tajabady EM, Hejazi MA, Noohi A. Study on probiotic properties of Lactobacilluse isolated from traditional dairy products of Lighvan. Q J Sci Tarbiat Moallem Univ. 2008;7(3):941-52. [Persian]

33- Hatha AAM. Antimicrobial activity of some of south-Indian spices against serotypes of Escherichia coli, Salmonella, Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila. Braz J Microbiol. 2006;37(2):1-2.

34- Selander RK, Smith NH. Molecular population genetics of Salmonella. Rev Med Microbiol. 1990;1:219-28.

35- de Roos NK, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. Am J Clin Nutr. 2000;71(2):405-11.

36- Cowden JM, Lynch D. Case-control study of infections with Salmonella enteritidis phage type 4 in England. Br Med J. 1989;299:771-3.

37- Heyman M, Menard S. Probiotic microorganism: How

Downloaded from hms.gmu.ac.ir at 15:40 +0330 on Friday November 15th 2019