

بررسی خاصیت تجمع‌پذیری و ضد اتصالی سویه‌های منتخب پروبیوتیکی و نانو ذرات سلنیوم با گونه‌های بالینی و استاندارد پاتوژن‌های شاخص

صادق چراغی سرای^۱، علی حسین خانی^{۲*}، اکبر تقی زاده^۳، حمید محمدزاده^۴

چکیده

زمینه و هدف: اتصال میکروارگانسیم بیماری‌زا به سطح سلول اولین گام در ایجاد عفونت است. تحقیق حاضر در راستای معرفی ماده زیست محیطی و جایگزین آنتی‌بیوتیکی که مانع از اتصال و شروع روند بیماری شود، انجام گرفت. **روش بررسی:** مطالعه حاضر در طول ۳ دوره آزمایشی انجام گرفت. جدایه‌های بالینی باکتری اشرشیاکلی و مخمر کاندیدا آلبیکنس از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز و سویه استاندارد آن‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی ایران تهیه شد. اثرات تجمع‌پذیری تیمارهای آزمایشی با هر دو گونه اشرشیاکلی و کاندیدا آلبیکنس به روش کولادو بررسی و به صورت درصد بیان گردید. همچنین فعالیت ضد اتصالی آن‌ها با استفاده از روش میکروتیتربلیت انجام و به صورت درصد کاهش اتصال محاسبه شد. **یافته‌ها:** نتایج نشان داد که بیشترین میانگین تجمع‌پذیری با ۷۴/۶۸ درصد مربوط به تیمار "پروبیوتیک + نانوسلنیوم" با گونه استاندارد کاندیدا آلبیکنس و کمترین درصد تجمع‌پذیری با میانگین ۳۹/۳۲ درصد مربوط به تیمار "نانوسلنیوم" با گونه بالینی اشرشیاکلی بود ($P < 0/05$). ارزیابی توان ضد اتصالی نیز حاکی از آن بود که به جز تیمار "پروبیوتیک" روی گونه بالینی کاندیدا آلبیکنس، تفاوت معنی‌داری در سایر تیمارها روی هر یک از گونه‌های اشرشیاکلی و کاندیدا آلبیکنس مشاهده نشد ($P > 0/05$). همچنین بیشترین میزان حساسیت مربوط به گونه استاندارد و کمترین حساسیت متعلق به گونه بالینی عوامل بیماری‌زا بود. **نتیجه‌گیری:** تمامی ترکیبات آزمایشی در این تحقیق توانایی مناسبی برای مولفه‌های تجمع‌پذیری و ضد اتصالی با گونه‌های بیماری‌زا داشتند. با این وجود "پروبیوتیک + نانوسلنیوم" از میانگین نسبی بالا و متعادلی برای هر سه دوره آزمایشی برخوردار بود. لذا می‌توان از آن جهت پیشگیری بیماری استفاده نمود. **واژه‌های کلیدی:** نانوسلنیوم، پروبیوتیک، تجمع‌پذیری، ضد اتصالی.

۱-دانشجوی دکترای گروه آموزشی علوم دامی.

۲-دانشیار گروه آموزشی علوم دامی.

۳-استاد گروه آموزشی علوم دامی.

۴-استادیار گروه آموزشی علوم دامی.

۱ و ۳ و ۴- گروه آموزشی علوم دامی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

*نویسنده مسؤل:

علی حسین خانی؛ گروه آموزشی علوم دامی، دانشکده

کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۴۹۱۳۱۸۲۴

Email: hosseinkhani2000@yahoo.com

مقدمه

در سال‌های اخیر پدیده مقاومت دارویی به شدت تسریع یافته و با ادامه روند کنونی مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها صدمات جبران ناپذیری در حوزه تغذیه و سلامت رخ خواهد داد. سمیت مکمل‌های رایج ضد میکروبی و تداخل دارویی که به واسطه مصرف آنها ایجاد می‌شود، توجه به بررسی جایگزین‌های جدید با ترکیبات زیست محیطی را خاطر نشان می‌سازد. در این میان، سلول زنده و متابولیت‌های پروبیوتیکی می‌توانند به عنوان یکی از جایگزین‌های مطمئن مطرح شوند (۱). چرا که سابقه طولانی ضد میکروبی بسیاری از آنها نظیر گونه‌های لاکتوباسیلی *اسیدوفیلوس*، *روتیری*، *کازئی* و *پلانتروم* به کرات تأیید شده است (۱). گونه‌های لاکتوباسیلوس با داشتن خاصیت تجمع سلولی (Co-aggregation)، با میکروب‌های بیماری‌زا تجمع شده و با اعمال اثرات ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری‌های عفونت‌زا به سلول هدف در میزبان شده و در نهایت مانع از شروع بیماری و گسترش عفونت می‌شوند (۲). با توجه به اینکه فعالیت تجمع پذیری بسیار وابسته به سویه باکتری می‌باشد، سلیمانی و همکاران (۳) اثر تجمع پذیری لاکتوباسیلوس *کازئی* با باکتری‌های عفونت‌زا را بیش از سایر گونه‌های پروبیوتیکی اعلام کردند. رئید و همکاران (۴) نیز اثر مهار لاکتوباسیلوس *کازئی* و لاکتوباسیلوس *رامنوزوس* و همچنین اثر تجمع‌پذیری این باکتری‌ها با عوامل عفونت‌زای جدا شده از دستگاه ادراری را تأیید کردند. نتایج اندک مطالعات صورت گرفته در ارتباط با تجمع سلولی میان گونه‌های لاکتوباسیلی و سوش‌های عامل بیماری‌زا حاکی از آن است که پروتئین‌های موجود در سوپرناتانت گونه‌های لاکتوباسیلی در تجمع سلولی نقش دارند و اغلب پروتئین‌های سطحی می‌باشند. یکی از این پروتئین‌ها، پروتئین APF (Aggregation-)

Promoting Factor) است که اخیراً به عنوان پروتئین سطحی موثر در تجمع سلولی لاکتوباسیلوس‌ها شناسایی شده ولی مکانیسم اثر آن به خوبی تشریح نشده است (۵). از دیگر گزینه‌های عوامل ضد قارچی و ضد باکتریایی می‌توان به نانو ذرات به واسطه داشتن پایین‌ترین سطح سمیت در چرخه حیات و اکوسیستم اشاره کرد. نانو ذره سلنیوم با داشتن خاصیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی تخریب غشا و دیواره سلول میکروبی و همچنین مهار فعالیت آنزیمی و مهار سنتز DNA میکروب مهاجم (۶) نقش مهمی در تقویت سیستم ایمنی و مقابله با عوامل عفونی دارد (۷). مکانیسم کلی اثر ضد میکروبی نانو ذرات بر اساس اتصال به سطح سلول‌ها می‌باشد که باعث تغییر و آسیب ساختار سلولی و همچنین عملکردهای عامل بیماری‌زا نظیر قابلیت نفوذپذیری آن می‌شوند. همچنین با ایجاد شکاف و حفره‌ها و تأثیر بر فعالیت آنزیم‌های زنجیره تنفسی، باعث مرگ سلول می‌شوند (۸). با علم به موارد یاد شده می‌توان بیان کرد که اتصال (Adhesive) اولین گام در تهاجم عامل بیماری‌زا بوده که توسط ساز و کارهای اختصاصی و غیر اختصاصی برای هر گونه کنترل می‌شود (۹) و ماتریکس دیواره سلولی و ترکیبات تشکیل دهنده گونه بیماری‌زا نیز از عوامل مهمی هستند که در اتصال نقش دارند (۱۰). لذا با شناخت کافی از جنس و ساختار عامل بیماری‌زا می‌توان از مکمل میکروبی متناسب با آن بهره گرفت تا درصد فرایند اتصال پاتوژن را به حداقل رسانید. از اینرو در تحقیق حاضر سعی گردید در وهله اول دو مکمل پیشنهادی پروبیوتیکی و نانو ذره سلنیوم را به صورت مختلف (اشکال جداگانه، ترکیبی و غنی سازی شده) در محیط آزمایشگاه آماده کرده و سپس قابلیت تجمع پذیری و اثر ضد اتصالی آنها را با گونه‌های استاندارد و بالینی *اشرشیاکلی* به عنوان نمونه شاخصی از جنس

سازی مخمر روی محیط SDA حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای 37°C قرار گرفت. سپس سوسپانسیون سلولی با تراکم cfu/ml 10^8 از آن تهیه شد. همچنین جهت فعال سازی باکتری /شرشیاکلی، کشت‌های لیوفیلیزه در محیط آگوشت تریپتیک سوی برات (TSB) ساخت مرک آلمان، در دمای 37°C به مدت ۱۸ ساعت ۲ بار به طور متوالی کشت داده شدند. سپس با نسبت پنج به یک با گلیسرین استریل مخلوط و در لوله‌های اپندورف استریل در دمای 20°C - نگهداری شدند. از کشت مادر یک کشت ذخیره تهیه و در مراحل بعدی از کشت ذخیره استفاده گردید.

۴-تهیه گونه‌های بالینی کاندیدا آلبیکنس و

اشرشیاکلی

به منظور تهیه گونه‌های بالینی مجموعاً ۳۸۴ نمونه از ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز در یک دوره تقریباً ۱۰۰ روزه جمع‌آوری شد. مدل حیوانی استفاده شده در این مطالعه بره‌های آزمایشگاهی نژاد قول بودند. ۱۹۲ جدایه کاندیدا آلبیکنس از طریق واژن به وسیله سواپ استریل تهیه و پس از اخذ نمونه‌ها در لوله فالكون‌های حاوی ۱cc سرم فیزیولوژی به آزمایشگاه انتقال داده، بر روی محیط کشت SDA قرار گرفته و سپس ۲۴ ساعت درون انکوباتور 37°C شدند. پس از رشد از هر نمونه لام تهیه کرده و نمونه‌های کاندیدایی طبق جداول استاندارد شناسایی و دوباره کشت داده شدند (۱۱). همچنین ۱۹۲ جدایه اشرشیاکلی از طریق رکتوم حیوانات آزمایشی به وسیله سواپ استریل جمع‌آوری گردید. سواپ‌ها مستقیماً در محیط TSB قرار داده شدند و در آزمایشگاه بر روی محیط‌های مک‌کانکی آگار و سوربیتول مک‌کانکی آگار (ساخت مرک آلمان) حاوی مکمل سفکسیم و تلئوریت به منظور ردیابی اشرشیاکلی کشت داده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری گردید. در نهایت جدایه‌های بالینی اشرشیاکلی، برای بررسی اثرات تجمع

باکتریایی و همچنین با گونه‌های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس به عنوان نمونه شاخصی از جنس قارچی بررسی کرد.

روش بررسی

۱- گروه‌های آزمایشی

تحقیق حاضر یک مطالعه تجربی بود که اجرای تمامی مراحل آن به تأیید کمیته ایمنی زیستی و اخلاق پزشکی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز رسید. جزئیات تمامی گروه‌ها در جدول ۱ بیان شده است.

۲- منبع سلنیومی و گونه‌های لاکتوباسیلی

نانو ذرات سلنیوم سنتز شده در شرکت نانو مواد ایرانیان (مشهد-ایران) با اندازه ۴۵-۱۵ nm استفاده شد. در تأیید نانو ذرات سلنیوم تهیه شده از داده‌های آزمون طیف سنجی UV-Vis، تعیین الگوی پراش پرتو X (XRD)، پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و بررسی الگوی ریخت شناسی به وسیله میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) استفاده شد. سوش‌های لاکتوباسیلی به‌صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از مرکز باکتری‌های صنعتی ایران تهیه گردید. به هنگام آماده‌سازی تیمار ترکیبی گونه‌های لاکتوباسیلی از کشت تازه ۲۴ ساعته در محیط کشت MRS برات و آگار به نسبت مساوی از هر گونه با تراکم باکتری cfu/ml 10^8 استفاده گردید. چهار سوش منتخب لاکتوباسیلی عبارت بودند از: لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس روتری، لاکتوباسیلوس کازئی.

۳-تهیه گونه‌های استاندارد کاندیدا آلبیکنس و

اشرشیاکلی

نمونه استاندارد مخمر کاندیدا آلبیکنس (*ATCC10231*) و باکتری اشرشیاکلی (*ATCC 25922*) به صورت آمپول‌های لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه شد. جهت فعال

هر نمونه تهیه شد. $500 \mu\text{l}$ از نمونه تیمارهای آزمایشی و $500 \mu\text{l}$ از نمونه گونه‌های بیماری‌زا با یکدیگر مخلوط شده و به مدت ۴ ساعت در 37°C گرماگذاری شدند. پس از ۴ ساعت هر لوله اپندورف حاوی مخلوط نمونه آزمایشی و عامل بیماری‌زا سانتریفیوژ شد. مایع رویی از نظر میزان جذب نوری در طول موج 660 nm بررسی شده و میزان تجمع یافتن بر اساس فرمول زیر محاسبه شد. A_1 میزان جذب نوری بلافاصله پس از مخلوط کردن نمونه‌های آزمایشی و گونه‌های بیماری‌زا است و A_2 میزان جذب نوری پس از ۴ ساعت است (۱۴).

$$100 \times [(A_1) - (A_2)] / [(A_1)] = \text{درصد تجمع یافتن}$$

۷- بررسی اثر ضد اتصالی نمونه‌های آزمایشی

روی گونه‌های بیماری‌زا

برای انجام این آزمون از میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. ابتدا $75 \mu\text{l}$ از سوپرناتانت نمونه‌های آزمایشی و سپس $75 \mu\text{l}$ از سوسپانسیون گونه‌های بیماری‌زا به چاهک‌ها اضافه شد. میکروتیتر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در 37°C گرماگذاری گردید. در چاهک‌های شاهد تنها گونه‌های بیماری‌زا و محیط کشت استریل ریخته شد. سپس محتویات چاهک‌ها خارج و هر چاهک با بافر فسفات شستشو داده شد. برای تثبیت سلول‌ها از اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه و به منظور رنگ‌آمیزی از کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه استفاده گردید. سپس میکروتیتر پلیت با آب شسته شده و پس از خشک شدن چاهک‌ها اسید استیک ۳۳ درصد به عنوان حلال به چاهک‌ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج 490 nm نانومتر برای هر چاهک اندازه‌گیری شد. آزمایش برای هر کدام از نمونه‌های استاندارد و بالینی گونه‌های بیماری‌زا در مجاورت تیمارهای آزمایشی ۳ بار تکرار شد. در نهایت میزان کاهش اتصال از فرمول زیر محاسبه گردید. در این

پذیری و ضد اتصالی تیمارهای آزمایشی روی آنها در محیط مولر هیتتون آگار کشت داده شدند.

۵- غنی سازی لاکتوباسیل‌ها با نانو ذره سلنیوم

طبق روش پیشنهادی استبیکووا و همکاران (۱۲) گونه‌های منتخب لاکتوباسیلی به منظور تولید توده سلولی غنی شده با نانو سلنیوم استفاده شدند. بدین صورت که سطوح مختلف گونه‌های لاکتوباسیلی به عنوان مایه تلقیح به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در 100 ml محیط کشت با دو غلظت نانو سلنیوم در دستگاه انکوباتور شیکردار کشت داده شدند. محیط کشت پایه، ملاس نیشکر استریل با بریکس ۴۰ درصد بود. نانو سلنیوم در غلظت‌های $15 \mu\text{g/ml}$ و ۱۰ در زمان‌های مشخص به محیط کشت اضافه شد و میزان رشد باکتری‌های لاکتوباسیلی در محیط کشت غنی از نانو سلنیوم به وسیله اندازه‌گیری دانسیته توده گونه‌های لاکتوباسیلی توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 540 nm نانومتر تعیین گردید. در نهایت جهت تعیین نانو سلنیوم بارگذاری شده در متابولیسم گونه‌های لاکتوباسیلی از روش جذب اتمی کوره‌ای استفاده شد (۱۳).

۶- بررسی تجمع پذیری نمونه‌های آزمایشی با

گونه‌های بیماری‌زا

درصد تجمع‌پذیری نمونه‌های آزمایشی روی گونه‌های بیماری‌زا بر اساس روش کولادو (۱۴) بررسی شد. بدین منظور نمونه‌های آزمایشی در محیط MRS برات کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C و در جار بی‌هوازی گرماگذاری شدند. در سوی دیگر، کشت ۲۴ ساعته از گونه‌های بیماری‌زا بدست آمد. نمونه‌های آزمایشی و گونه‌های بیماری‌زا به مدت ۵ دقیقه با دور 10000 rpm سانتریفیوژ شده و توسط بافر فسفات شستشو داده شدند. مایع رویی خارج شد و از رسوب باقی‌مانده در انتهای لوله، سوسپانسیون باکتریایی در PBS با میزان جذب نوری ۴ درصد در طول موج 660 nm برای

"پروبیوتیک" با گونه استاندارد آن و کمترین درصد تجمع پذیری با میانگین ۳۹/۳۲ درصد مربوط به تیمار "نانوسلنیوم" با گونه بالینی آن بود ($P < 0/05$). علی رغم تاثیر مثبت تجمع پذیری دو تیمار "پروبیوتیک+نانوسلنیوم" و "پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم" روی گونه استاندارد و بالینی /شرشیاکلی تفاوت آماری معنی داری بین دو تیمار نامبرده مشاهده نشد ($P > 0/05$).

یافته‌های حاصل از بررسی تعیین اثر ضد اتصالی ترکیبات آزمایشی با گونه‌های بیماری‌زا در جداول ۴ و ۵ بیان شده است. ارزیابی توان ضد اتصالی تیمارهای آزمایشی برای *کاندیدا آلبیکنس* نشان داد که تیمار "پروبیوتیک" روی گونه بالینی آن با ۳۴/۸۷ درصد، پایین‌ترین میانگین را از این لحاظ داشت و بین میانگین‌های سه تیمار "پروبیوتیک+نانوسلنیوم"، "پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم" و "نانوسلنیوم" به ترتیب با ۵۲/۶۸ و ۴۹/۲۶ درصد روی گونه استاندارد و ۵۱/۴، ۵۰/۳۹ و ۴۷/۳۱ درصد روی گونه بالینی آن تفاوت آماری معنی داری وجود نداشت ($P > 0/05$). در ارتباط با باکتری /شرشیاکلی نیز بررسی توان ضد اتصالی ترکیبات آزمایشی حاکی از عدم تفاوت معنی دار بین نمونه‌ها برای هر دو گونه استاندارد و بالینی بود ($P > 0/05$). علی‌رغم این مسئله تیمار "پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم" با میانگین ۴۶/۲۵ درصد روی گونه استاندارد /شرشیاکلی و تیمار "نانوسلنیوم" با میانگین ۳۶/۵۰ درصد روی گونه بالینی آن به ترتیب بیشترین و کمترین مقادیر را از این لحاظ داشتند. با توجه به حدود اطمینان و سطح معنی‌داری در ارتباط با فعالیت تجمع‌پذیری و ضد اتصالی تیمارها با $P < 0/05$ می‌توان از درستی آزمون اطمینان حاصل کرد. نمونه‌ای از تجمع سلولی نمونه‌های ضد باکتریایی و ضد قارچی با نمونه‌های عفونی باکتری /شرشیاکلی و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در شکل ۱ نشان داده شده است. در شکل یاد شده سعی گردید با علامت گذاری از نمرة A تا E درصد تجمع پذیری و اتصال را به ترتیب از بیشترین به کمترین حالت روی تصویر نشان داد.

فرمول OD_a بیانگر جذب نوری چاهک شاهد و OD_b جذب نوری چاهک تیمار آزمایشی است (۱۵).

$$\text{درصد} = \frac{[(OD_a) - (OD_b)]}{(OD_a)} \times 100$$

کاهش اتصال

۸- بررسی آماری

پژوهش حاضر در قالب طرح کاملاً تصادفی صورت گرفت و داده‌های آن با استفاده از نرم‌افزار SAS (نسخه ۹/۱) آنالیز گردید. همچنین مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد انجام گرفت. مدل آماری طرح به شرح ذیل بود:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

$$Y_{ij} = \text{مقدار مشاهده تیمار } i \text{ ام در تکرار } j \text{ ام}$$

$$\mu = \text{اثر میانگین}$$

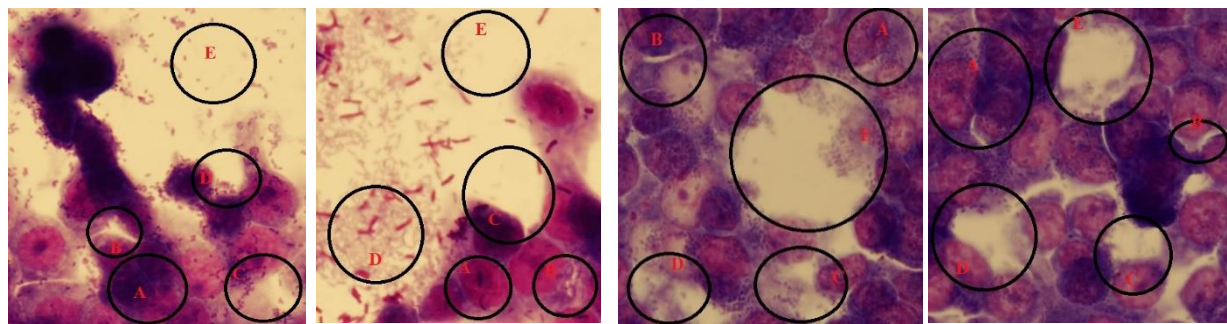
$$T_i = \text{اثر تیمار } i \text{ ام}$$

$$e_{ij} = \text{اثر خطای آزمایش مربوط به تیمار } i \text{ ام در}$$

تکرار j ام

یافته‌ها

مطالعه حاضر در طول سه ماه (سه دوره آزمایشی) انجام گرفت که در هر ماه نمونه‌گیری انجام شده و پارامترهای مورد مطالعه به‌طور ماهانه بررسی شدند. در نهایت میانگین کل برای سه دوره آزمایشی گزارش گردید. نتایج حاصل از بررسی خاصیت تجمع‌ی هر یک از تیمارهای آزمایشی با گونه‌های بیماری‌زا در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است. طبق یافته‌های حاصله می‌توان بیان کرد که برای مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین میانگین تجمع‌پذیری با ۷۴/۶۸ درصد مربوط به تیمار "پروبیوتیک+نانوسلنیوم" با گونه استاندارد آن و کمترین درصد تجمع‌پذیری با میانگین ۴۴/۱۸ درصد مربوط به تیمار "پروبیوتیک" با گونه بالینی آن بود. بین تمامی تیمارها اختلاف آماری معنی‌داری برای متغیر مورد نظر وجود داشت ($P < 0/05$). در مورد باکتری /شرشیاکلی نیز بیشترین میانگین تجمع‌پذیری با ۷۱/۵ درصد مربوط به تیمار



(الف) (ب) (ج) (د)

شکل ۱: تصویر قابلیت تجمع پذیری و اتصال نمونه‌های ضد میکروبی با باکتری اشرشیاکلی (الف و ب) و مخمر کاندیدا آلبیکنس (ج و د) با استفاده از میکروسکوپ نوری. (توضیحات: نمره A تا E به ترتیب بیشترین و کمترین تجمع ترکیبات ضد میکروبی را روی عوامل پاتوژنی نشان می‌دهند).

جدول ۱: مقدار نانو سلنیوم و تعداد پروبیوتیک‌ها در تیمارهای آزمایشی

تیمار	مقدار سلنیوم (µg/g)	تعداد پروبیوتیک (Cfu/g)
شاهد	۰	۰
پروبیوتیک	۰	۱۰ ^۸ - ۱۰ ^۹
نانو سلنیوم	۰/۳۰۸ ± ۰/۰۴۳	۰
پروبیوتیک + نانو سلنیوم	۰/۳۱۱ ± ۰/۰۰۷	۱۰ ^۸ - ۱۰ ^۹
پروبیوتیک غنی شده با نانو سلنیوم	۰/۳۰۲ ± ۰/۰۱۴	۱۰ ^۸ - ۱۰ ^۹

جدول ۲: میانگین درصد تجمع پذیری تیمارهای آزمایشی با گونه استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس (بر حسب درصد)

میانگین کل		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		
<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	<i>C.albicans</i> -Clinical	<i>C.albicans</i> -Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	شاهد
۴۴/۱۸±۲/۲۵ ^d	۴۶/۵۷±۲/۳۷ ^d	۳۹/۲۰	۴۴/۷۱	۴۴/۱۸	۴۷/۶۲	۴۹/۱۶	۴۷/۳۸	پروبیوتیک
۵۲/۳۸±۲/۹۶ ^c	۵۵/۴۳±۳/۱۸ ^c	۴۸/۵۴	۵۵/۷۹	۵۳/۴۲	۵۴/۲۷	۵۵/۱۸	۵۶/۲۳	نانو سلنیوم
۶۷/۲۵±۳/۵۳ ^a	۷۴/۶۸±۳/۸۶ ^a	۶۴/۳۲	۷۰/۶۶	۶۶/۱۷	۷۳/۸۱	۷۱/۲۶	۷۹/۵۷	پروبیوتیک + نانو سلنیوم
۶۱/۲۹±۳/۱۵ ^b	۶۶/۴۶±۳/۴۷ ^b	۵۷/۲۱	۶۷/۴۸	۵۹/۳۱	۶۸/۴۷	۶۷/۳۵	۶۳/۴۳	پروبیوتیک غنی شده با نانو سلنیوم

۱- مقایسه میانگین کل به صورت میانگین ± خطای معیار می‌باشد. حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست (P<۰/۰۵).
 ۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۳: میانگین درصد تجمع پذیری تیمارهای آزمایشی با گونه‌های استاندارد و بالینی اشرشیاکلی (بر حسب درصد)

میانگین کل		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>E.Coli</i> - Clinical	<i>E.Coli</i> - Standard	<i>E.Coli</i> - Clinical	<i>E.Coli</i> - Standard	<i>E.Coli</i> - Clinical	<i>E.Coli</i> - Standard	<i>E.Coli</i> - Clinical	<i>E.Coli</i> - Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	شاهد
۶۳/۳۱±۳/۲۶ ^a	۷۱/۵±۳/۰۸ ^a	۵۹/۰۷	۶۴/۷	۵۸/۱۹	۷۳/۴۵	۷۲/۶۶	۷۶/۳۲	پروبیوتیک
۳۹/۳۲±۲/۱۷ ^c	۴۴/۵۴±۲/۴۵ ^c	۳۸/۲۶	۴۷/۶۵	۴۱/۵۸	۴۲/۸۱	۳۸/۱۲	۴۳/۱۸	نانوسلنیوم
۵۱/۵±۲/۹ ^b	۶۲/۵۲±۳/۱۳ ^b	۵۲/۷۸	۶۰/۹۲	۴۷/۵۳	۶۵/۱۹	۵۴/۰۹	۶۱/۴۵	پروبیوتیک+ نانوسلنیوم
۵۲/۴۴±۳/۰۵ ^b	۵۹/۳۷±۲/۸۸ ^b	۵۰/۲۴	۶۲/۷۳	۴۸/۳۶	۵۸/۱	۵۸/۷۱	۵۷/۲۸	پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم

۱- مقایسه میانگین کل به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد. حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست ($P < 0/05$).

۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۴: میانگین درصد ضد اتصالی تیمارهای آزمایشی با گونه‌های استاندارد و بالینی کاندیدا آلبیکنس (بر حسب درصد)

میانگین کل		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		شاهد
<i>C.albicans</i> - Clinical	<i>C.albicans</i> - Standard	<i>C.albicans</i> - Clinical	<i>C.albicans</i> - Standard	<i>C.albicans</i> - Clinical	<i>C.albicans</i> - Standard	<i>C.albicans</i> - Clinical	<i>C.albicans</i> - Standard	
-	-	-	-	-	-	-	-	شاهد
۳۴/۸۷±۲/۲۴ ^c	۳۸/۱۷±۲/۱۱ ^c	۳۰/۸۶	۳۵/۱۱	۳۳/۸۳	۳۸/۲۲	۳۹/۹۲	۴۱/۱۸	پروبیوتیک
۴۷/۳۱±۲/۵۳ ^{ab}	۴۹/۲۶±۲/۶ ^{ab}	۴۴/۱۹	۴۸/۳۱	۴۶/۴۱	۴۸/۲۶	۵۱/۳۳	۵۱/۲۱	نانوسلنیوم
۵۱/۴±۲/۶۸ ^a	۵۴/۳۴±۲/۸۴ ^a	۴۹/۶۰	۵۲/۳۸	۵۰/۲۷	۵۳/۴۰	۵۴/۳۳	۵۷/۲۴	پروبیوتیک+ نانوسلنیوم
۵۰/۳۹±۲/۶۲ ^a	۵۲/۶۸±۲/۷۳ ^a	۴۸/۴۷	۵۱/۹۴	۵۰/۴۲	۵۳/۶۷	۵۲/۲۸	۵۲/۴۳	پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم

۱- مقایسه میانگین کل به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد. حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست ($P < 0/05$).

۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

جدول ۵: میانگین درصد ضد اتصالی تیمارهای آزمایشی با گونه‌های استاندارد و بالینی اشرشیاکلی (بر حسب درصد)

میانگین کل		آزمایش سوم		آزمایش دوم		آزمایش اول		
<i>E. Coli</i> - Clinical	<i>E. Coli</i> - Standard	<i>E. Coli</i> - Clinical	<i>E. Coli</i> - Standard	<i>E. Coli</i> - Clinical	<i>E. Coli</i> - Standard	<i>E. Coli</i> - Clinical	<i>E. Coli</i> - Standard	شاهد
-	-	-	-	-	-	-	-	پروبیوتیک
۳۸/۲۷±۲/۱۵ ^{ab}	۳۸/۵۳±۲/۲۴ ^{ab}	۳۵/۴۷	۳۷/۱۸	۳۶/۲۱	۳۶/۴۸	۴۳/۱۵	۴۱/۹۳	پروبیوتیک
۳۶/۵±۱/۹۲ ^{ab}	۳۹/۴۲±۲/۰۵ ^{ab}	۳۷/۶۱	۴۰/۵۵	۳۲/۸۷	۳۴/۵۷	۳۹/۰۲	۴۳/۱۶	نانوسلنیوم
۴۰/۵۹±۱/۹۵ ^a	۴۲/۶۷±۲/۱ ^a	۳۹/۳۵	۴۱/۷۵	۳۸/۶۰	۴۴/۷۹	۴۳/۸۲	۴۱/۴۷	پروبیوتیک+
								نانوسلنیوم
								پروبیوتیک
۴۲/۳۶±۲/۳۴ ^a	۴۶/۲۵±۲/۳۷ ^a	۴۲/۶۸	۴۸/۱	۳۹/۲۷	۴۷/۲۱	۴۵/۱۴	۴۳/۵۲	غنی شده با
								نانوسلنیوم

۱- مقایسه میانگین کل به صورت میانگین \pm خطای معیار می‌باشد. حروف غیر مشترک در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین میانگین‌هاست ($P < 0.05$).

۲- هر آزمایش با ۳ تکرار انجام شد.

بحث

همکاران (۱۸) خاصیت تجمع پذیری گونه‌های لاکتوباسیلی باکاندیدا آلیکنس را به وسیله اختصاص نمره ۱ (کمترین توان تجمع) تا ۴ (بیشترین توان تجمع) ارزیابی کردند. لاکتوباسیلوس فرمنتوم با نمره ۴، لاکتوباسیلوس پلانتروم، رامنوزوس و بروویس با نمره ۳، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با نمره ۲ و لاکتوباسیلوس دلبروکی و پاراکازی با نمره ۱ به ترتیب بیشترین و کمترین توان تجمع پذیری را داشتند. در ارتباط با خاصیت تجمع پروبیوتیک‌ها با اشرشیاکلی نیز کاس و همکاران (۱۹) قابلیت تجمع یافتن لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس با باکتری‌های عفونت‌زای اشرشیاکلی را حدود ۱۹/۴ درصد بیان کردند. همچنین آنگو و همکاران (۲۰) درصد خاصیت تجمع ۸۴ ایزوله باکتری‌های پروبیوتیکی را با اشرشیاکلی محاسبه کرده و بیشترین مقادیر را متعلق به ایزوله‌های ۴۰، ۵۲ و ۶۳ (همگی از گروه لاکتوباسیلوس کازی) به ترتیب با میانگین ۶۴/۷۱، ۷۳/۰۹ و ۶۴/۷۸ درصد

بررسی خاصیت تجمع پذیری تیمارهای آزمایشی با گونه‌های بیماری‌زا در مطالعه حاضر حاکی از آن بود که تیمار "پروبیوتیک+نانوسلنیوم" با گونه استاندارد کاندیدا آلیکنس و تیمار "نانوسلنیوم" با گونه بالینی اشرشیاکلی به ترتیب بیشترین و کمترین میانگین درصد‌های تجمع پذیری را داشتند. در مطالعات مشابه سانتوس و همکاران (۱۶) خاصیت تجمع پذیری ایزوله‌های لاکتوباسیلوس را با کاندیدا آلیکنس محاسبه کرده و میانگین آن را برای سه ایزوله لاکتوباسیلوس پلانتروم و دو ایزوله لاکتوباسیلوس فرمنتوم به ترتیب ۲۷/۴۶، ۵۹/۰۴، ۲۰/۹۸، ۴۳ و ۳۳/۸ درصد گزارش کردند. یورگنسن و همکاران (۱۷) نیز درصد تجمع پذیری پروبیوتیک لاکتوباسیلوس روتری (PTA5289) با دو گونه کاندیدا آلیکنس را ۲۱ و ۱۹ درصد گزارش کردند. آنها همچنین این مقادیر را برای سویه دیگر لاکتوباسیلوس روتری (DSM17938) ۹ و ۱۳ درصد بیان کردند. در گزارشی دیگر دوکارمو و

گزارش کردند. میانگین مقادیر خاصیت تجمعی در تحقیق حاضر به غیر از آزمایش یورگنسن و همکاران (۱۷) با بقیه مطالعات همخوانی نسبی داشت و دلیل نوسان بین میانگین‌های بیان شده را می‌توان مربوط به عواملی مثل سویه باکتری پروبیوتیکی، مقدار، نوع متابولیت‌های تولیدی، زمان گرمخانه‌گذاری، جمعیت و گونه عامل بیماری‌زا دانست (۲۱). مرور مقادیر درصد تجمع پذیری تیمارهای آزمایشی با گونه‌های بیماری‌زا در تحقیق حاضر حاکی از آن است که حساسیت باکتری *اشرشیاکلی* به ترکیبات فوق در مقایسه با مخمر *کاندیدا آلبیکنس* پایین است. دلیل این امر می‌تواند به این جهت باشد که غشای خارجی باکتری *اشرشیاکلی* به طور غالب از لیپوپلی ساکارید مستحکم تشکیل شده است که سد مقاومی در برابر عوامل تخریب‌گر محسوب می‌شود (۲۲). دنیس و همکاران (۲۳) نیز در تایید این مطلب، ترکیب اصلی پلی‌مری خارج سلولی *اشرشیاکلی* را آگزوپلی ساکاریدی به نام کولانیک اسید بیان کرده و اظهار داشتند که کولانیک اسید علاوه بر احاطه باکتری همانند یک کپسول، موجب استحکام ساختار بیوفیلمی آن نیز می‌شود؛ در حالی‌که *کاندیدا آلبیکنس* مخمر کوچکی است که غشای خارجی آن نازک بوده (۶-۴ میکرون) و به مراتب شکننده‌تر از غشای *اشرشیاکلی* می‌باشد (۱۰). از اینرو می‌توان حساسیت بیشتر *کاندیدا آلبیکنس* به ترکیبات آزمایشی را نسبت به *اشرشیاکلی* توجیه کرد.

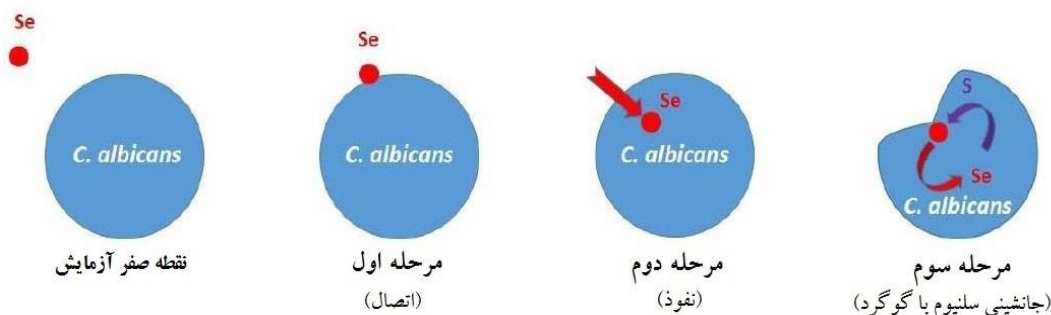
در ارتباط با آزمون ضد اتصال، کولادو و همکاران (۱۴) میزان قابلیت خود اتصال *اشرشیاکلی* را بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون برای دماهای ۲۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به ترتیب ۴۳/۶ و ۳۹/۶ درصد گزارش کردند. همچنین از بین سویه‌های پروبیوتیکی بیشترین مقدار برای دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد با ۹۱/۷ درصد مربوط به *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* و برای دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۷۶/۴ درصد مربوط به *لاکتوباسیلوس پلانٹاروم* بود. آنها اظهار داشتند

که میزان اتصال در سویه‌های پروبیوتیکی مورد بررسی با بیشتر شدن زمان گرمخانه‌گذاری، افزایش می‌یابد. اینگراسیا و همکاران (۲۴) نیز اثر ضد اتصال کشت کامل *لاکتوباسیلوس کازئی* سویه *DN-114001* را بر *اشرشیاکلی* حدود ۵۷ درصد گزارش کردند. در مطالعه‌ای دیگر عابدی و همکاران (۲۵) توانایی بالای ۸۰ درصدی *لاکتوباسیلوس دلبروکی* را در ممانعت از اتصال باکتری‌های *اشرشیاکلی* به سلول‌های *Caco-2* گزارش کردند. در رابطه با مقایسه و تأیید اثرات مکمل نانوسلنیوم استفاده شده در تحقیق حاضر با سایر مطالعات، کاپور و همکاران (۲۶) اثر ضد اتصال نانو سلنیوم را روی *کاندیدا آلبیکنس* بررسی کرده و درصد بازدارندگی آنرا ۶۸/۲۸ درصد گزارش کردند. همچنین این مقدار را برای آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین نیز ۲۷/۰۹ درصد اعلام کردند که این مقادیر در درجه اول حاکی از توان بازدارندگی بالای نانوسلنیوم در مقایسه با آمپی‌سیلین بوده و در درجه دوم کاهش حساسیت *کاندیدا آلبیکنس* به آنتی‌بیوتیک‌های متداول را نشان می‌دهد. در همین زمینه گایسبیرس و همکاران (۲۷) اظهار کردند که نانوسلنیوم به راحتی به سطح سلول *کاندیدا آلبیکنس* متصل شده و داخل پاتوزن نفوذ می‌کند. آنها در نظریه‌ای جالب دلیل آنرا تخریب ساختمان سلول به وسیله جانشینی سلنیوم با گوگرد بیان کردند و برهم‌کنش نانو ذرات سلنیوم با *کاندیدا آلبیکنس* را به صورت یک مکانیسم سه مرحله‌ای ذیل عنوان کردند: ۱- اتصال ۲- نفوذ ۳- جانشینی گوگرد و سلنیوم و متعاقب آن تخریب دیواره مخمر (شکل ۲). همچنین آنها بیان کردند که اندازه ذرات و شکل کریستالی نانوذرات سلنیوم از فاکتورهای مهم در ممانعت و مهار اتصال *کاندیدا آلبیکنس* هستند (۲۷).

علی‌رغم درصد بالای تجمع‌پذیری در تحقیق حاضر، درصد ضد اتصال تیمارهای آزمایشی زیاد نبودند. علت اصلی آن شاید مربوط به ماهیت آزمایش باشد. چرا که

بالینی حاصل از حیوان آزمایشی به واسطه تجویز مکرر آنتی‌بیوتیک‌ها در روزهای اول زندگی آنها، مقاومت دارویی بالایی در خود ایجاد کرده و با تغییر فنوتیپ و تقویت ساختار دیواره سلولی خود، توانایی خود را برای اتصال و کلونیزاسیون روی سطح سلول‌های اپی‌تلیال افزایش داده‌اند. از اینرو درصد پایین اثر ضد اتصالی تیمارهای آزمایشی روی گونه‌های بالینی قابل توجه است. با این وجود تحقیقات علمی کمی در ارتباط با خاصیت تجمع پذیری و اثر ضد اتصالی ترکیبات ضد میکروبی با گونه‌های بیماری‌زای شاخص وجود دارد. تحقیق حاضر نیز اولین پژوهشی بود که عیناً از ماده آزمایشی مورد مطالعه جهت ارزیابی توان تجمع پذیری و ضد اتصالی با باکتری *اشرشیاکلی* و مخمر *کاندیدا آلبیکنس* در آن استفاده شده بود. از اینرو جهت اطمینان از صحت نتایج بدست آمده، تفسیر علمی و شرح مکانیسم‌های ناشناخته، انجام مطالعات بعدی در این زمینه توصیه می‌گردد.

خاصیت ضد اتصالی بیشتر در مطالعات *in-vivo* قابل دفاع و تفسیر است. در شرایط *in-vivo* جوانه زدن و کلونیزه شدن فارچ نیازمند اتصال واقعی مخمر به سلول‌های مخاطی واژن است و در اتصال واقعی *کاندیدا آلبیکنس* به بافت میزبان، ژن‌هایی مانند *SAP*، *ALS*، *HWP1* (Hyphal Wall Protein 1) نقش خود را اعمال می‌کنند. ماحصل بیان آن‌ها موجب تشکیل پروتئین‌های اتصال یابنده به فیبرونکتین (*Fibronectin*) و لامینین (*Laminin*) می‌شود و به دنبال آن قدرت اتصال به سلول‌های اندوتلیال و مخاطی افزایش می‌یابد (۲۸). محاسبات صورت گرفته در تحقیق حاضر برای بررسی حساسیت بین گونه‌های استاندارد و بالینی نسبت به ترکیبات آزمایشی نشان داد که هم در باکتری *اشرشیاکلی* و هم در مخمر *کاندیدا آلبیکنس* بیشترین حساسیت مربوط به گونه استاندارد و کمترین حساسیت متعلق به گونه بالینی آن‌ها بود. این امر شاید حاکی از آن باشد که جدایه‌های



شکل ۲: توالی مکانیسم سه مرحله‌ای برهم‌کنش نانو ذرات سلنیوم با *کاندیدا آلبیکنس* (۲۷)

نتیجه گیری

و بالینی عوامل بیماری‌زا برخوردار بود. لذا به شرط تکرار آزمایش در مطالعات آتی و تایید نتایج حاصله، می‌توان از آن به عنوان گزینه زیست محیطی جدیدی جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های عفونی استفاده نمود.

قدردانی

بدین وسیله از جناب آقای دکتر حامد همیشه‌کار معاون محترم پژوهشی مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، آقای دکتر امیر محمد گوگانیان و سرکار خانم دکتر اردوخانی تشکر و قدردانی می‌شود.

در آزمایشات قبلی نویسندگان مقاله حاضر، تیمار "پروبیوتیک غنی شده با نانوسلنیوم" اثرات ضد میکروبی بالایی در آزمون‌های متعدد میکروبی از خود نشان داده بود. انتظار می‌رفت در بررسی مولفه‌های تجمع پذیری و ضد اتصالی نیز تیمار یاد شده به جهت اثرات هم‌افزایی موجود بین دو مکمل میکروبی، توان تجمع پذیری و ضد اتصالی به مراتب بالاتری از خود نشان دهد. با این وجود آزمون‌های انجام شده نشان دادند که تمامی ترکیبات آزمایشی در این تحقیق توانایی مناسبی برای فاکتورهای تجمع پذیری و ضد اتصالی با گونه‌های بیماری‌زا داشتند و تیمار تلفیقی "پروبیوتیک+نانوسلنیوم" از میانگین نسبی بالا و متعادلی برای هر سه دوره آزمایشی با گونه‌های استاندارد

منابع

- 1-Cheraghi Saray S, Hosseinkhani A, Janmohammadi H, Zare P, Daghighkia H. Thermal and probiotic treatment effects on restaurant waste for incorporation into poultry diet. *Int J Recycl Org Waste Agricult*. 2014; 3: 1-7.
- 2-Chung YC, Su YP, Chen CC, Jia G, Wang HI, Wu JG, Lin JG. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall. *Acta Pharmacol Sin*. 2004; 25: 932-6.
- 3-Soleimani NA, Kermanshahi RK, Yakhchali B, Sattari TN. Antagonistic activity of probiotic lactobacilli against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Afr J Microbiol Res*. 2010; 4: 2169-73.
- 4-Reid G, McGroarty JA, Angotti R, Cook RL. Lactobacillus inhibitor production against *Escherichia coli* and co aggregation ability with uropathogens. *Can J Microbiol*. 1988; 34: 344-51.
- 5-Goh YJ, Klaenhammer TR. Functional roles of aggregation-promoting-like factor in stress tolerance and adherence of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol*. 2010; 76: 5005-12.
- 6-Huh AJ, Kwon YJ. "Nanoantibiotics": a new paradigm for treating infectious diseases using nanomaterials in the antibiotics resistant era. *J Controlled Release*. 2011; 2: 128-45.
- 7-Kamada H, Nonaka I, Ueda Y, Murai M. Selenium addition to colostrum increase immunoglobulin G absorption by newborn calves. *J Dairy Sci*. 2007; 90: 5665-70.
- 8-Zawrah MF, Abd El-moez SI. Antimicrobial activities of gold nanoparticles against major foodborne pathogens. *Life Sci J*. 2011; 8: 37-44.
- 9-Shokohi T, Hashemi Soteh MB, Saltanat Pouri Z, Hedayati MT, Mayahi S. Identification of *Candida* species using PCR-RFLP in cancer patients in Iran. *Indian J Med microbial*. 2010; 28: 147-51.
- 10-Masuoka J. Surface glycans of *Candida albicans* and other pathogenic fungi: physiological roles, clinical uses, and experimental challenges. *Clin Micro Rev*. 2004; 17: 281-310.
- 11-Otang WM, Grierson DS, Ndip RN. Antifungal activity of *Arctotis arctotoides* (L.f.) O. Hoffm and *Gasteria bicolor* Haw against opportunistic fungi associated with human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *Pharmacogn Mag*. 2012; 8: 135-40.
- 12-Stabnikova O, Ivanov V, Larionova I, Lewis J. Ukrainian dietary bakery product with selenium-enriched yeast. *LWT-Food Sci Technol*. 2008; 41: 890-5.
- 13-Hongfei Y, Gongjian F, Zhenxin G. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). *LWT-Food Sci Technol*. 2010; 43: 666-9.

- 14-Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *Eur Food Res Technol.* 2008; 226: 1065-73.
- 15-Spinler JK, Taweechotipatr M, Rognerud CL, Ou CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human- derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe.* 2008; 14: 166-71.
- 16-Santos CMA, Pires MCV, Leao TL, Hernandez ZP, Rodriguez ML, Martins AKS, Miranda LS, Martins FS, Nicoli JR. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics for vaginitis treatment. *Microbiol.* 2016; 162: 1195-207.
- 17-Jorgensena MR, Kragelunda C, Jensenb PO, Kellera MK, Twetman S. Probiotic *Lactobacillus reuteri* has antifungal effects on oral *Candida* species in vitro. *J Oral Microbiol.* 2017; 9: 1274582.
- 18-Do-Carmo MS, Noronha FMF, Arruda MO, Costa EPS, Bomfim MRQ, Monteiro AS, Ferro TAF, Fernandes ES, Giron JA, Monteiro-Neto V. *Lactobacillus fermentum* ATCC 23271 displays in vitro inhibitory activities against *Candida spp.* *Front Microbiol.* 2016; 7:1722.
- 19-Kos B, Susković J, Vuković S, Simpraga M, Frece J, Matosic S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *J Appl Microbiol.* 2003; 94: 981-7.
- 20-Angmo K, Savitri AK, Bhalla TC. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. *LWT Food Sci Technol.* 2016; 66: 428-35.
- 21-Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, Han X, Li J, Zhang L, Yang L. Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol Res.* 2011; 167: 27– 31.
- 22-Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux. *Sci.* 1994; 264: 382–8.
- 23-Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* 2000; 182: 3593–6.
- 24-Ingrassia I, Leplingard A, Darfeuille-Michaud A. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the ability of adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients to adhere to and to invade intestinal epithelial cells. *Appl Environ Microbiol.* 2005; 71: 2880-7.
- 25-Abedi D, Feizizadeh S, Akbari V, Jafarian-Dehkordi A. In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of *Lactobacillus delbrueckii subsp bulgaricus* on *Escherichia coli*. *Res Pharm Sci.* 2013; 8: 260-8.
- 26-Kaur R, Kaudal T, Sharma A. Probiotic mediated synthesis of selenium particles: characterization and biofilm scavenging analysis. *Res J Life Sci Bioinf Pharm Chem Sci.* 2018; 4: 291-304.
- 27-Guisbiers G, Lara HH, Mendoza-Cruz R, Naranjo G, Vincent BA, Peralta XG, Nash KL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm by pure selenium nanoparticles synthesized by pulsed laser ablation in liquids. *Nanomed Nanotechnol.* 2017; 13: 1095-103.
- 28-Dwivedi P, Thompson A, Xie Z, Kashleva H, Ganguly S, Mitchell AP, Dongari-Bagtzoglou A. Role of Bcr1-activated genes Hwp1 and Hyr1 in *Candida albicans* oral mucosal biofilms and neutrophil evasion. *PLoS One.* 2011; 6: e16218.

Evaluation of Co-aggregation and Anti-Adhesive Effects of Selenium Nanoparticles and Selected Probiotic Strains on Clinical and Standard Strains of Index Pathogens

Sadegh Cheraghi Saray¹, Ali Hosseinkhani^{2*}, Akbar Taghizadeh³, Hamid Mohammadzadeh⁴

1-PhD Student of Animal Science.

2-Associate Professor of Animal Science.

3-Professor of Animal Science.

4-Assistant Professor of Animal Science.

1,2,3,4-Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author:

Ali Hosseinkhani; Department of Animal Science, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Tel: +989149131824

Email: hosseinkhani2000@yahoo.com

Abstract

Background and Objectives: One of the most important factors in pathogenic disease is the attachment of pathogenic bacteria to the host cell surface. The present study was conducted to introduce an alternative bio-drug that prevents the attachment of microorganisms and the onset of disease.

Subjects and Methods: This study was carried out during the three experimental periods. Clinical and standard strains of *E. coli* and *C. albicans* yeast were collected from the Khalat-Pushan Research Station of Tabriz University and Iran Research Organization respectively. Co-aggregation activity of treatments with both *E. coli* and *C. albicans* were investigated by Collado method and expressed as percentage. Anti-adhesive activity was also determined by microtitre plate method and calculated by reduction in attachments percentage.

Results: The highest co-aggregation effect with 74.68 % was related to “probiotic+ nano-selenium” treatment with standard strain of *C. albicans* and “nano-selenium”. While treatment with 39.32% had the lowest co-aggregation activity with clinical strain of *E. coli* (P<0.05). In determination of anti-adhesive activity of experimental treatments, except for the “probiotic” treatment on clinical strain of *C. albicans*, there was no significant difference among treatments for both species of *E. coli* and *C. albicans*. In both strains of *E. coli* and *C. albicans*, the standard strains showed significantly higher sensitivity.

Conclusion: All the experimental treatments had a good co-aggregation and anti-adhesive ability with pathogenic species. “Probiotic + nano-selenium” treatment had relatively high ability during three experimental protocols Therefore, it can be used as an appropriate antibiotic alternative for the prevention or control of disease.

Keywords: Nano-Selenium, Probiotics, Co-Aggregation, Anti-Adhesive.

►Please cite this paper as:

Cheraghi Saray S, Hosseinkhani A, Taghizadeh A, Mohammadzadeh H. Evaluation of Co-aggregation and Anti-Adhesive Effects of Selenium Nanoparticles and Selected Probiotic Strains on Clinical and Standard Strains of Index Pathogens. *Jundishapur Sci Med J* 2019; 17(6):583-595.

Received: Dec 14, 2018

Revised: Feb 6, 2019

Accepted: Feb 10, 2019