

بهینه سازی اثر آنتی میکروبیال سوپ سلولی بیفیدوباکتریوم بر ویبریوکلا التور O1

مژگان درخشان سفیدی^۱، بی تا بخشی*

۱. گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۲۲

تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۳/۳۰

چکیده

مقدمه: وبا یک بیماری عفونی جدی است که توسط باکتری ویبریوکلا التور ایجاد می‌شود. افزایش مقاومت آنتی‌بیوتیکی این پاتوژن، نیاز مبرم به استراتژی‌های ضد میکروبی جایگزین را برجسته می‌کند. پست‌بیوتیک‌ها - ترکیبات زیست فعال تولید شده توسط پروبیوتیک‌ها - به دلیل دارا بودن ویژگی‌های ضد میکروبی، توجه فزاینده‌ای را به خود جلب کرده‌اند. این مطالعه باهدف ارزیابی و بهینه‌سازی اثرات ضد میکروبی مایع رویی بدون سلول مشتق شده از پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (CFS_{BB}) علیه سویه استاندارد ویبریوکلا التور ATCC 14,035 O1 انجام گردید.

روش: در این مطالعه تجربی آزمایشگاهی که در سال ۲۰۲۴ انجام شد، یک کشت شبانه از باکتری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم در محیط کشت MRS براث در غلظت‌های مختلف ۱۰^۴ تا ۱۰^۹ CFU/mL کشت داده شد. پس از سانتریفیوژ و فیلتراسیون برای حذف سلول‌های زنده، مایع رویی حاصل استریل شد. فعالیت ضد میکروبی CFS_{BB} علیه ویبریوکلا التور با استفاده از روش رقیق‌سازی در میکروبراث ارزیابی شد. غلظت پروتئین در CFS_{BB} با استفاده از سنجش اسید بیسینکونینیک (BCA) تعیین شد. تجزیه و تحلیل آماری بر اساس سطح معنی‌داری p-value < 0.05 انجام گردید.

یافته‌ها: افزایش غلظت اولیه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم منجر به افزایش محتوای پروتئین در CFS_{BB} شد. CFS_{BB} حاصل از کشت‌هایی با غلظت ۱۰^۸ و به‌ویژه ۱۰^۹ CFU/mL، قوی‌ترین اثرات مهاری را بر رشد ویبریوکلا التور نشان داد و فعالیت قابل توجهی در غلظت‌های بین ۴۰۰ تا ۸۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. با افزایش غلظت اولیه بیفیدوباکتریوم بیفیدوم از ۱۰^۴ به ۱۰^۹ CFU/mL، pH محیط کشت به‌طور قابل توجهی از ۶.۳ به ۴.۳ کاهش یافت که نشان‌دهنده افزایش قدرت مهاری است. به همین ترتیب، MIC از بیش از ۸۰۰ به ۴۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر کاهش یافت و اثر مهاری کلی از "کم" به "قوی" تشدید شد. اثربخشی CFS_{BB} به‌شدت به غلظت اولیه باکتری و دمای نگهداری وابسته بود و بیشترین مهار در غلظت‌های بالاتر (۱۰^۸-۱۰^۹ CFU/mL) و در دمای نگهداری سرد (۴ درجه سانتی‌گراد)، به‌ویژه در ۷ روز اول مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: CFS_{BB} فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی را در برابر ویبریوکلا التور O1 نشان می‌دهد که با تراکم باکتریایی بالاتر و تولید بیشتر متابولیت‌های ضد میکروبی افزایش می‌یابد. غلظت اولیه ۱۰^۹ CFU/mL به‌عنوان غلظت بهینه برای تهیه CFS_{BB} مؤثر توصیه می‌شود. این یافته‌ها از توسعه بیشتر مطالعات مبتنی بر پست‌بیوتیک‌ها به‌عنوان جایگزین‌های مؤثر و ایمن برای آنتی‌بیوتیک‌های سنتی، به‌ویژه در برابر پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، پشتیبانی می‌کند.

کلید واژه: بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، ویبریوکلا التور، سوپ سلولی بدون سلول، عوامل ضد باکتریایی

* نویسنده مسئول: بی تا بخشی، ایمیل: b.bakhshi@modares.ac.ir

ارجاع: درخشان سفیدی، مژگان، بخشی، بی تا. بهینه‌سازی اثر آنتی میکروبیال سوپ سلولی بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر ویبریوکلا التور O1. مجله دانشکده

علوم پزشکی ساوه، ۱۴۰۴؛ ۱(۱): ۵۴-۶۷. doi: 10.22034/jsavehums.2025.226087

مقدمه

وبا یک بیماری اسهالی حاد روده‌ای است که توسط ویبریو کلرا (*V. cholerae*) ایجاد می‌شود. این باکتری (*V. cholerae*) از سال ۱۸۱۷ مسئول هفت همه‌گیری مهم وبا بوده است (۱). بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO¹) سالانه میلیون‌ها مورد ابتلا و ده‌ها هزار مرگ‌ومیر ناشی از وبا در سراسر جهان رخ می‌دهد (۲). هیدراتاسیون درمانی، اصلی‌ترین روش درمان وبا است. با این حال، در موارد شدید بیماری و عفونت‌های خارج‌روده‌ای، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها نیز توصیه می‌شود. آزمایش حساسیت آنتی‌بیوتیکی (AST) برای *V. cholerae* در گذشته به دلیل مقاومت کم *V. cholerae* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج پیشنهاد نمی‌شد، اما امروزه گزارش‌هایی از مقاومت *V. cholerae* به آمینوگلیکوزیدها، تتراسایکلین، کلرامفنیکل، تری متوپریم-سولفامتوکسازول، آمپی‌سیلین و کارباپنم‌ها وجود دارد (۳). پاتوژن *V. cholerae* فرآیندی پیچیده است که شامل بیان هماهنگ چندین ژن مرتبط با بیماری‌زایی، بقا و سازگاری با استرس در میزبان برای ایجاد بیماری می‌شود (۴).

با گسترش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک باکتری *V. cholerae* تلاش‌های بسیاری در جهت معرفی و به‌کارگیری ترکیبات با خاصیت آنتی میکروبیال ولی ایمن مانند فرآورده‌های میکروبی غیرزنده از جمله پروبیوتیک‌ها، پارا‌پروبیوتیک‌ها و پست‌بیوتیک‌ها به‌عنوان رویکردهای نوین در مقابله با عفونت‌های میکروبی اهمیت یافته است. پروبیوتیک‌های زنده میکروارگانیسم‌هایی هستند که از طریق تعاملات مستقیم یا غیرمستقیم بین سلول‌ها یا از طریق متابولیت‌های آزادشده خود، مزایای ارزشمندی را برای میزبان ارائه می‌دهند؛ بنابراین، آن‌ها برای رویکردهای مختلف مناسب هستند (۵). ایمنی میکروارگانیسم‌های زنده همچنان به‌عنوان یک موضوع مورد بحث، به‌ویژه برای افراد مستعد، مطرح است (۶). به همین دلیل، استراتژی‌های مختلفی برای جایگزینی استفاده از میکروارگانیسم‌های زنده، مانند استفاده از پروبیوتیک‌های کشته‌شده به نام پارا‌پروبیوتیک‌ها (۷)، عصاره‌های میکروبی و مایع رویی بدون سلول (۸) توسعه

داده‌شده‌اند. عناصر ضد میکروبی ترشح‌شده توسط میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک را می‌توان "پست‌بیوتیک" نامید که شامل سلول‌های غیرزنده‌ای هستند که در صورت تجویز به مقدار کافی، مزایای سلامتی را برای میزبان افزایش می‌دهند (۹).

هدف از این مطالعه، ارزیابی و بهینه‌سازی اثرات ضد باکتریایی سوپ سلولی فاقد سلول (CFS_{BB}) حاصل از غلظت‌های مختلف باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum* علیه سویه استاندارد *V. cholerae* El Tor O1 ATCC 14,035 است.

روش

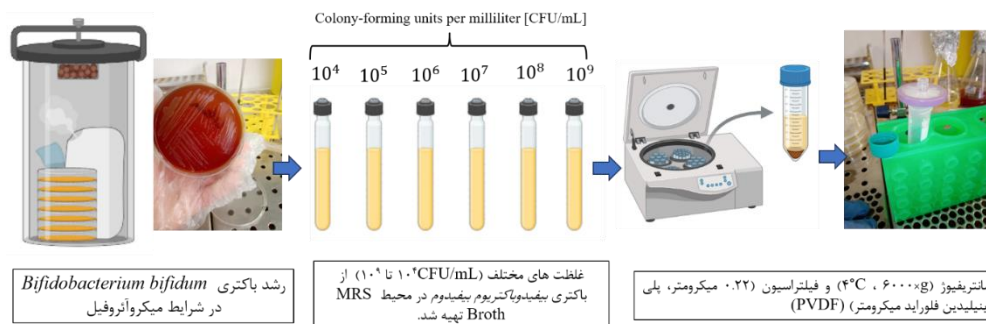
مطالعه تجربی آزمایشگاهی حاضر در سال ۲۰۲۴ با هدف بررسی خواص آنتی‌میکروبیال سوپ سلولی باکتری پروبیوتیک *B. bifidum* ATCC 29521 علیه *V. cholerae* El Tor O1 طراحی و اجرا شد. برای انجام این مطالعه، سویه پروبیوتیک مورد نظر و سویه استاندارد *V. cholerae* O1 El Tor ATCC 14,035 از بانک میکروبی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس تهیه شد. مراحل آماده‌سازی سوپ سلولی این باکتری (CFS_{BB})، سنجش میزان پروتئین، بررسی فعالیت ضد باکتریایی آن و تحلیل آماری نتایج مطابق روش‌های استاندارد و با استفاده از تجهیزات و کیت‌های معتبر بین‌المللی انجام گرفت. محیط‌های کشت مورداستفاده شامل MRS آگار و MRS براث (Ibresco، ایران) برای رشد *B. bifidum* و محیط مولر هینتون براث و آگار (Merk، آلمان) برای آزمایش‌های ضد باکتریایی بودند. برای تعیین مقدار پروتئین موجود در سوپ سلولی تهیه‌شده از کیت سنجش پروتئین PierceTM BCA (شرکت Thermo Scientific، انگلستان) و برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) از روش میکروبراث دایلووشن بر اساس دستورالعمل‌های مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد.

¹ World Health Organization

باکتری‌ها در این بازه زمانی با استفاده از مقیاس مک فارلند و بر اساس منحنی استاندارد رشد باکتری تعیین گردید (از 10^4 تا 10^9 CFU/mL). همچنین تعداد باکتری‌ها با روش شمارش کلنی (کلنی کانت) تأیید شد. هر یک از این غلظت‌ها با روش کلنی کانت^۱ نیز تعدادشان تأیید شد. در ادامه برای تهیه CFS_{BB} سلول‌ها با سانتریفیوژ $6000 \times g$ در دمای $4^\circ C$ (Microcentrifuge sigma 1-14k، آلمان) به مدت ۱۵ دقیقه حذف شدند. مواد رویی حاصل از سانتریفیوژ با دقت جمع‌آوری و از طریق فیلترهای 0.22 میکرومتر پلی وینیلیدین فلوراید (PVDF) (Millipore Sigma, USA) استریل شدند تا هرگونه اثری از سلول‌های زنده از بین برود. از این فرآیند، 50 میکرولیتر از CFS_{BB} روی محیط کشت MRS آگار کشت داده شده و به مدت 48 ساعت در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا عدم حضور سلول‌های باکتری در نمونه سوپ سلولی تهیه‌شده تأیید شود. CFS_{BB} تهیه‌شده به بخش‌های کوچک‌تری تقسیم و در دمای 20 - درجه سانتی‌گراد به‌منظور استفاده‌های بعدی نگهداری شدند (شکل ۱).

کشت باکتری *B. bifidum* و تهیه سوپ سلولی آن (CFS_{BB})

باکتری *B. bifidum* بر روی محیط کشت تازه MRS agar در جاربیه‌های حاوی گاز پک A (Sigma, USA) به مدت 48 ساعت در شرایط میکروآئروفیل و در دمای $37^\circ C$ انکوبه شد. به‌منظور تهیه سوپ سلولی این باکتری، از روش جفری و همکارانش در سال 2020 (۱۰) استفاده گردید. به این منظور، 100 میکرولیتر از کشت فعال شبانه *B. bifidum* در 5 mL محیط کشت تازه MRS Broth ($OD_{600nm} = 0.23$) رقیق شد و به مدت 48 ساعت در دمای $37^\circ C$ در شرایط میکروآئروفیل انکوبه شد. بعد از 24 ساعت غلظت‌های مختلف از باکتری (10^4 تا 10^9 CFU/mL) در محیط‌های کشت MRS Broth با تلقیح اولیه از محیط مایع حاوی کشت شبانه باکتری تهیه شد. به این ترتیب که در لوله‌های مختلف حاوی محیط کشت MRS Broth از کشت مایع شبانه باکتری اضافه شد به صورتی که غلظت اولیه تمامی لوله‌ها در OD_{600nm} برابر با 0.2 باشد. سپس، لوله‌ها به مدت 24 ساعت در دمای $37^\circ C$ درجه سانتی‌گراد در شرایط بی‌هوازی انکوبه شدند. غلظت



شکل ۱. تصویر نمادین از مراحل مختلف تهیه سوپ سلولی از غلظت مختلف باکتری *Bifidobacterium bifidum*

دستورالعمل‌های سازنده، تعیین شد. از محیط کشت فاقد CFS_{BB} به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد.

تعیین میزان پروتئین در سوپ سلولی *B. bifidum*

میزان پروتئین در CFS_{BB} تهیه‌شده از غلظت‌های مختلف (10^4 تا 10^9 CFU/mL) باکتری *B. bifidum* با استفاده از کیت سنجش پروتئین Pierce™ BCA و با پیروی از

¹ Colony Count

اندازه‌گیری pH سوپ سلولی غلظت‌های مختلف باکتری *B. bifidum* (۱۰^۴ تا ۱۰^۹)

مقدار pH هر یک از غلظت‌های مختلف سوپ سلولی (CFS_{BB}) در سه تکرار مستقل اندازه‌گیری شد. همچنین، به منظور بررسی نقش احتمالی pH در اثر مهاری، تغییرات pH پس از افزودن CFS_{BB} به محیط آزمون در شرایط تعیین MIC مورد ارزیابی قرار گرفت تا مشخص شود که آیا کاهش pH به تنهایی عامل بازدارندگی رشد باکتری است یا ترکیبات ضد میکروبی دیگر نیز در این فرایند نقش دارند.

بررسی اثر آنتی میکروبیال غلظت‌های مختلف *V. cholerae* El Tor O1 بر سویه استاندارد CFS_{BB}

برای بررسی خواص ویبریوسیدال CFS_{BB}، از روش میکروبراث دایلوژن مطابق با استانداردهای مؤسسه استانداردهای بالینی و آزمایشگاهی (CLSI) استفاده شد (۱۱). به طور خلاصه، محیط کشت مولر هینتون براث با کاتیون تنظیم شده (Merck، آلمان) به کار رفت تا در نهایت، حجم ۲۰۰ میکرولیتر در هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای (SPL، کره جنوبی) حاصل شود. در هر چاهک، ۲۰ میکرولیتر از کشت شبانه ایزوله استاندارد *V. cholerae* El Tor O1 با غلظت ۱۰^۸ CFU/mL به همراه مقادیر سریالی رقیق شده CFS_{BB} (به ترتیب ۸۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۰، ۵ و ۲.۵ میلی گرم در میلی لیتر) اضافه شد. شایان ذکر است که برای تعیین غلظت بهینه CFS_{BB}، این ترکیب از کشت‌های باکتری *B. bifidum* با غلظت‌های مختلف ۱۰^۴ تا ۱۰^۹ CFU/mL تهیه شد. اثر ضد باکتریایی هر سوپ به صورت جداگانه و با رقت‌های متوالی، بر روی ایزوله استاندارد *V. cholerae* El Tor O1 مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، برای هر غلظت، محیط کشت مایع حاوی تعداد برابر باکتری به عنوان کنترل مثبت و محیط کشت مایع فاقد باکتری به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. سپس، میکروپلیت‌ها به مدت ۱۸ تا ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C در انکوباتور شیکردار (IKA@KS، سیگما، آمریکا) انکوبه شدند.

MIC با اندازه‌گیری چگالی نوری (OD) در طول موج ۶۲۰ نانومتر (Czech, Epoch) و مقایسه رشد باکتری در

چاهک‌های حاوی سوپ سلولی با چاهک‌های کنترل تعیین شد. همچنین، آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم، Mast Group Ltd) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در ادامه، ۱۰۰ میکرولیتر از محتویات هر چاهک (نمونه‌های تیمار شده و کنترل) به محیط مولر هینتون آگار منتقل و کلنی‌های باکتری شمارش شدند تا میزان MIC مورد ارزیابی قرار گیرد.

بررسی پایداری متابولیت‌های غلظت‌های مختلف CFS_{BB}

به منظور بررسی پایداری متابولیت‌های موجود در غلظت‌های مختلف سوپ سلولی (CFS_{BB})، نمونه‌ها در سه دمای متفاوت شامل دمای اتاق (۲۵ °C)، یخچال (۴ °C) و دمای انکوباسیون (۳۷ °C) نگهداری شدند. سپس، در بازه‌های زمانی ۰، ۷ و ۱۴ روز پس از تهیه، اثر ضد باکتریایی آن‌ها بر ایزوله استاندارد *V. cholerae* با استفاده از آزمون MIC مورد ارزیابی قرار گرفت.

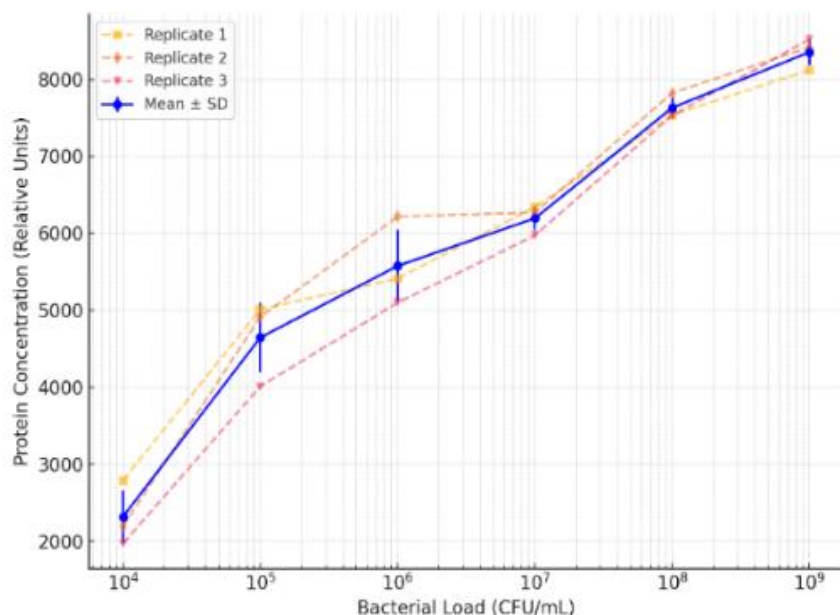
آنالیز آماری

هر آزمایش در سه تکرار انجام شد و نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. گروه‌های آزمایش و کنترل با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه (ANOVA) مقایسه شدند. محاسبات با استفاده از نرم افزار GraphPad Prism نسخه ۸.۲ (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, USA) انجام شد تا تفاوت‌هایی که از نظر آماری معنی دار بودند (p -value < 0.05) تعیین شوند.

یافته‌ها

تعیین میزان پروتئین در سوپ سلولی *B. bifidum*

روندی افزایشی در غلظت پروتئین با افزایش بار باکتریایی (CFU/mL) نشان می‌دهد که می‌تواند نشان از وجود یک رابطه دوز-پاسخ باشد؛ با این حال، نتایج آزمون همبستگی پیرسون این ارتباط را از نظر آماری معنادار تأیید نکرد ($P > 0.05$). (شکل ۲، جدول ۱).



شکل ۲. نمودار بررسی غلظت پروتئین موجود در سوپ سلولی استخراج شده از غلظت‌های متفاوت *Bifidobacterium bifidum*

جدول ۱. مقایسه ضرایب همبستگی، ضرایب تعیین و معناداری آماری غلظت‌های مختلف سوپ سلولی در مقایسه با کنترل منفی

مقایسه	ضریب همبستگی (r)	ضریب تعیین (R ²)	P-value	معنی‌داری آماری (α = 0.05)	تفسیر آماری
C- vs. 10 ⁴	-۰.۵۸	۰.۳۳	۰.۶۰	Ns*	همبستگی منفی ضعیف
C- vs. 10 ⁵	-۰.۹۶	۰.۹۳	۰.۱۶	ns	همبستگی منفی بسیار قوی
C- vs. 10 ⁶	-۰.۸۲	۰.۶۷	۰.۳۸	ns	همبستگی منفی نسبتاً قوی
C- vs. 10 ⁷	-۰.۹۳	۰.۸۸	۰.۲۲	ns	همبستگی منفی قوی
C- vs. 10 ⁸	-۰.۶۵	۰.۴۲	۰.۵۴	ns	همبستگی منفی متوسط
C- vs. 10 ⁹	۰.۵۶	۰.۳۲	۰.۶۱	ns	همبستگی مثبت ضعیف

تولید ترکیبات اسیدی و ضد میکروبی توسط باکتری است. نتایج نشان‌دهنده این است که این کاهش pH با افزایش قدرت مهاریه علیه *V. cholerae* همراه بوده، به طوری که MIC از بیش از ۸۰۰ به ۴۰۰ mg/mL کاهش یافته و اثر مهاریه کلی از "کم" به "قوی" رسیده است. نتایج پژوهش نشان می‌دهد که هرچه غلظت *B. bifidum* بیشتر باشد،

اندازه‌گیری pH سوپ سلولی در غلظت‌های مختلف باکتری *B. bifidum* (۱۰^۴ تا ۱۰^۹ CFU/mL)

با افزایش غلظت اولیه *B. Bifidum* از ۱۰^۴ تا ۱۰^۹ CFU/mL، pH محیط کشت به طور قابل توجهی از ۶.۳ به ۴.۳ کاهش یافته که نشان‌دهنده رشد باکتری و افزایش

توان ضد باکتریایی آن نیز قوی تر خواهد بود که احتمالاً به دلیل تولید بیشتر اسیدهای آلی و سایر عوامل ضد میکروبی در محیط اسیدی است (جدول ۲).

جدول ۲. بررسی pH غلظت‌های مختلف سوپ سلولی حاصل از *Bifidobacterium bifidum* و اثر ویبریوسیدال آن بر ایزوله استاندارد *V. cholerae*

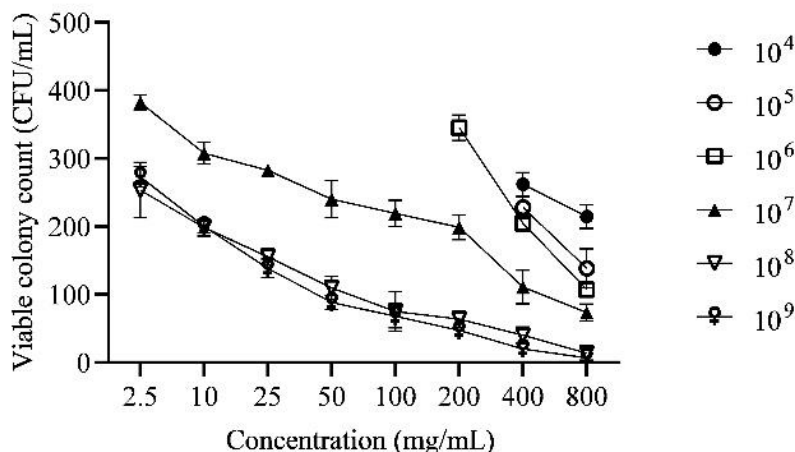
اثر مهارتی کلی	MIC (mg/mL)	pH بعد از افزودن به محیط آزمون	pH CFS _{BB}	غلظت اولیه <i>B. bifidum</i> (CFU/mL)
کم	>۸۰۰	۰.۰۱±۶.۳	۰.۰۵±۶.۳	۱۰ ^۴
کم	>۸۰۰	۰.۰۰±۶.۰	۰.۱۱±۵.۹	۱۰ ^۵
متوسط	>۸۰۰	۰.۰۵±۵.۷	۰.۰۱±۵.۷	۱۰ ^۶
متوسط خوب	۸۰۰	۰.۳۵±۵.۴	۰.۴۱±۵.۳	۱۰ ^۷
خوب	۵۰۰	۰.۲۷±۵.۰	۰.۰۶±۴.۹	۱۰ ^۸
قوی	۴۰۰	۰.۰۸±۴.۶	۰.۴۸±۴.۳	۱۰ ^۹

همچنین، اثر متقابل بین این دو عامل نیز معنادار بود که بیانگر تأثیر ترکیبی دوز و بار باکتریایی بر مهار رشد است. براساس نتایج به دست آمده، بیشترین اثر مهارتی بر *V. cholerae* El Tor O1 زمانی مشاهده شد که سوپ سلولی از *B. bifidum* با غلظت‌های بالا ۱۰^۸ تا ۱۰^۹ (CFU/mL) تهیه شده بود. این سوپ‌ها که احتمالاً حاوی مقادیر بالاتری از ترکیبات ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی یا باکتریوسین‌ها هستند، توانستند رشد *V. cholerae* El Tor O1 را به ویژه در غلظت‌های ۴۰۰ تا ۸۰۰ mg/mL به طور قابل توجهی کاهش دهند یا به طور کامل مهار کنند.

بررسی اثر آنتی میکروبیال غلظت‌های مختلف

V. cholerae El Tor O1 بر سوپ استاندارد CFS_{BB}

شکل ۳ نشان می‌دهد که افزایش غلظت مایع رویی بدون سلول باکتریایی منجر به کاهش بیشتر تعداد کلنی‌های زنده *V. cholerae* El Tor O1 در تمام بارهای باکتریایی آزمایش شده (۱۰^۴ تا ۱۰^۹ CFU/mL) می‌شود. نتایج آنالیز واریانس دوطرفه (Two-way ANOVA) نشان داد که هر دو عامل غلظت سوپ سلولی و بار باکتریایی اولیه، به طور معناداری بر بقای *V. cholerae* El Tor O1 اثر می‌گذارند ($P < 0.05$).



شکل ۳. نمودار شمارش کلنی‌های *Vibrio cholerae* (CFU/mL) متعاقب تیمار با غلظت‌های مختلف CFS_{BB}

مشاهده نشده است. از غلظت 10^7 به بالا، به‌ویژه در 10^8 و 10^9 CFU/mL، پایداری اثر ضد میکروبی در دمای 4°C حفظ شده، در حالی که در دماهای بالاتر (25°C و 37°C) به تدریج کاهش یافته یا از بین رفته است؛ بنابراین، بیشترین اثربخشی در غلظت‌های بالا و شرایط نگهداری سرد به‌ویژه در روزهای ابتدایی مشاهده می‌شود.

بررسی پایداری متابولیت‌های غلظت‌های مختلف CFS_{BB}

نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که اثر مهاري CFS_{BB} به شدت وابسته به غلظت اولیه و دمای نگهداری است. به‌گونه‌ای که در غلظت‌های پایین (10^4 تا 10^6 CFU/mL)، MIC در تمام دماها و زمان‌ها بیشتر از 800 mg/mL بوده و اثر ضدباکتریایی

جدول ۳. بررسی پایداری متابولیت‌های غلظت‌های مختلف CFS_{BB}* با ارزیابی حداقل غلظت کشندگی (MIC) در شرایط دمایی متفاوت و در بازه ۱۴ روز

غلظت اولیه باکتری (*CFU/mL)	دمای نگهداری ($^\circ\text{C}$)	MIC (mg/mL)/ روز		
		۰	۷	۱۴
10^4	4°C	>800	>800	>800
	25°C		>800	>800
	37°C		>800	>800
10^5	4°C	>800	>800	>800
	25°C		>800	>800
	37°C		>800	>800
10^6	4°C	>800	>800	>800
	25°C		>800	>800
	37°C		>800	>800
10^7	4°C	800.0 ± 45.01	800.0 ± 73.31	>800
	25°C		>800	>800
	37°C		>800	>800
10^8	4°C	500.0 ± 55.24	500.0 ± 55.24	512.0 ± 55.24
	25°C		512.0 ± 41.00	>800
	37°C		>800	>800
10^9	4°C	400.0 ± 55.24	400.0 ± 11.00	512.0 ± 41.20
	25°C		400.0 ± 60.02	>800
	37°C		>800	>800

* CFS_{BB}: Cell-free supernatant derived from the probiotic *Bifidobacterium bifidum*

** CFU: Colony-forming units

بحث

در سال‌های اخیر، مطالعات بسیاری برای معرفی ترکیبات مختلف با خاصیت آنتی میکروبیال انجام شده است. در این مطالعه، هدف بهینه‌سازی غلظت ویبریوسیدال سوپ سلولی باکتری *B. bifidum* است. نتایج این مطالعه نشان داد، بین غلظت‌های 10^8 و 10^9 CFU/mL از نظر اثربخشی سوپ سلولی در مهار *V. cholerae* El Tor O1 تفاوت وجود دارد ($P \leq 0.05$)، اما این تفاوت معمولاً در میزان اثر (شدت) و نه در ماهیت اثر است. با توجه به رشد بیشتر باکتری‌ها در غلظت 10^9 ، انتظار می‌رود متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها و سایر مواد مهاری در غلظت بالاتری در سوپ سلولی حضور داشته باشند، بنابراین سوپ سلولی 10^9 اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به 10^8 دارد. از نظر عملیاتی، تفاوت بین 10^8 و 10^9 ممکن است در عمل کوچک باشد، به‌ویژه اگر غلظت سوپ سلولی مورد استفاده بالا باشد (مثلاً ۸۰۰ mg/mL)، اما اگر بخواهید از دوز پایین‌تری استفاده کنید، سوپ تهیه‌شده از 10^9 گزینه بهتری برای تضمین اثربخشی کامل است.

در مطالعات بسیاری نقش آنتی میکروبیال سوپ سلولی باکتری‌های پروبیوتیک مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۲-۱۵). در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۳ (۱۶)، نشان داده شد که سوپ سلولی حاصل از ۴ گونه پروبیوتیک *Lactobacillus spp* (L.) شامل؛ *L. delbrueckii*، *L. acidophilus*، *L. johnsonii*، and *L. plantarum* به‌دست‌آمده از منابع مختلف از جمله شیرگاو و نمونه واژن انسانی توانست به‌صورت موفقیت‌آمیزی ایزوله‌های *Pseudomonas aeruginosa* را مهار کند. در مطالعه دیگری توسط آقای Lee و همکاران (۱۷)، سوپ سلولی باکتری *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 توانست رشد باکتری‌های *Staphylococcus aureus* ROH_0029، *Salmonella Gallinarum* CNHJ001 و *Escherichia coli* Salmonella enteritidis 190610_1 و *Escherichia coli* ROH_0034 را مهار کند. در سال ۲۰۱۸ مطالعه‌ای در برزیل نشان داد که سوپ سلولی لیوفیلیزه باکتری‌های *L.*

L. rhamnosus ATCC 7469 fermentum CCT 1629 با داشتن پتانسیل ضد میکروبی علیه *Salmonella spp* می‌تواند گزینه مناسبی برای کنترل بار میکروبی در محصولات حیوانی باشند (۱۸). مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۴ با هدف ارزیابی اثر ضد میکروبی هم‌افزایی مایع رویی بدون سلول (CFSs) مشتق شده از *Levilactobacillus brevis* و *L. plantarum* در برابر *Klebsiella pneumoniae* انجام گرفت و نتایج بیان‌گر فعالیت باکتری‌کشی^۱ وابسته به دوز سوپ سلولی بود (۱۹). خواص ضد میکروبی سوپ‌های سلولی مشتق از باکتری‌های پروبیوتیک حتی در مقابله با پاتوژن‌هایی همچون *Helicobacter pylori* نیز موفق عمل کردند. به‌گونه‌ای که در مطالعه‌ای در سال ۲۰۲۴، سوپ سلولی *Limosilactobacillus fermentum* T0701، با اثر بر اتصال باکتری *H. pylori* به سلول‌های AGS^۲، مانع از کلونیزاسیون این باکتری در محیط *In vitro* شد (۲۰).

در مطالعه پیشین ما، در بررسی اثر ویبریوسیدال سوپ سلولی ترکیب باکتری‌های *B. bifidum* و *L. acidophilus* کپسوله شده در پوشش کیتوزان، مشاهده شد که این خواص با تأثیر بر کاهش بیان ژن‌های ویرولانسی باکتری و نیز تأثیر بر بیان ژن‌های دخیل در ایمنی‌زایی به‌مانند TLR2/4 نقش ضد *V. cholerae* خود علیه سویه‌های بالینی را سبب می‌شود (۸).

اثر ضد میکروبی CFS باکتری‌ها در درجه اول از مواد زیست‌فعالی ناشی می‌شود که توسط باکتری‌ها در طول رشد تولید و ترشح می‌شوند و پس از حذف سلول‌ها در مایع رویی باقی می‌مانند. این مواد شامل باکتریوسین‌ها، اسیدهای آلی، آنزیم‌ها، بیوسورفکتانت‌ها و سایر متابولیت‌هایی هستند که فعالیت ضد میکروبی از خود نشان می‌دهند. بسیاری از مطالعات نشان می‌دهند که ترکیبات ضد میکروبی موجود در CFS باکتریایی، مانند باکتریوسین‌ها یا پپتیدها، با هدف قرار دادن غشای سلولی باکتری‌های بیماری‌زا، اثر خود را اعمال می‌کنند. این امر باعث نفوذپذیری یا تضعیف غشا می‌شود و منجر به نشت محتویات درون سلولی مانند DNA/RNA، از دست دادن پتانسیل غشا و در نهایت مرگ سلولی می‌شود. به‌عنوان مثال، باکتریوسین Cys2-2 از *Weissella confusa* با

¹ Bactericide

² Human Gastric Adenocarcinoma Epithelial Cells

در ماهیت اثر است. با توجه به رشد بیشتر باکتری‌ها در غلظت 10^9 ، انتظار می‌رود متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها و سایر مواد مهار کننده در غلظت بالاتری در سوپ سلولی حضور داشته باشند، بنابراین سوپ سلولی 10^9 اثر ضد میکروبی قوی‌تری نسبت به 10^8 دارد. از نظر عملیاتی، تفاوت بین 10^8 و 10^9 ممکن است در عمل کوچک باشد، به‌ویژه اگر غلظت سوپ سلولی مورد استفاده بالا باشد (مثلاً 800 mg/mL)، اما اگر بخواهید از دوز پایین‌تری استفاده کنید، سوپ تهیه‌شده از 10^9 گزینه بهتری برای تضمین اثربخشی کامل است. براساس نتایج این پژوهش، با افزایش غلظت باکتری *B. bifidum* تا سطح 10^9 CFU/mL ، تولید متابولیت‌های ضد میکروبی مانند اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها افزایش یافته و در نتیجه، اثربخشی سوپ سلولی در مهار باکتری‌هایی مانند *V. cholerae* به‌طور قابل توجهی بیشتر می‌شود. با این حال، غلظت‌های بالاتر از 10^9 CFU/mL (مانند 10^{10} یا بیشتر) معمولاً تفاوت معناداری در میزان اثر مهار کننده ایجاد نمی‌کنند؛ چرا که سیستم به نقطه اشباع نزدیک شده و حتی ممکن است اثرات نامطلوبی مانند تجمع مواد زائد متابولیک یا تغییرات نامناسب pH پدیدار شود. از نظر عملی نیز تهیه چنین غلظت‌های بالایی دشوار و پرهزینه است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از غلظت اولیه 10^9 CFU/mL برای تولید سوپ سلولی می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد بهینه و قابل تعمیم جهت دستیابی به حداکثر فعالیت ضد میکروبی در برابر باکتری‌های پاتوژن مطرح شود. این رویکرد می‌تواند در طراحی محصولات بیولوژیک ضد میکروبی یا کاربردهای صنعتی و درمانی مورد توجه قرار گیرد. اگرچه نتایج این مطالعه شواهد قابل توجهی در خصوص رابطه دوز-پاسخ و اثربخشی سوپ سلولی *B. bifidum* در مهار رشد *V. cholerae* ارائه می‌دهد، پژوهش مذکور با محدودیت‌هایی نیز همراه بود:

۱. محدودیت شرایط آزمون: بررسی‌ها صرفاً *in vitro* و روی گونه استاندارد (*V. cholerae* (El Tor O1 ATCC 14035) انجام شد. تعمیم نتایج به سایر باکتری‌های بیماری‌زا یا شرایط *in vivo* نیازمند مطالعات تکمیلی است.

آسیب رساندن به یکپارچگی غشا، پاتوژن‌های هدف را از بین می‌برد (۲۱). به‌طور مشابه، *L. plantarum* CFS به غشاهای باکتریایی آسیب می‌رساند و باعث نشت DNA/RNA می‌شود (۲۲). برخی از پپتیدهای ضد میکروبی یا آنزیم‌های تولیدشده در CFS می‌توانند دیواره و غشای سلولی باکتری را لیز کنند و منجر به لیز و مرگ سلول شوند (۲۲). باکتری‌های اسیدلاکتیک و گونه‌های مشابه، اسیدهای آلی (مانند اسیدلاکتیک) را به داخل مایع رویی ترشح می‌کنند که pH را کاهش می‌دهد و محیطی اسیدی ایجاد می‌کند که رشد بسیاری از عوامل بیماری‌زا را مهار می‌کند. این اسیدی شدن همچنین فعالیت پپتیدهای ضد میکروبی را افزایش می‌دهد (۲۳). CSF های حاصل از پروبیوتیک‌ها این پتانسیل را نیز دارند که از شکل‌گیری و بلوغ بیوفیلم میکروبی نیز جلوگیری کنند. همان‌طور که در مطالعه‌ای نشان داده شد که اثر هم‌افزایی سوپ سلولی باکتری‌های پروبیوتیک *L. plantarum*، *L. acidophilus*، *L. johnsonii* و *L. delbrueckii* سبب کاهش ۴۰ تا ۸۰ درصدی بیوفیلم حاصل از ایزوله‌های *P. aeruginosa* 9027TM and 27853TM در شرایط آزمایشگاهی شد (۲۴).

در اکثر مطالعات از کشت شبانه باکتری هدف برای تهیه سوپ سلولی استفاده شده است که با توجه به نتیجه این مطالعه با بهینه‌سازی غلظت باکتری مورد مطالعه و اثر آنتی‌میکروبیال آن می‌توان به‌صورت مؤثرتری پاتوژن مورد مطالعه را حذف کرد. توجه به این نکته ضروری است که کشت شبانه (Overnight culture) معمولاً غلظت حدود 10^9 CFU/mL از باکتری تولید می‌کند، بنابراین برای تهیه سوپ سلولی با اثر آنتی‌میکروبیال قوی‌تر مناسب‌تر است. باین‌حال اگر زمان کشت خیلی زیاد شود (مثلاً بیش از ۱۸-۲۴ ساعت)، ممکن است باکتری‌ها بمیرند یا pH محیط به‌شدت اسیدی شود که می‌تواند اثر را تغییر دهد یا نتایج را دچار ابهام کند.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد، بین غلظت‌های 10^8 و 10^9 CFU/mL از نظر اثربخشی سوپ سلولی در مهار *V. cholerae* El Tor O1 تفاوت وجود دارد ($P \leq 0.05$)، اما این تفاوت معمولاً در میزان اثر (شدت) و نه

ملاحظات اخلاقی

پژوهش حاضر توسط کمیته اخلاق دانشگاه تربیت مدرس (IR.TMU.REC.1397.092) تأیید شده است.

کد اخلاقی

IR.TMU.REC.1397.092

تضاد منافع

نویسندگان اعلام می‌دارند که هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

حمایت مالی

پژوهش حاضر با حمایت مالی شورای پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس انجام شد.

سهم نویسندگان

مژگان درخشان سفیدی: آزمایش‌های عملی را انجام داد و نسخه خطی را تهیه کرد.
بی تا بخشی: نظارت و نهایی سازی پروژه تحقیقاتی را بر عهده داشتند.
همه نویسندگان نسخه نهایی را مطالعه و تأیید کردند.

۲. ضعف آماری در همبستگی: اگرچه کاهش pH و افزایش غلظت پروتئین با افزایش بار باکتریایی مشاهده شد، آزمون آماری همبستگی بین این متغیرها معنادار نبود که احتمالاً ناشی از محدودیت حجم نمونه است.

۳. کمی‌سازی ناکافی ترکیبات فعال: نوع و مقدار دقیق ترکیبات ضد میکروبی (مانند باکتریوسین‌ها یا اسیدهای آلی) در سوپ سلولی به صورت کمی اندازه‌گیری نشد و تحلیل‌های مولکولی برای شناسایی ترکیبات فعال انجام نگرفت.

۴. پایش ناکامل عوامل محیطی در بررسی پایداری: تأثیر pH نهایی یا سایر تغییرات محیطی در طول آزمایش پایداری به صورت دقیق پایش نشد. این عوامل ممکن است بر تفسیر اثر دما بر فعالیت ضد میکروبی تأثیرگذار باشند. به منظور درک دقیق‌تر مکانیسم اثر سوپ سلولی و پتانسیل کاربرد بالینی آن، انجام مطالعات آتی با استفاده از فنون پیشرفته‌تر (مانند HPLC یا LC-MS برای شناسایی و کمی‌سازی متابولیت‌های فعال) و نیز بررسی‌های *in vivo* (مانند مدل‌های حیوانی یا سلولی) پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدین‌وسیله از شورای پژوهشی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Lacey SW. Cholera: calamitous past, ominous future. *Clinical infectious diseases*. 1995;20(5):1409-19.
2. Ali M, Lopez AL, You YA, Kim YE, Sah B, Maskery B, et al. The global burden of cholera. *Bulletin of the World Health Organization*. 2012;90(3):209-1. ^۸
3. Shah MM, Bundi M, Kathiiko C, Guyo S, Galata A, Miringu G, et al. Antibiotic-Resistant *Vibrio cholerae* O1 and its SXT Elements Associated with two Cholera epidemics in Kenya in 2007 to and 2015 to 2016. *Microbiology Spectrum*. 2023;11(3):e04140. ^{۲۲-}
4. Bhandari M, Jennison AV, Rathnayake IU, Huygens F. Evolution,

- distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae*—a review. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021;89:104726.
5. Baral KC, Bajracharya R, Lee SH, Han H-K. Advancements in the pharmaceutical applications of probiotics: dosage forms and formulation technology. *International journal of nanomedicine*. 2021;7535-56.
 6. Merenstein D, Pot B, Leyer G, Ouwehand AC, Preidis GA, Elkins CA, et al. Emerging issues in probiotic safety: 2023 perspectives. *Gut microbes*. 2023;15(1):2185034.
 7. Fahim KM, Badr AN, Shehata MG, Hassanen EI, Ahmed LI. Innovative application of postbiotics, parabiotics and encapsulated *Lactobacillus plantarum* RM1 and *Lactobacillus paracasei* KC39 for detoxification of aflatoxin M1 in milk powder. *Journal of Dairy Research*. 2021;88(4):429-35.
 8. Derakhshan-Sefidi M, Bakhshi B, Rasekhi A. Vibriocidal efficacy of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* cell-free supernatants encapsulated in chitosan nanoparticles against multi-drug resistant *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *BMC Infectious Diseases*. 2024;24(1):905.
 9. Szydłowska A, Sionek B. Probiotics and postbiotics as the functional food components affecting the immune response. *Microorganisms*. 2022;11(1):104.
 10. Jeffrey MP, MacPherson CW, Mathieu O, Tompkins TA, Green-Johnson JM. Secretome-mediated interactions with intestinal epithelial cells: a role for Secretome components from *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in the attenuation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium secretome and TNF- α -induced proinflammatory responses. *The Journal of Immunology*. 2020;204(9):2523-34.
 11. M100. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2023.
 12. Samer A, Toumi R, Soufli I, Touil-Boukoffa C. Cell-free probiotic supernatant (CFS) treatment alleviates indomethacin-induced enterocolopathy in BALB/c mice by down-modulating inflammatory response and oxidative stress: potential alternative targeted treatment. *Inflammopharmacology*. 2022;30(5):1685-703.
 13. Harikrishnan S, Parivallal M, Alsalthi MS, Sudarshan S, Jayaraman N, Devanesan S, et al. Characterization of active lead molecules from *Lissocarinus orbicularis* with potential antimicrobial resistance inhibition

properties. *Journal of infection and public health*. 2021;14(12):1903-10.

14. Hove PR, Nealon NJ, Chan SHJ, Boyer SM, Haberecht HB, Ryan EP. Integrated profiling of gram-positive and gram-negative probiotic genomes, proteomes and metabolomes revealed small molecules with differential growth inhibition of antimicrobial-resistant pathogens. *Journal of dietary supplements*. 2023;20(5):788-810.

15. Tong Y, Guo Hn, Abbas Z, Zhang J, Wang J, Cheng Q, et al. Optimizing postbiotic production through solid-state fermentation with *Bacillus amyloliquefaciens* J and *Lactiplantibacillus plantarum* SN4 enhances antibacterial, antioxidant, and anti-inflammatory activities. *Frontiers in Microbiology*. 2023;14:1229952.

16. Drumond MM, Tapia-Costa AP, Neumann E, Nunes ÁC, Barbosa JW, Kassuha DE, et al. Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*: A novel biotic therapy. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;Volume 14 - 2023.

17. Lee H-J, Lee J-B, Park S-Y, Choi I-S, Lee S-W. Antimicrobial Activity of *Ligilactobacillus animalis* SWLA-1 and Its Cell-Free Supernatant against Multidrug-Resistant Bacteria and Its Potential Use as an

Alternative to Antimicrobial Agents. *Microorganisms*. 2023;11(1):182.

18. Evangelista AG, Corrêa JAF, dos Santos JVG, Matté EHC, Milek MM, Biauki GC, et al. Cell-free supernatants produced by lactic acid bacteria reduce *Salmonella* population in vitro. *Microbiology*. 2021;167.(11)

19. Do AD, Quang HP, Phan QK. Probiotic cell-free supernatant as effective antimicrobials against *Klebsiella pneumoniae* and reduce antibiotic resistance development. *International Microbiology*. 2025;28(4):623-32.

20. Sornsene P, Surachat K, Wong T, Kaewdech A, Saki M, Romyasmit C. Lyophilized cell-free supernatants of *Limosilactobacillus fermentum* T0701 exhibited antibacterial activity against *Helicobacter pylori*. *Scientific Reports*. 2024;14(1):13632.

21. Tenea GN, Lara MI. Antimicrobial compounds produced by *Weissella confusa* Cys2-2 strain inhibit Gram-negative bacteria growth. *CyTA - Journal of Food*. 2019;17(1):105-11.

22. Tenea GN, Guaña JM. Inhibitory Substances Produced by Native *Lactobacillus plantarum* UTNCys5-4 Control Microbial Population Growth in

Meat. Journal of Food Quality. 2019;2019(1):9516981.

23. Divyashree S, Anjali PG, Somashekaraiah R, Sreenivasa MY. Probiotic properties of Lactobacillus casei - MYSRD 108 and Lactobacillus plantarum- MYSRD 71 with potential antimicrobial activity against Salmonella paratyphi. Biotechnol Rep (Amst). 2021;32:e00672.

24. Drumond MM, Tapia-Costa AP, Neumann E, Nunes Á C, Barbosa JW, Kassuha DE, et al. Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against Pseudomonas aeruginosa: A novel biotic therapy. Front Pharmacol. 2023;14:1152588.

Optimization of the antimicrobial effect of *Bifidobacterium bifidum* cell free supernatant on *Vibrio cholerae* El Tor O1

Mozhgan Derakhshan sefidi¹, Bita Bakhshi^{1*}

1. Department of Bacteriology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received : 12/06/2025

ePublished: 20/06/2025

ABSTRACT:

Introduction: Cholera is a serious infectious disease caused by the bacterium *Vibrio cholerae*. The rising antibiotic resistance of this pathogen highlights the urgent need for alternative antimicrobial strategies. Postbiotics—bioactive compounds produced by probiotics—have gained increasing attention for their antimicrobial activity. This study aimed to evaluate and optimize the antimicrobial effects of cell-free supernatant derived from the probiotic *Bifidobacterium bifidum* (CFS_{BB}) against the standard strain *Vibrio cholerae* El Tor O1 ATCC 14,035.

Methods: In this in vitro experimental study conducted in 2024, an overnight culture of *Bifidobacterium bifidum* was grown in de Man, Rogosa, and Sharpe (MRS) broth at varying concentrations (10^4 to 10^9 colony-forming units per milliliter [CFU/mL]). After centrifugation and filtration to eliminate viable cells, the resulting supernatant was sterilized. The antimicrobial activity of the CFS_{BB} against *V. cholerae* was evaluated using the microbroth dilution method. Protein content in the CFS_{BB} was measured using the bicinchoninic acid (BCA) assay. Statistical analysis was performed using a significance level of $p < 0.05$.

Results: An increase in the initial concentration of *Bifidobacterium bifidum* led to a higher protein content in the CFS_{BB}. CFS_{BB} from cultures at 10^8 and especially 10^9 CFU/mL exhibited the strongest inhibitory effects on *V. cholerae* growth, with significant activity observed at concentrations between 400 and 800 mg/mL. As the initial *Bifidobacterium bifidum* concentration increased from 10^4 to 10^9 CFU/mL, the culture medium's pH dropped markedly from 6.3 to 4.3, indicating enhanced inhibitory potency. Correspondingly, the MIC decreased from over 800 to 400 mg/mL, and the overall inhibitory effect intensified from “low” to “strong.” The effectiveness of CFS_{BB} was highly dependent on both the initial bacterial concentration and storage temperature, with the greatest inhibition observed at higher concentrations (10^8 – 10^9 CFU/mL) and under cold storage (4 °C), particularly within the first 7 days.

Conclusion: CFS_{BB} demonstrates significant antibacterial activity against *Vibrio cholerae* El Tor O1, CFU/mL which increases with higher bacterial densities and greater production of antimicrobial metabolites. A starting concentration of 10^9 CFU/mL is recommended as optimal for preparing effective CFS_{BB}. These findings support further development of postbiotics as effective and safe alternatives to traditional antibiotics, especially against antibiotic-resistant pathogens.

Keyword: *Bifidobacterium bifidum*, *Vibrio cholerae*, cell-free supernatant, Anti-Bacterial Agents

*Corresponding Author: Bita Bakhshi, e-mail: b.bakhshi@modares.ac.ir

CITATION: Derakhshan-sefidi, M., Bakhshi, B. Optimization of the antimicrobial effect of *Bifidobacterium bifidum* cell free supernatant on *V. cholerae* El Tor O1. Saveh University of Medical Sciences Journal, 2025; 1(1): 54-67. doi: [10.22034/jsavehums.2025.226087](https://doi.org/10.22034/jsavehums.2025.226087)