

بررسی فعالیت ضد میکروبی متابولیت‌های سویه‌های پروبیوتیکی

Lactobacillus بر سویه‌هایی از *Proteus*

لیلا گودرزی^۱، دکتر روحا کسری کرمانشاهی^۲

۱. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

۲. استاد میکروب شناسی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

چکیده

سابقه و هدف: باکتری‌های اسید لاکتیک، گروهی از باکتری‌های گرم مثبت، بدون اسپور، کروی یا میله‌ای شکل و کاتالاز منفی هستند که عموماً به عنوان ارگانیزم‌های ایمن در نظر گرفته می‌شوند. گونه‌های *Proteus* نیز از اعضای خانواده‌ی انتروباکتریاسه، باکتری‌های گرم منفی و متحرکی هستند که به عنوان عوامل بیماری‌زای مهم مجاری ادراری و ایجادکننده‌ی عفونت متعاقب کاتتر ادراری مطرح می‌باشند. این مطالعه، با هدف تعیین اثر ضد میکروبی مایع رویی از کشت سویه‌های مختلف *Lactobacillus* از خانواده‌ی پروبیوتیک‌ها علیه سویه‌های مختلف *Proteus*، با انجام روش‌های گوناگون و مقایسه‌ی این روش‌ها به منظور تعیین بهترین خاصیت ضد میکروبی، انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: کلیه‌ی سویه‌های میکروبی مورد استفاده، از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و نیز انستیتو پاستور ایران، به صورت لیوفلیزه تهیه شد. روش‌های مورد استفاده برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی *Lactobacillus acidophilus*، *Lactobacillus plantarum*، *Lactobacillus fermentum*، *Lactobacillus rhamnosus* و *Lactobacillus casei* در مقابل یکدیگر و نیز علیه سویه‌های پاتوژن، شامل تست نقطه‌گذاری (Agar spot)، روش چاهک پلیت (Well diffusion agar) و متد MODA بود.

یافته‌ها: نتایج نشان داد سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی با هر سه روش مورد بررسی، توانستند باعث مهار رشد سویه‌های بیماری‌زای *Proteus* شوند.

نتیجه‌گیری: با توجه به سهولت کار، صرفه‌ی اقتصادی و حساسیت بیشتر در روش کمی MODA، استفاده از این روش نسبت به سایر روش‌ها، پیشنهاد می‌گردد.

واژگان کلیدی: *Proteus*، سویه‌های *Lactobacillus*، بررسی فعالیت ضد میکروبی

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Goudarzi L, Kasra-Kermanshahi R. Survey of some metabolites of *Lactobacillus* strains as probiotic on antimicrobial activity against some *Proteus* strains with different methods. Pejouhandeh 2014;19(3):152-160.

مقدمه

سلول‌های میکروبی یا اجزایی از سلول‌های میکروبی که اثر مفیدی روی سلامت و آسایش انسان دارند^(۱)، تعریف کردند. در این تعریف، پروبیوتیک‌ها محدود به میکروب‌های زنده نبوده و اشکال غیر زنده‌ی آنها نیز روی سلامت انسان، تأثیر می‌گذارند^(۲).

سویه‌های باکتری‌های اسید لاکتیک که از باکتری‌های گرم مثبت، با اشکال کوکسی و یا رشته‌ای و نیز مقاوم به اسید می‌باشند، به عنوان میکروارگانیزم‌های معمول به کار رفته به عنوان پروبیوتیک محسوب می‌شوند^(۳). باکتری‌های اسید لاکتیک، به خصوص جنس‌های غیر بیماری‌زا و مفید آنها نظیر *Streptococcus*، *Leuconostoc*، *Lactobacillus*

پروبیوتیک (Probiotic) واژه‌ای یونانی و به معنای "برای زندگی" است که نخستین بار توسط Lilly و Stillwell در سال ۱۹۶۵ به منظور توضیح مواد ترشحی توسط یک میکروارگانیزم که رشد یک میکروارگانیزم دیگر را تحریک می‌کند، استفاده شد^(۱). در سال ۲۰۰۲، Ouwehand و همکارانش پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان "فرآورده‌هایی از

^۱نویسنده مسؤول مکاتبات: لیلا گودرزی؛ گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران؛ پست الکترونیکی: Leila.goudarzi@yahoo.com

شده با لایه‌ی دیگری از آگار است که شامل ارگانیسیم حساس می‌باشد. در این روش که به آگار اسپات معروف است، ارگانیسیم مورد آزمایش در فرم نقطه‌ای در پلیت آگار گذاشته شده و بعد از نگهداری کلنی‌های نهایی، با لایه‌ای از آگار که شامل ارگانیسیم حساس است، پوشیده می‌شود (۹). روش دیگر، انتشار از طریق چاهک (well diffusion) است که در سطح پلیت، ارگانیسیم حساس کشت داده می‌شود و در چاهک‌های ایجاد شده بر سطح محیط، از محلول رویی محیط کشت ارگانیسیم مورد آزمایش، پوشیده می‌شود. در هر دو روش انجام شده بر سطح محیط جامد، بعد از مرحله‌ی نگهداری اطراف حفره و یا نقطه، ناحیه‌ی بازدارنده، قابل رویت است. بنابراین، این بازدارندگی، مواد ضد میکروبی روی ارگانیسیم حساس را نشان می‌دهد (۱۰).

از روش‌های دیگر که روی محیط کشت مایع انجام می‌پذیرد و بر اساس کدورت محیط، وقتی رشد در حضور غلظت‌های متفاوت مواد ضد میکروبی صورت می‌گیرد، می‌توان به روش پیشنهاد شده توسط Lash و همکارانش با عنوان MODA اشاره نمود. این روش، بر پایه‌ی اختلاف جذب مشاهده شده بین نمونه‌ی کنترل و نمونه‌ی آزمون، به عنوان فعالیت ضد میکروبی بوده و به صورت کمی و با درصد، فعالیت ضد میکروبی را مقایسه می‌نماید (۱۱).

بنابر آنچه گفته شد، پژوهش حاضر با هدف تعیین اثر ضد میکروبی مایع رویی از کشت سویه‌های مختلف *Lactobacillus* از خانواده‌ی پروبیوتیک‌ها علیه سویه‌های مختلف *Proteus* با به‌کارگیری روش‌های مختلف و مقایسه‌ی این روش‌ها در تعیین بهترین خاصیت ضد میکروبی بوده است.

مواد و روش‌ها

کلیه‌ی سویه‌های میکروبی مورد استفاده، از مرکز کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌های سازمان پژوهش علمی و صنعتی ایران و نیز انستیتو پاستور ایران، به صورت لیوفیلیزه تهیه شد که شامل ۵ سویه‌ی *Lactobacillus* و چهار سویه‌ی *Proteus* استاندارد با مشخصات زیر بودند:

- *Lactobacillus acidophilus* ATCC ۴۳۵۶
- *Lactobacillus plantarum* ATCC ۸۰۱۴
- *Lactobacillus fermentum* ATCC ۹۳۳۸
- *Lactobacillus rhamnosus* ATCC ۷۴۶۹
- *Lactobacillus casei* ATCC ۳۹۳۹۲
- *Proteus mirabilis* ATCC ۷۰۰۲

Pediococcus، در صنایع غذایی، به فراوانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. از میان باکتری‌های اسید لاکتیک، *Lactobacillus* به دلیل کاربردهای بیوتکنولوژیک بالقوه شناخته شده از آنها و همچنین اهمیت آنها در صنایع غذایی، بیش از سایرین مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۴). در مطالعات مختلف، اثر پروبیوتیک‌ها در ممانعت و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های روده‌ای، به اثبات رسیده است. این باکتری‌ها، با تولید محصولات ضدباکتریایی (مانند باکتریوسین‌ها، بوتیریک اسید و متابولیت‌های اکسیژن مثل پراکسید هیدروژن)، تولید اسیدهای چرب با زنجیره‌ی کوتاه، تولید بیوسورفاکتانت‌ها، رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا برای اشغال گیرنده‌های سطحی و اکتساب مواد غذایی، تولید آنزیم‌های متفاوت و تجزیه‌ی بهتر مواد غذایی، تحریک انتروسیست‌ها برای تولید سایتوکاین‌ها، تنظیم و تحریک سیستم ایمنی و اثر بر بیان ژن‌های بیماری‌زا، می‌توانند اثرات درمانی سود بخشی داشته باشند (۵). به علت تولید فاکتورهای ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل درمانی و پیشگیری‌کننده از بیماری‌های عفونی ایجاد شده توسط پاتوژن‌های دهانی، روده‌ای و ادراری- تناسلی، مطرح شده‌اند (۶).

از سوی دیگر، گونه‌های *Proteus*، از خانواده‌ی *Enterobacteriaceae*، بزرگ‌ترین و نامتجانس‌ترین مجموعه‌ی باسیل‌های گرم منفی، با اهمیت فوق‌العاده در پزشکی می‌باشند و شامل ارگانیسیم‌هایی هستند که در همه جا حضور داشته و در تمام جهان در خاک، آب و سبزیجات یافت می‌شوند. این میکروارگانیسیم‌ها، به عنوان قسمتی از فلور طبیعی روده در بیشتر حیوانات و همچنین انسان، محسوب می‌شوند. این باکتری‌ها، عامل بیماری‌های مختلفی در انسان بوده و ۳۰ تا ۳۵ درصد کل باکتری‌ها، بیش از ۷۰ درصد عفونت‌های مجاری ادراری و بسیاری از عفونت‌های روده‌ای را به خود اختصاص داده‌اند (۷). افرادی که از عفونت‌های مجاری ادراری ناشی از *Proteus mirabilis* و *Proteus vulgaris* رنج می‌برند، اغلب دچار باکتریوری، سیستیک، سنگ‌های کلیه و مثانه، انسداد کاتتر، پیلونفریت مزمن و تب می‌شوند (۸).

چندین روش برای شناسایی فعالیت ضد میکروبی *Lactobacillus* در دسترس است که بر اساس اثبات فعالیت آنتاگونیستی آنها، استوار می‌باشد. معمولاً این روش‌ها، در محیط جامد انجام پذیرفته و بر اساس شناسایی مهار رشد سویه‌های حساس علیه سویه‌های آزمون، صورت می‌پذیرد. ساده‌ترین روش جهت آزمایش محیط برای تولید مواد ضد میکروبی، رشد باکتری‌های تولید شده در آگار پوشیده

Lactobacillus در مرکز پلیت‌ها نقطه‌گذاری شدند. بعد از گذشت ۱۸ تا ۲۴ ساعت، بررسی تولید هاله‌ی عدم رشد توسط مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های مختلف *Proteus* ثبت گردید (۹).

روش انتشار در چاهک پلیت (Well diffusion agar). طی این روش، از سوسپانسیون باکتری‌های بیماری‌زای کشت داده شده در محیط نوترینت براث، کدورتی معادل ۰/۵ مک فارلند (1×10^8 CFU/ml) تهیه شد. سپس با سواب استریل، از باکتری بیماری‌زا با کدورت ۰/۵ مک فارلند، روی محیط مولر هینتون آگار، کشت متراکم و در سه جهت داده شد. چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر بر روی محیط مذکور در فواصل مشخص و مناسب، ایجاد شد. سپس، از مایع رویی کشت باکتری‌های اسید لاکتیک، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر، در چاهک‌ها ریخته شد. به منظور انتشار بهتر مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* پلیت‌ها حدود ۳۰ دقیقه در یخچال ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد، سرماگذاری شدند. سپس، پلیت‌ها را به آرامی به انکوباتور در دمای مناسب رشد *Proteus* منتقل کرده و پس از ۲۴ ساعت، قطر هاله‌ی عدم رشد مربوط به هر سویه، توسط خط‌کش میلی‌متری، اندازه‌گیری و ثبت گردید. به منظور کاهش خطا، هر آزمون سه بار تکرار شد (۱۰). در این روش، واحد فعالیت (Activity unit) مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus* علیه باکتری‌های بیماری‌زای مورد بررسی، به صورت زیر محاسبه شد (۱۳):

$$\text{Activity unit} = \frac{Lz - Ls}{V}$$

که در آن، Activity unit (واحد فعالیت) به عنوان فعالیت مهار (بر حسب mm^2/mm^2)؛ Lz ، مساحت ناحیه‌ی عدم رشد (بر حسب mm^2)؛ Ls ، مساحت هر چاهک (بر حسب mm^2) و V ، حجم نمونه‌ی ریخته شده در داخل هر چاهک (بر حسب ml) می‌باشد.

روش MODA. به منظور بررسی کمی خاصیت ضد میکروبی مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus* در محیط مایع، از روش MODA (Microscale Optical Density Assay) استفاده گردید. در این روش، از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای استفاده شد. داخل هر چاهک، ۱۰۰ میکرولیتر از سویه‌های *Proteus* مورد بررسی (با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ در محیط نوترینت براث) ریخته و سپس ۱۵ میکرولیتر از مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* به هر چاهک اضافه گردید. همچنین، در چاهک‌های جداگانه، از محیط کشت MRS براث

- *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶
- *Proteus vulgaris* PTCC ۱۱۸۲
- *Proteus vulgaris* ATCC ۷۸۲۹

کشت سویه‌های میکروبی. محیطی که در این تحقیق به عنوان محیط کشت اصلی برای *Lactobacillus* مورد استفاده قرار گرفت، محیط کشت MRS (Man-Rogosa-Sharpe) براث و آگار بود. از این محیط، برای کشت‌های روزانه *Lactobacillus* استفاده گردید. سویه‌های خریداری شده بعد از احیا، به منظور کشت روزانه روی محیط‌های فوق، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت، گرماگذاری شدند. سویه‌های بیماری‌زای مورد استفاده نیز، روی محیط‌های کشت نوترینت براث کشت داده شدند. پس از گذشت زمان انکوباسیون و رشد باکتری‌ها، از سویه‌های *Proteus* مورد بررسی، سوسپانسیون سلولی تهیه شد.

ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus*. در این مطالعه، از روش‌های نقطه‌گذاری (Agar spot)، چاهک پلیت (Well diffusion agar) و MODA برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی سویه‌های مختلف *Lactobacillus* اعم از *L. plantarum*، *L. acidophilus*، *L. fermentum*، *L. rhamnosus* و *L. casei* در مقابل یکدیگر و نیز علیه سویه‌های پاتوژن ذکر شده در این بررسی، استفاده گردید.

جداسازی مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus*. در ارلن‌های ۵۰ میلی‌لیتری، مقدار ۳۰ میلی‌لیتر از محیط کشت MRS براث استریل، آماده و به آنها ۱۰۰۰ میکرولیتر از کشت شبانه سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی، جداگانه تلقیح گردید. ارلن‌های حاوی باکتری، در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط بی‌هوازی با CO_2 ۰/۵٪، به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. به منظور جداسازی مایع رویی کشت *Lactobacillus*، محتویات ارلن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد و با دور ۷۰۰۰ g، سانتریفوژ شدند. سپس، مایع رویی فیلتر شده ($0.22 \mu\text{m}$) به منظور ارزیابی خاصیت ضد میکروبی آنها علیه سویه‌های مختلف *Proteus*، با روش‌های مختلف، مورد سنجش قرار گرفتند (۱۲).

روش نقطه‌گذاری (Agar spot). در این روش، ۱۰ میکرولیتر از کشت شبانه‌ی باکتری‌های بیماری‌زا، درون ۷ میلی‌لیتر محیط کشت BHI نیمه جامد (با ۰/۷ درصد آگار)، در دمای ۴۷ درجه‌ی سانتی‌گراد، ریخته شد. پس از بسته شدن محیط فوق در پلیت، ۵ میکرولیتر از مایع رویی کشت

(که با کمک اسید کلریدریک ۱ نرمال و هیدروکسید سدیم ۱ نرمال، pH آن به pH مایع رویی کشت سویه‌های مختلف *Lactobacillus* رسانده شده بود)، به عنوان شاهد محیط کشت و از چاهک فاقد عصاره و یا محیط کشت، به عنوان شاهد رشد، استفاده گردید. به منظور کاهش خطا، هر آزمون، سه بار تکرار شد. سپس، میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. پس از پایان زمان انکوباسیون، جذب نوری نمونه‌ی آنها، با استفاده از دستگاه الایزا ریدر، در طول موج ۶۰۰ نانومتر، خوانده شد. اختلاف جذب مشاهده شده بین چاهک‌های کنترل (محیط کشت) و چاهک‌های آزمون (مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus*)، به عنوان فعالیت ضد میکروبی مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های بیماری‌زا، طبق رابطه‌ی زیر گزارش گردید (۱۴):

$$100 \times \frac{\text{جذب نوری چاهک حاوی مایع رویی کشت } Lactobacillus \text{ (شاهد آزمون)}}{\text{جذب نوری چاهک حاوی مایع رویی کشت } Lactobacillus \text{ (شاهد آزمون)}} = \text{درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی}$$

یافته‌ها

نتایج ارزیابی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* علیه *Proteus*

روش Agar spot در بررسی خاصیت ضد میکروبی مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های *Proteus* مورد بررسی به روش آگار اسپات، هاله‌ی عدم رشد علیه تمامی سویه‌های مورد بررسی، مشاهده گردید. بیشترین هاله‌ی عدم رشد در این روش، مربوط به *Lactobacillus fermentum* ATCC ۹۳۳۸ علیه *Proteus mirabilis* ATCC ۱۵۱۴۶ و *OxK* ATCC ۱۵۱۴۶ با قطر هاله‌ی عدم رشد

$22/00 \pm 1/00$ و کمترین هاله‌ی عدم رشد نیز مربوط به *Proteus mirabilis* ATCC ۷۰۰۲ با مقدار $9/00 \pm 0/5$ بوده است. همچنین نتایج، هیچ اثر آنتاگونیستی از سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی علیه یکدیگر را نشان ندادند. **روش چاهک پلیت**. نتایج حاصل از بررسی فعالیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های *Proteus* با استفاده از روش چاهک پلیت، در جدول ۱ نشان داده شده است. در این روش مشاهده شد که میانگین قطر هاله‌ی عدم رشد مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی علیه سویه‌های *Proteus* از $11/00$ تا $20/00$ میلی‌متر، متفاوت بوده است. از میان پروبیوتیک‌های مورد بررسی، *Lactobacillus fermentum* ATCC ۹۳۳۸، بیشترین قطر هاله‌ی عدم رشد را علیه سویه‌های *Proteus vulgaris* ATCC ۷۸۲۹ و *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶ به ترتیب برابر با $20/00 \pm 1/00$ و $19/00 \pm 1/00$ داشته و کمترین قطر هاله‌ی عدم رشد نیز مربوط به *Lactobacillus casei* ATCC ۳۹۳۹۲ علیه *Proteus vulgaris* PTCC ۱۱۸۲ برابر با $11/00 \pm 1/00$ بود. هیچ اثر آنتاگونیستی از سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی علیه یکدیگر، دیده نشد.

محاسبه‌ی واحد فعالیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* علیه *Proteus*. نتایج بررسی واحد فعالیت مایع رویی از کشت باکتری‌های *Lactobacillus* پس از مشاهده و ثبت هاله‌های عدم رشد با استفاده از روش چاهک پلیت (AWD)، در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این نتایج، *Lactobacillus fermentum* ATCC ۹۳۳۸ بالاترین فعالیت مهاری به اندازه‌ی $2009/60 \text{ ml/mm}^2$ ، به واسطه‌ی ایجاد هاله‌ی عدم رشد $20/00$ میلی‌متر علیه *Proteus vulgaris* ATCC ۷۸۲۹ داشته است.

جدول ۱. ارزیابی اثر مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus* علیه *Proteus mirabilis* ATCC ۷۰۰۲، *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶، *Proteus vulgaris* PTCC ۱۱۸۲ و *Proteus vulgaris* ATCC ۷۸۲۹ بر حسب میلی‌متر و اثر آنتاگونیستی سویه‌های *Lactobacillus* مولد مواد ضد میکروبی علیه یکدیگر.

سویه مولد مواد ضد میکروبی					سویه آزمون
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC ۳۹۳۹۲	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC ۷۴۶۹	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC ۹۳۳۸	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC ۸۰۱۴	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ۴۳۵۶	
$12/33 \pm 0/58$	$13/50 \pm 1/00$	$14/00 \pm 0/50$	$16/00 \pm 1/00$	$14/33 \pm 0/58^1$	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲
$15/55 \pm 0/58$	$18/00 \pm 1/00$	$19/00 \pm 1/00$	$15/00 \pm 1/53$	$14/50 \pm 1/15$	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶
$11/00 \pm 1/00$	$13/33 \pm 0/58$	$16/00 \pm 1/53$	$13/67 \pm 1/53$	$14/00 \pm 1/00$	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲
$17/77 \pm 1/00$	$18/00 \pm 1/00$	$20/00 \pm 1/00$	$16/00 \pm 0/58$	$17/00 \pm 0/58$	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹

^۱ نتایج، از تکرار سه بار هر آزمون گزارش شده است (SD $\pm$ میانگین قطر هاله عدم رشد).

جدول ۲. هاله‌ی عدم رشد مشاهده شده توسط سویه‌های *Lactobacillus* علیه رشد سویه‌های *Proteus mirabilis* ATCC ۷۰۰۲ و *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶، *Proteus vulgaris* PTCC ۱۱۸۲ و *Proteus vulgaris* ATCC ۷۸۲۹ و مقایسه‌ی فعالیت مهاري مشاهده شده در آنها.

فعالیت مهاري (ml/mm ²)	مساحت ناحیه مهاري (mm ²)	مساحت چاهک (mm ²)	قطر هاله عدم رشد (mm)	قطر چاهک (mm)	باکتری بیماری‌زا	باکتری‌های اسید لاکتیکی
۴۸۱/۵۹	۱۶۱/۲۰	۱۱۳/۰۴	۱۴/۳۳	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ۴۳۵۶
۵۲۰/۰۶	۱۶۵/۰۵	۱۱۳/۰۴	۱۴/۵۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶	
۴۰۸/۲۰	۱۵۳/۸۶	۱۱۳/۰۴	۱۴/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	
۱۱۳۸/۲۵	۲۲۶/۸۷	۱۱۳/۰۴	۱۷/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	
۸۷۹/۲۰	۲۰۰/۹۶	۱۱۳/۰۴	۱۶/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC ۸۰۱۴
۶۳۵/۸۵	۱۷۶/۶۳	۱۱۳/۰۴	۱۵/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶	
۳۳۶/۵۲	۱۴۶/۶۹	۱۱۳/۰۴	۱۳/۶۷	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	
۸۷۹/۲۰	۲۰۰/۹۶	۱۱۳/۰۴	۱۶/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	
۴۰۸/۲۰	۱۵۳/۸۶	۱۱۳/۰۴	۱۴/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC ۹۳۳۸
۱۷۰۲/۴۵	۲۸۳/۳۹	۱۱۳/۰۴	۱۹/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶	
۸۷۹/۲۰	۲۰۰/۹۶	۱۱۳/۰۴	۱۶/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	
۲۰۰۹/۶۰	۳۱۴/۰۰	۱۱۳/۰۴	۲۰/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	
۳۰۰/۲۶	۱۴۳/۰۷	۱۱۳/۰۴	۱۳/۵۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC ۷۴۶۹
۱۴۱۳/۰۰	۲۵۴/۳۴	۱۱۳/۰۴	۱۸/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶	
۲۶۴/۴۶	۱۳۹/۴۹	۱۱۳/۰۴	۱۳/۳۳	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	
۱۴۱۳/۰۰	۳۴/۲۴۵	۱۱۳/۰۴	۱۸/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	
۶۳/۰۳	۱۱۹/۳۴	۱۱۳/۰۴	۱۲/۳۳	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲	<i>Lactobacillus casei</i> ۳۹۳۹۲ ATCC
۷۶۷/۷۵	۱۸۹/۸۱	۱۱۳/۰۴	۱۵/۵۵	۶/۰۰	<i>Proteus mirabilis</i> OXK ATCC ۱۵۱۴۶	
۱۸۰/۵۵	۹۴/۹۹	۱۱۳/۰۴	۱۱/۰۰	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	
۱۳۴۸/۴۲	۲۴۷/۸۸	۱۱۳/۰۴	۱۷/۷۷	۶/۰۰	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	

رخ داده است و این اختلاف، از ۷۷/۸۲٪ برای سویه‌ی *Lactobacillus plantarum* تا ۹۷/۷۸٪ برای سویه‌ی *Lactobacillus acidophilus* علیه *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶، مشاهده گردید.

بحث

Proteus متعلق به خانواده‌ی *Entrobacteriaceae* و دارای صفات کلی آنها بوده و به طور گسترده در محیط‌های طبیعی مثل آب آلوده، خاک و کودهای شیمیایی وجود داشته و نقش مهمی نیز در تجزیه‌ی مواد آلی با منشأ حیوانی بازی می‌کنند. *Proteus* در حال حاضر به عنوان عامل بیماری‌زای فرصت‌طلبی شناخته می‌شود که در انسان به خصوص افراد واجد نقص آناتومی و فیزیولوژیک، می‌تواند باعث ایجاد عفونت شود (۱۵). از آنجا که *E. coli* شایع‌ترین عامل ایجادکننده‌ی عفونت‌های مجاری ادراری می‌باشد، مشخص شده است که *Proteus* دومین عامل شایع در این عفونت، به خصوص در عفونت‌های بیمارستانی و افراد با استفاده‌ی طولانی مدت از

روش MODA. نتایج بررسی خاصیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* با استفاده از این روش نیز نشان داد که مایع رویی از کشت این باکتری‌ها می‌تواند اثرات ضد میکروبی خوبی علیه تمام سویه‌های *Proteus* مورد بررسی، نشان دهد. جدول ۳، نتایج فعالیت ضد میکروبی مایع رویی از کشت سویه‌های مختلف *Lactobacillus* را با استفاده از متد MODA، نشان می‌دهد. این نتایج، حاصل از جذب در ۶۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر، پس از اضافه کردن مایع رویی فیلتر شده از کشت سویه‌های *Lactobacillus* می‌باشد. نتایج جذب، به صورت درصد اختلاف مشاهده شده بین جذب نوری چاهک حاوی محیط کشت (کنترل) و جذب نوری چاهک حاوی مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* (شاهد آزمون) برای سویه‌های *Lactobacillus* مختلف، علیه تمامی سویه‌های *Proteus* مورد بررسی گزارش گردیده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، در بین تمامی سویه‌های *Lactobacillus* مورد بررسی علیه سویه‌های مختلف *Proteus*، کاهش قابل توجهی در رشد سلول‌های باکتریایی

جدول ۳. نتایج بررسی مایع رویی از کشت *Lactobacillus* علیه رشد سویه‌های مختلف *Proteus* با استفاده از روش MODA و مقایسه‌ی درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی.

جذب در ۶۰۰ نانومتر				مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus</i>	
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC ۷۸۲۹	<i>Proteus vulgaris</i> PTCC ۱۱۸۲	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC OXK ۱۵۱۴۶	<i>Proteus mirabilis</i> ATCC ۷۰۰۲		
۰/۵۸۸	۰/۵۱۲	۰/۶۸۳	۰/۵۰۷	باکتری بیماری‌زا (شاهد رشد)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC ۴۳۵۶
۰/۴۹۳	۰/۵۰۵	۰/۵۴۰	۰/۴۶۳	محیط کشت (کنترل)	
۰/۰۳۳	۰/۰۷۰	۰/۰۱۲	۰/۰۵۳	مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus acidophilus</i> (شاهد آزمون)	
%۹۳/۳۰	%۸۶/۱۳	%۹۷/۷۸	%۸۸/۵۵	درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی	
۰/۵۸۸	۰/۵۱۲	۰/۶۸۳	۰/۵۰۷	باکتری بیماری‌زا (شاهد رشد)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC ۸۰۱۴
۰/۴۹۳	۰/۵۰۵	۰/۵۴۰	۰/۴۶۳	محیط کشت (کنترل)	
۰/۰۲۴	۰/۰۶۸	۰/۱۲۰	۰/۰۳۳	مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus plantarum</i> (شاهد آزمون)	
%۹۵/۱۳	%۸۶/۵۳	%۷۷/۷۸	%۹۲/۸۷	درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی	
۰/۵۸۸	۰/۵۱۲	۰/۶۸۳	۰/۵۰۷	باکتری بیماری‌زا (شاهد رشد)	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC ۹۳۳۸
۰/۴۹۳	۰/۵۰۵	۰/۵۴۰	۰/۴۶۳	محیط کشت (کنترل)	
۰/۰۴۵	۰/۰۷۸	۰/۰۳۹	۰/۰۹۲	مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus fermentum</i> (شاهد آزمون)	
%۹۰/۸۷	%۸۴/۵۵	%۹۲/۷۸	%۸۰/۱۳	درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی	
۰/۵۸۸	۰/۵۱۲	۰/۶۸۳	۰/۵۰۷	باکتری بیماری‌زا (شاهد رشد)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC ۷۴۶۹
۰/۴۹۳	۰/۵۰۵	۰/۵۴۰	۰/۴۶۳	محیط کشت (کنترل)	
۰/۰۶۱	۰/۰۹۹	۰/۰۵۰	۰/۰۷۶	مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus rhamnosus</i> (شاهد آزمون)	
%۸۷/۶۳	%۸۰/۴۰	%۹۰/۷۴	%۸۳/۵۹	درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی	
۰/۵۸۸	۰/۵۱۲	۰/۶۸۳	۰/۵۰۷	باکتری بیماری‌زا (شاهد رشد)	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC ۳۹۳۹۲
۰/۴۹۳	۰/۵۰۵	۰/۵۴۰	۰/۴۶۳	محیط کشت (کنترل)	
۰/۰۷۵	۰/۱۱۲	۰/۰۸۷	۰/۱۰۱	مایع رویی از کشت <i>Lactobacillus casei</i> (شاهد آزمون)	
%۸۴/۷۹	%۷۷/۸۲	%۸۳/۸۹	%۷۸/۱۹	درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی	

کاتترها می‌باشد. همچنین، *Proteus vulgaris* با شدت کمتری در این افراد شناسایی شده است (۱۶ و ۱۷).

از طرفی، پروبیوتیک‌ها باکتری‌های مفیدی بوده که پس از ورود به بدن، در ناحیه‌ی روده ساکن شده و اثرات مفیدی در سلامتی انسان بر جای می‌گذارند. امروزه پروبیوتیک‌ها نه تنها به عنوان محرک رشد، بلکه برای تحریک دستگاه ایمنی و پیشگیری از ابتلا به بسیاری از بیماری‌ها، به کار گرفته می‌شوند. مواردی از اثرات بالقوه و نیز اثبات شده‌ی

باکتری‌های پروبیوتیک شامل کمک به هضم لاکتوز، مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای روده‌ای، اثر مهارى بر سرطان کولون، تقویت سیستم ایمنی، رشد باکتری‌های روده‌ی باریک، کاهش فشار خون و تأثیر بر عفونت‌های مجاری ادراری-تناسلی، می‌باشد (۱۸). استفاده از پروبیوتیک‌ها به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌ها امروزه رو به گسترش می‌باشد، ولی نقش پروبیوتیک‌ها در کاهش بیماری‌زایی *Proteus mirabilis* و *Proteus vulgaris* کمتر مورد بررسی قرار

گرفته است. بنابراین پرداختن به رابطه‌ی عملکردی بین پروبیوتیک‌ها و باکتری‌های *Proteus*، امری مهم و جالب به نظر می‌رسد.

در این مطالعه مشاهده شد که تعدادی از سویه‌های پروبیوتیکی *Lactobacillus* توانستند رشد را در تمامی سویه‌های *Proteus* مورد بررسی با هر سه روش ارزیابی خاصیت ضد میکروبی، مهار کنند. با استفاده از هر دو روش آگار اسپات و چاهک پلیت مشاهده شد که *Lactobacillus fermentum* ATCC ۹۳۳۸، بالاترین فعالیت مهارتی را به واسطه‌ی تولید مواد ضد میکروبی مختلف علیه سویه‌های *Proteus mirabilis* ATCC ۷۸۲۹ و *Proteus vulgaris* ATCC ۱۵۱۴۶ OXK داشته است. در بررسی خاصیت ضد میکروبی سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های مختلف *Proteus* با روش MODA نیز مشخص گردید که علیه تمامی سویه‌های مورد بررسی، کاهش قابل توجهی در جذب نوری چاهک حاوی مایع ضد میکروبی نسبت به شاهد محیط کشت، مشاهده گردید (جداول ۱ تا ۳).

بسیاری از محققین، اثر ضد میکروبی *Lactobacillus* را علیه سایر میکروارگانیسم‌ها بررسی کرده و نشان داده‌اند زمانی که *Lactobacillus* روی محیط‌های کشت اختصاصی و یا انتخابی کشت داده شوند، قادر به تولید ترکیبات ضد میکروبی خواهند بود (۱۹). در مطالعه‌ی حاضر، مشاهده شد که باکتری‌های اسید لاکتیک توانستند رشد را در سویه‌های مختلف *Proteus* مهار کنند، که این اثر احتمالاً به دلیل تولید مواد ضد میکروبی متعدد مانند اسیدهای آلی، هیدروژن پراکسید، کربن پراکسید، دی‌استیل‌ها، مواد ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین و مهارکننده‌های چسبندگی مانند بیوسورفاکتانت‌ها، بوده است.

به منظور بررسی اثر سویه‌های پروبیوتیکی بر مهار رشد باکتری‌های عامل عفونت ادراری در محیط برون‌تنی (*in vitro*)، Lim و همکارانش در سال ۲۰۰۹ در کشور کره، مطالعه‌ای را روی کودکان مبتلا به عفونت مجاری ادراری انجام داده و دریافتند که سویه‌های *Lactobacillus*، خاصیت ضد میکروبی خوبی علیه عوامل بیماری‌زای ادراری، از خود نشان می‌دهند (۳). همچنین، تحقیقات فراوانی در رابطه با نقش پروبیوتیک‌ها در کاهش بروز عفونت‌های عود کننده‌ی مجاری ادراری، با به‌کارگیری پروبیوتیک‌ها به عنوان عوامل دارویی موضعی، انجام شده و نتایج نشان می‌دهند افرادی که به مدت دو هفته یا بیشتر، در معرض *Lactobacillus* بودند، میزان عفونت‌های ادراری و عفونت‌های ناشی از *Proteus*

کاهش داشته است (۲۰).

در بررسی‌های دیگر نیز اثر مهارتی مایع رویی کشت سویه‌های *Lactobacillus* بر رشد *Proteus* ارزیابی شده است. در بررسی Mohankumar در سال ۲۰۱۱ مشاهده شد که *Lactobacillus acidophilus* بر *Proteus* اثر مهارتی داشته و این اثر مهارتی بیشتر مربوط به تولید باکتریوسین *Lactobacillus acidophilus* بوده است (۱۲). در بررسی انجام شده توسط Ibrahem و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نیز مشخص شد که *Lactobacillus acidophilus* و *Lactobacillus plantarum* جدا شده از زنان، می‌توانند رشد را در *Proteus mirabilis* مهار کنند. همچنین مشخص گردید که مکانیسم این اثر ضد میکروبی، مربوط به عوامل مختلفی می‌باشد که از آن جمله می‌توان به تولید عوامل ضد میکروبی نظیر اسید لاکتیک، باکتریوسین، هیدروژن پراکسید و بیوسورفاکتانت‌ها که می‌توانند روی چسبندگی و تولید بیوفیلم‌ها اثر داشته باشند، اشاره کرد (۲۱).

در مطالعه‌ی حاضر مشاهده گردید که درصد اختلاف مشاهده شده در رشد سلول‌های باکتریایی در مایع رویی از کشت سویه‌های *Lactobacillus* با pH اسیدی از ۷۷/۸۲ درصد برای *Lactobacillus plantarum* تا ۹۷/۷۸ درصد برای *Lactobacillus acidophilus* علیه *Proteus mirabilis* OXK ATCC ۱۵۱۴۶ متفاوت بوده است.

در بررسی که توسط Lash و همکارانش در سال ۲۰۰۵ بر مایع رویی از کشت *Lactobacillus plantarum* با استفاده از متد MODA انجام گرفت، درصد اختلاف در رشد سلول‌های باکتریایی علیه باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی نظیر *Serratia*، *Pseudomonas aeruginosa*، *E. coli*، *Salmonella typhi*، *Shigella flexneri*، *marcescens*، *Listeria innocua*، *Staphylococcus aureus*، *murium* و *Staphylococcus epidermidis* با مقادیر بالای ۹۰ درصد به دست آمد که نشان‌دهنده‌ی وجود خاصیت ضد میکروبی به واسطه‌ی وجود باکتریوسین از این *Lactobacillus* می‌باشد (۱۴). این نتایج با یافته‌های تحقیق حاضر، همخوانی دارد.

نتیجه‌گیری

از آنجا که باکتری‌های *Proteus*، در فرآیندهای درمان طولانی مدت، دچار مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی می‌شوند، می‌توان از پتانسیل‌های موجود در باکتری‌های اسید لاکتیک

بنابراین، نتایج تقریباً یکسان و مشابهی از هر سه روش مورد بررسی در تعیین حساس‌ترین سویه و یا مقاوم‌ترین سویه، به‌دست آمد. با توجه به سهولت استفاده و حساسیت بالاتر در روش کمی MODA، استفاده از این روش به عنوان جایگزین روش‌های دیگر در محیط جامد، پیشنهاد می‌گردد.

تشکر و قدردانی

این طرح، با حمایت شعبه‌ی بین‌الملل دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی-درمانی شهید بهشتی انجام شده است. بدین‌وسیله، نویسندگان مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از اساتید بزرگوار و پرسنل محترم دانشگاه، اعلام می‌دارند.

در این خصوص بهره‌برد. همچنین، در مقایسه‌ی روش‌های مختلف در تعیین خاصیت ضد میکروبی، معلوم گردید که از میان روش‌های انجام شده در محیط جامد، هاله‌ی عدم رشد با حساسیت و دقت بیشتری در رابطه با روش چاهک پلیت، نسبت به روش آگار اسپات و متعاقب آن، محاسبه‌ی واحد فعالیت سویه‌های *Lactobacillus* علیه سویه‌های پاتوژن مورد بررسی، ایجاد شده است. همچنین، با استفاده از روش کمی MODA در حضور محیط مایع در میکروتیتر پلیت نیز می‌توان درصد اختلاف در جذب سلول‌ها را به صورت کمی محاسبه و مقایسه نمود. در محیط مایع، به دلیل عدم جذب مواد ضد میکروبی توسط آگار موجود در محیط و نیز اثر مستقیم آن بر عامل بیماری‌زا، همان‌طور که در این بررسی نیز مشاهده شد، داشتن حساسیت بالا، دور از انتظار خواهد بود.

REFERENCES

1. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965;147(3659):747-8.
2. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002;82(1-4):279-89.
3. Lim IS, Lee HS, Kim WY. The effect of lactic acid bacteria isolates on the urinary tract pathogens to infants *in vitro*. *J Korean Med Sci* 2009;24(Suppl 1):S57-S62.
4. Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001;32(1):37-41.
5. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Bifidobacteria as probiotic agents-physiological effects and clinical benefits. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22(6):495-512.
6. Axelsson L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, von Wright A, Ouwehand A, editors. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*. 3rd ed. Basel (Switzerland): Marcel Dekker Inc.; 2004. p. 1-66.
7. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. Enterobacteriaceae. *Medical Microbiology*. St. Louis: Mosby Publishing; 2002. p. 266-80.
8. Breitenbach JM, Hausinger RP. *Proteus mirabilis* urease. Partial purification and inhibition by boric acid and boronic acids. *Biochem J* 1988;250(3):917.
9. Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M. Study of *Lactobacillus* as probiotic bacteria. *Iran J Public Health* 2004;33(2):1-7.
10. Schillinger U, Lücke FK. Antibacterial activity of *Lactobacillus* sake isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 1989;55(8):1901-6.
11. Lash BW, Gourama H, Mysliwiec TH. Microscale assay for screening of inhibitory activity of *Lactobacillus*. *Biotechniques* 2002;33:1224-8.
12. Mohankumar A, Murugalatha N. Characterization and antibacterial activity of bacteriocin producing *Lactobacillus* isolated from raw cattle milk sample. *Int J Biol* 2011;3(3):128.
13. Usmiati S, Marwati T. Selection and optimization process of bacteriocin production from *Lactobacillus* sp. *Indonesian J Agric* 2009;2(2):82-92.
14. Lash BW, Mysliwiec TH, Gourama H. Detection and partial characterization of a broad-range bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* (ATCC 8014). *Food Microbiol* 2005;22(2):199-204.
15. Rózsalski A, Sidorchuk Z, Kotelko K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997;61(1):65-89.
16. O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 2000;13(4):534-46.

17. Sivick KE, Mobley HL. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun* 2010;78(2):568–85.
18. Aroutcheva AA, Simoes JA, Faro S. Antimicrobial protein produced by vaginal *Lactobacillus acidophilus* that inhibits *Gardnerella vaginalis*. *Infect Dis Obstet Gynecol* 2001;9(1):33–9.
19. Hamdan I, Mikolajcik E. Acidolin: an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. *J Antibiotics* 1974;27(8):631.
20. Barefoot SF, Klaenhammer TR. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 1983;45(6):1808–15.
21. Ibrahim KH, Salman JAS, Ali FA. Effect of titanium nanoparticles biosynthesis by *Lactobacillus crispatus* on urease, hemolysin and biofilm forming by some bacteria causing recurrent UTI in Iraqi women. *Eur Sci J* 2014;10(9):324–38.