

مطالعه تاثیر برخی پروبیوتیک‌ها بر روی اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در شرایط رشد توامان در شیر

حمید میرزایی^{۱*} محمد رضا نهایی^۲ افشین جوادی^۱ مهدی احمدی منش^۳

۱) گروه بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

۲) گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز - ایران.

۳) دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز - ایران.

(دریافت مقاله: ۲۹ بهمن ماه ۱۳۸۶، پذیرش نهایی: ۲۱ تیرماه ۱۳۸۷)

چکیده

در دودهم گذشته استفاده از پروبیوتیک‌ها در مهار باکتری‌های بیماری‌زا اهمیت بسیاری پیدا کرد. در این مطالعه تاثیر پروبیوتیک‌های بیفیدو و باکتریوم آنگولاتوم، بیفیدو و باکتریوم بیفیدوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازنی بر سرعت رشد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در شرایط رشد توامان در شیر مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا به داخل ۵۰۰ میلی لیتر شیر استریل ۱۰^۸ CFU/ml باکتری اشریشیاکلی اضافه و بعد از همگن سازی در ۵ ارلن مایر استریل به طور مساوی توزیع شد. ارلن اول به عنوان کشت انفرادی لحاظ گردید و به ارلن‌های دوم تا پنجم به ترتیب ۱۰^۸ CFU/ml از باکتری‌های پروبیوتیک فوق تریق و بعد از ۲۴ و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، pH و تعداد اشریشیاکلی موجود در هر میلی لیتر از آنها به ترتیب با استفاده از pH متر و کشت مخلوط در محیط ویولت رد بایل آگار (VRBA) اندازه‌گیری شد. این عملیات ۱۰ بار تکرار و میانگین pH و تعداد اشریشیاکلی موجود در هر میلی لیتر از کشت انفرادی و کشت‌های توامان با پروبیوتیک‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس نتایج حاصله رشد توامان هر کدام از پروبیوتیک‌ها در طول ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری بطور معنی‌دار رشد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ را مهار نمود (p < ۰/۰۱). pH نمونه شیر حاوی کشت E.coli + L. casei بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری از pH نمونه شیر حاوی E.coli بطور معنی‌دار کمتر بود (p < ۰/۰۱). در مجموع نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که مصرف طولانی مدت محصولات حاوی اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در جلودگی از بروز عفونت با اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ و درمان آن مفید واقع شود.

واژه‌های کلیدی: اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇، پروبیوتیک، رشد توامان، شیر.

خون و ... را به پروبیوتیک‌ها نسبت داده‌اند (۱۰۲، ۴، ۵، ۱۵، ۱۸).

جنس اشریشیا (Escherichia) حداقل متشکل از ۶ گونه می‌باشد که در این میان اشریشیاکلی گونه‌ای است که بیشترین اهمیت را دارا می‌باشد. این جنس شامل ۵ تیپ بیمارزا می‌باشد که هر کدام از این‌ها علائم بالینی خاصی را سبب می‌شوند و در سال‌های اخیر وقوع شدید کولیت خونریزی دهنده با سویه‌ای از این باکتری بنام O₁₅₇:H₇ همراه بوده است که عامل اسهال خونی و شایع‌ترین عامل سندرم (Haemolytic Uremic Syndrome) می‌باشد (۷، ۹، ۱۹). در این مطالعه تاثیر ۴ باکتری پروبیوتیک شامل بیفیدو باکتریوم آنگولاتوم (*Bifidobacterium angulatum*)، بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (*Bifidobacterium bifidum*)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (*Lactobacillus acidophilus*) و لاکتوباسیلوس کازنی (*Lactobacillus casei*) بر سرعت رشد و تکثیر اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در محیط شیر در طول ۲۴ تا ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد (دمای بدن انسان) مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

لاکتوز برات (Lactose broth)، محیط آب پپتونه (Peptone water)، محیط MRS آگار (Man-Rogosa-Sharp)، محیط آگار مغذی (Agar Nutrient)، محیط ویولت رد بایل آگار (Violet Red Bile Agar)، ساخت کارخانه مرک) سویه‌های بیفیدو باکتریوم آنگولاتوم ۱۳۴۶.PTCC،

مقدمه

پروبیوتیک (Probiotic) واژه‌ای است یونانی و به معنای «برای زندگی» می‌باشد. Fuller در سال ۱۹۸۹ پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان «مکمل غذایی حاوی میکروب‌های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده اثرات مفید در بدن میزبان ایجاد می‌نماید تعریف نمود که در این تعریف اثرات مفید پروبیوتیک‌ها فقط از طریق میکروفلور روده شناخته شده است. Salminen و همکاران در سال ۱۹۹۹ پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان «فراورده‌هایی از سلول‌های میکروبی یا اجزایی از سلول‌های میکروبی که اثر مفیدی روی سلامت و آسایش انسان دارند» تعریف نموده‌اند. براساس این تعریف پروبیوتیک‌ها محدود به میکروب‌های زنده نبوده و اشکال غیر زنده آن‌ها نیز روی سلامت انسان تاثیر می‌گذارند (۱۰، ۱۶، ۱۸).

بر اساس مطالعات متعددی که بصورت آزمایشگاهی (In vitro) و روی موجودات زنده (In vivo) اعم از جمعیت‌های انسانی و نیز حیوانات مختلف آزمایشگاهی صورت گرفته، خواص بسیار ارزشی از قبیل مقاومت در مقابل پاتوژن‌های روده‌ای، درمان و پیشگیری اسهال‌های ویروسی و باکتریایی، اثر مهار روی سرطان کولون، اثر پیشگیری روی سرطان مثانه، تقویت سیستم ایمنی، مهار رشد باکتری‌های روده باریک، درمان عفونت‌های مجاری ادراری - تناسلی، درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط هلیکوباکتر پیلوری (*Helicobacter pylori*)، بهبود عدم تحمل لاکتوز، کاهش کلسترول



جدول ۱- میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد تعداد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در کشت های تحت مطالعه (CFU/ml). خطای استاندارد: SE، انحراف معیار: SD، میانگین: Mean، تعداد تکرار آزمایش: N. a و b: در هر ستون تفاوت بین میانگین های فاقد حروف مشترک معنی دار و تفاوت بین میانگین های دارای حروف مشترک غیر معنی دار می باشد.

نوع کشت	تعداد اشریشیاکلی بر حسب CFU/ml							
	بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری				بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری			
	N	Mean	SD	SE	N	Mean	SD	SE
<i>E. coli</i>	۱۰	۳۶/۹۷×۱۰ ^۶	۴/۳×۱۰ ^۶	۱/۷۸×۱۰ ^۶	۱۰	۱۱۶×۱۰ ^۸	۹/۵×۱۰ ^۸	۳/۸۶×۱۰ ^۸
<i>E. coli + B. angulatum</i>	۱۰	۳۱/۴×۱۰ ^۶	۳/۱×۱۰ ^۶	۱/۳×۱۰ ^۶	۱۰	۱۴×۱۰ ^۸	۱/۸×۱۰ ^۸	۰/۸۱×۱۰ ^۸
<i>E. coli + B. bifidum</i>	۱۰	۴۶/۷×۱۰ ^۶	۴/۳×۱۰ ^۶	۱/۷×۱۰ ^۶	۱۰	۵/۸۳×۱۰ ^۸	۰/۶۸×۱۰ ^۸	۰/۲۸×۱۰ ^۸
<i>E. coli + L. acidophilus</i>	۱۰	۲۱/۶۷×۱۰ ^۶	۳/۲۱×۱۰ ^۶	۱/۳×۱۰ ^۶	۱۰	۸/۵×۱۰ ^۸	۰/۸۷×۱۰ ^۸	۰/۳۵×۱۰ ^۸
<i>E. coli + L. casei</i>	۱۰	۷۰/۶۶×۱۰ ^۶	۱۳/۳×۱۰ ^۶	۵/۴۶×۱۰ ^۶	۱۰	۲/۱۷×۱۰ ^۸	۰/۳۹×۱۰ ^۸	۰/۱۶×۱۰ ^۸

One Way Analysis) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مقایسه شد و جهت محاسبه میزان اثر مهارى هر کدام از پروبیوتیک های فوق بر رشد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ از فرمول زیر استفاده گردید:

تعداد اشریشیاکلی در کشت توأمان - تعداد اشریشیاکلی در کشت انفرادی

۱۰۰ - درصد مهار شد اشریشیاکلی

تعداد اشریشیاکلی در کشت انفرادی

نتایج

نتایج مربوط به تاثیر هر یک از پروبیوتیک های مذکور بر تعداد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ و pH محیط شیر در شرایط رشد توأمان در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

بحث

همانطور که در جدول (۱) مشاهده می شود میانگین تعداد سلول های زنده اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در نمونه های شیر حاوی کشت های *E. coli*، *E. coli + L. acidophilus*، *E. coli + B. bifidum*، *E. coli + B. angulatum* و *E. coli + L. casei* بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری به ترتیب برابر $36/97 \times 10^6$ ، $31/4 \times 10^6$ ، $46/7 \times 10^6$ ، $21/67 \times 10^6$ و $70/66 \times 10^6$ و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری به ترتیب برابر 116×10^8 ، 14×10^8 ، $5/83 \times 10^8$ ، $8/5 \times 10^8$ و $2/17 \times 10^8$ CFU/ml و تجزیه و تحلیل آماری این نتایج حکایت از آن دارد که رشد توأمان بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی در طول مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری بطور معنی دار رشد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ را مهار می کنند ($p < 0/01$). از طرف دیگر بر اساس اطلاعات مندرج در جدول (۲) pH نمونه های شیر حاوی کشت های فوق الذکر بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری به ترتیب برابر $5/088 \pm 0/088$ ، $5/088 \pm 0/088$ ، $5/088 \pm 0/088$ و $5/088 \pm 0/088$ و بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری به ترتیب برابر $4/828 \pm 0/039$ ، $4/891 \pm 0/039$ ، $4/891 \pm 0/039$ و $4/891 \pm 0/039$ و برآورد گردید که بر اساس تجزیه و تحلیل آماری این نتایج، pH

بیفیدوباکتریوم بیفیدوم PTCC=۱۶۴۴، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC=۱۶۴۳ از کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و عفونی ایران وابسته به سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران و مایه لاکتیک حاوی سویه لاکتوباسیلوس کازئی ۰۱ ساخت کارخانه Hansen CHR از کارخانه شیر پاک تهران و سویه اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیه گردید.

جهت فعال سازی باکتری ها طبق پیشنهاد مرکز تولید کننده، سویه های پروبیوتیک لیوفیلیزه در ارلن مایر های حاوی ۱۰۰ میلی لیتر آب پیتونه و سویه اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی لیتر لاکتوز براث تلقیح شده و محیط های حاصله به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و سپس جهت تشکیل پرگنه از محتویات ۱۴ ارلن حاوی پروبیوتیک های فعال شده در ۴ پلیت حاوی MRS آگار در شرایط بی هوازی و از محتویات ارلن حاوی باکتری اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ فعال شده در پلیت حاوی محیط آگار مغذی در شرایط هوازی بصورت سطحی (plate method) Surface کشت و به مدت ۴۸ - ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند. سپس حدود $1/5 \times 10^8$ CFU/ml از اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ در ۵۰۰ میلی لیتر از نمونه شیر استریل تلقیح شده و بعد از حدود ۱۵ دقیقه همگن سازی در ۵ ارلن مایر استریل بطور مساوی توزیع گردید. ارلن اول بعنوان کنترل بوده و به ارلن های دوم تا پنجم به ترتیب حدود $1/5 \times 10^8$ CFU/ml از پروبیوتیک های فوق الذکر تزریق گردید و ارلن های حاصله به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری و pH نمونه ها با دستگاه pH سنج اندازه گیری شد. سپس از محتویات ۵ ارلن در ۲۴ ساعت اول بعد از گرمخانه گذاری تا 10^{-7} و در ۲۴ ساعت دوم تا 10^{-8} سریال رقت تهیه گردید و از رقت های 10^{-5} تا 10^{-7} در ۲۴ ساعت اول و از رقت های 10^{-6} تا 10^{-8} در ۲۴ ساعت دوم بعد از گرمخانه گذاری در محیط VRBA به روش مخلوط (Pour plate method) کشت داده شد. و از پلیت های حاوی ۳۰۰-۳۰ عدد پرگنه جهت شمارش پرگنه ها و محاسبه تعداد اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ موجود در هر میلی لیتر از محتویات آن ها استفاده گردید و میانگین pH و تعداد اشریشیاکلی موجود در هر میلی لیتر از محتویات کشت های فوق با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس یک طرفه (of Variance)



جدول ۲- میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد pH در کشت‌های تحت مطالعه. خطای استاندارد: SE، انحراف معیار: SD، میانگین: Mean، تعداد تکرار آزمایش: a, b, c, N. در هر ستون تفاوت بین میانگین‌های فاقد حروف مشترک معنی دار و تفاوت بین میانگین‌های دارای حروف مشترک غیر معنی دار می‌باشد.

نوع کشت	بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری				بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری			
	N	Mean	SD	SE	N	Mean	SD	SE
<i>E. coli</i>	۱۰	۵/۰۱۵	۰/۰۸۸ ^a	۰/۰۳۶	۱۰	۴/۸۷۷ ^a	۰/۰۸۸	۰/۰۳۶
<i>E. coli + B. angulatum</i>	۱۰	۵/۰۰۶	۰/۰۸۸ ^a	۰/۰۳۹	۱۰	۴/۸۸۶ ^{ab}	۰/۱۲۶	۰/۰۵۶
<i>E. coli + B. bifidum</i>	۱۰	۴/۹۰۰	۰/۱۲۷ ^a	۰/۰۵۲	۱۰	۴/۵۵۲ ^{abc}	۰/۳۰۲	۰/۱۲۳
<i>E. coli + L. acidophilus</i>	۱۰	۴/۸۹۱	۰/۱۱۹ ^a	۰/۰۴۹	۱۰	۴/۵۹ ^{abc}	۰/۳۲۶	۰/۱۲۳
<i>E. coli + L. casei</i>	۱۰	۴/۸۳۸	۰/۰۳۹ ^b	۰/۰۱۶	۱۰	۴/۳۴۵ ^c	۰/۱۱۶	۰/۰۴۷

Saarela همچنین گزارش نمود که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مواد غیر باکتریوسینی (ناشناخته و متفاوت با اسید لاکتیک) تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی به طور گسترده مانع از رشد پاتوژن‌های گرم مثبت و منفی مانند استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوز، سالمونلا تیفی موریوم، شیگلا فلکسنری، کلبسیلا پنومونیا، سودوموناس آئرو جینوزا و آنتروباکتریاسه می‌شود (۲۰). Michetti و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کرده اند که رشد توامان سویه LA1 لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مدت ۴۸ ساعت میزان رشد هلیکوباکتر پیلوری را در حدود 10^3 CFU/ml کاهش می‌دهد (۱۵).

Holzap و همکاران در سال ۲۰۰۱ مطرح کردند که هر چند سویه‌های پروبیوتیکی قادر به تولید باکتریوسین هستند، ولی نقش آن‌ها در مهار رشد عوامل بیماری‌زاد بدن موجود زنده محدود خواهد بود زیرا باکتریوسین‌های این باکتری هافقط بر روی سویه‌های بسیار نزدیک اثر مهاری دارند (۸).

Bielecka و همکاران در سال ۱۹۹۹ گزارش کردند که رشد توامان بیفیدوباکتریوم‌ها بسته به سویه مربوطه ۴۳/۷ تا ۱۰۰ درصد رشد سالمونلا آنتریتیدیس را مهار می‌کنند. آن‌ها ضمن مطالعه مکانیسم این اثر مهاری به این نتیجه رسیدند که شاید متابولیت‌هایی با وزن مولکولی پایین (پراکسید هیدروژن، اسید لاکتیک، اسید استیک و سایر مواد معطر) و متابولیت‌های ثانویه اهمیت بیشتری داشته باشند زیرا دامنه عملکرد آن‌ها علیه باکتری‌های مضر (مانند سالمونلا، اشریشیا کلی، کلاستریدوم و هلیکوباکتر) گسترده می‌باشد (۳).

Lee و همکاران در سال ۲۰۰۳ طی تحقیقی که بصورت آزمایشگاهی انجام دادند دریافتند که لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا در رقابت با باکتری‌های دستگاه گوارش در حدود ۴۶ درصد مانع از اتصال به سطح سلول‌های Caco-2 می‌شوند. در این تحقیق مشخص گردید که بیشترین میزان مهار لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا (بالای ۳۰ درصد) روی اشریشیا کلی TGI، سالمونلا تیفی موریوم E10، اشریشیا کلی ATCC ۱۷۷۵ و سالمونلا تیفی موریوم ATCC ۱۴۰۲۸ می‌باشد (۱۱).

Laura در سال ۲۰۰۳ مکانیسم‌های مربوط به اثر مهاری لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکترها بر روی باکتری‌های بیماری‌زا را کاهش pH محیط روده بوسیله تولید اسیدهای چرب فرار یا زنجیره کوتاه، مصرف مواد مغذی و مورد نیاز باکتری‌های بیماری‌زا و تولید ترکیبات ضد میکروبی خاص مانند باکتریوسین‌ها معرفی کرده است (۱۰).

نمونه شیر حاوی کشت *E. coli + L. casei* بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری بطور معنی دار از pH نمونه شیر حاوی *E. coli* کمتر می‌باشد ($p < 0.01$). لذا تولید اسید و کاهش pH توسط لاکتوباسیلوس کازئی می‌تواند یکی از عوامل موثر بر اثر مهاری آن بر سرعت رشد اشریشیا کلی مطرح شود در صورتی که بر اساس نتایج جدول (۲) این عامل در خصوص سایر پروبیوتیک‌های فوق‌الذکر صدق نمی‌کند. Lindgren و Dobrogosz در سال ۱۹۹۰، Meghrous و همکاران در سال ۱۹۹۴ و Ramboud و همکاران در سال ۱۹۹۴ فاکتورهای دیگر از جمله رقابت بر سر مواد مغذی، تغییر خاصیت اکسیداسیون و احیا محیط، تولید موادی مانند آب اکسیژنه، دی استیل، ترکیبات مهاری شبیه باکتریوسین تولید شده توسط بر اثر مهاری پروبیوتیک‌ها روی رشد باکتری‌های بیماری‌زا موثر گزارش کردند (۱۳).

Lefteris و همکاران در سال ۲۰۰۶ طی یک تحقیق آزمایشگاهی اثر مهاری چند سویه بیفیدوباکتریوم را بر روی باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی مورد مطالعه قرار دادند. بر اساس نتایج این تحقیق بیفیدوباکتریوم لانگوم BB546 در محیط با pH=۴/۵ در مدت ۱۸ ساعت تعداد سلول‌های زنده اشریشیا کلی C1845 را در حدود $2.67 \pm 0.30 \log CFU/ml$ کاهش داد در صورتی که این باکتری در شرایط مشابه ولی در محیط با pH=۶/۵ اثر معنی داری روی اشریشیا کلی C1845 از خود نشان نداد. از طرف دیگر بیفیدوباکتریوم لانگوم CA1 در محیط‌های با pH=۴/۵ و pH=۶/۵ در مدت ۱۸ ساعت اثرات مشابه فوق‌الذکر را بر روی سالمونلا آنتریکا سروتیپ تیفی موریوم SL1۴۴۴ از خود نشان داد. بر اساس گزارش این پژوهشگران عامل اصلی اثر مهاری بیفیدوباکتریوم‌ها بر روی سالمونلا آنتریکا سروتیپ تیفی موریوم SL1۴۴۴ و اشریشیا کلی C1845 تولید اسیدهای آلی و کاهش pH محیط کشت می‌باشد. آن‌ها تولید سایر ترکیبات ضد میکروبی را رد نکردند ولی تاکید کردند که تاثیر این مواد در مهار پاتوژن‌های گرم منفی ناچیز می‌باشد (۱۲).

Saarela در سال ۲۰۰۰ گزارش کرده است که کشت توامان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس باعث کاهش عمر استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسنری، اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیا، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئرو جینوزا و سویه‌های آنتروباکتریاسه در محیط کشت می‌شود. مواد ضد میکروبی با وزن مولکولی پایین ناشناخته که مستقل از تولید اسید لاکتیک هستند اثری بر روی سویه‌های لاکتوباسیلوس یا بیفیدوباکتریوم ندارد. فعالیت ضد میکروبی این باکتری علیه سالمونلا تیفی موریوم در موش آلوده نیز نشان داده شده است (۲۰).



References

- Aloja, B., Radomira, N., Dagma, M., Peterv, G. (2002) The possibilities of potentiating the efficacy of probiotics. Trends Food Sci. Tech. 13: 121- 126.
- Aso, Y., Akaza, H., BLP study group. (1992) prophylactic effects of *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Urol. Int. 49: 1125- 1129.
- Bielecka, M., Biedrzycka, E., Biedrzycka, E., Smoragiewicz, W., Smieszek, M. (1998) Interaction of Bifidobacterium and salmonella during associated growth. Int. J. Food Microbiol. 45:151-155.
- Chapman, M. H., Sanderson, I.R. (2003) Intestinal flora and the mucosal immune system. Ann. Inst. Pasteur. Mic. 61: 55- 65.
- Coconnier, M. H., Lirvin, V., Hemery, E., Servin, A. L. (1998) Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4573-4580.
- Gruewald, K. K. (1982) Serum cholesterol levels in rats fed skim fermented by lactobacillus. J. Food Sci. 47: 2078-2079.
- Hassani-Tabatabayi, A., Firouzi, R. (2001) Disease of animals due to bacteria. (3rd ed.) Tehran University Press. Tehran, Iran.
- Holzappel, WH., Haberer, P., Geisen, R., Bjorokroth, J., Schillinger, U. (2001) Taxonomy and importance features of probiotic microorganisms in food nutrition. Am. J. Clin. Nutr. 73: 365 - 373.
- James, M.J. (1998) Modern Food Microbiology. Translated in persian (Mortazavi Ali and et al.) (1st ed.) Vol.2. Ferdowsi University Press. Mashad, Iran.
- Laura, J. (2003) Mixed culture fermentation studies on the effects of symbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Food Microbiol. 9: 231-242.
- Lee, Y. K., Puong, K.Y., Ouwehand, A., Salminen, S. (2003) Displacement of bacterial pathogens from mucus on Caco- 2 cell surface by lactobacilli. J. Med. Microbiol. 52: 925-930.
- Lefteris, M., Luc, D.V. (2006) The in vivo inhibition Gram negative pathogenic bacteria by bifidobacteria Melanie و همکاران در سال ۲۰۰۴ طی یک تحقیق آزمایشگاهی اثر مهباری تعدادی از سویه های بیفیدوباکتریوم ها را بر روی اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ مورد مطالعه قرار دادند و گزارش کردند که عامل مهباری آن ها روی اشریشیاکلی ممانعت از اتصال اشریشیاکلی به سلول های Caco-2 تا حد بالاتر از ۵۰ درصد می باشد (۱۴). در مجموع نتایج این تحقیق نشان می دهد که اگر سلول های زنده بیفیدوباکتریوم های آنگولاتوم و بیفیدوم و لاکتوباسیلوس های اسیدوفیلوس و کازئی از طریق مصرف فرآورده های مناسب حاوی آن ها در دستگاه گوارشی انسان مستقر گردند می توانند در پیشگیری از بروز بیماری های ناشی از اشریشیاکلی O₁₅₇:H₇ و درمان آن ها مفید باشند. البته انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بخصوص در شرایط بدن موجودات زنده ضرورت دارد.
- is caused by the production of organic acid. Int. Dairy. J. 16: 1049-1057.
- Lindgren, S., Dobrogosz, W. J. (1990) Antagonistic Activities of lactic acid bacteria in food and fermentation. FEMS Microbiol. Lett. 87: 149-164.
- Melanie, G., Ehab, E.K., Gwenaelle, L.B. and Ismail, F. (2004) In vitro inhibition of *Escherichia coli*. O₁₅₇: H₇ by bifidobacterial strains of human origin. Int. J. Food Microbiol. 92 : 69 - 78.
- Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Brassart, D., et al. (1999) Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus* (johnsoni) La₁ on *Helicobacter pylori* infection in humans. Digestion. 60: 203 - 209.
- Mirzaei, H. (2004) Probiotics and Introduction to their Role in Human Health. (3rd ed.) Islamic Azad University Press. Tabriz, Iran.
- Ong, L., Herikson, A., Shah, N. (2006) Development of probiotic cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. Int. Dairy. J. 16: 446- 456.
- Ouwehand, A.C Salminens, S., Isolavri, E. (2002) probiotics: an overview of beneficial effects. A. Van. Leeuv. J. Microb. 82: 279 - 289.
- Razavilar, V. (2002) Pathogenic Microorganisms in Food and Epidemiology of Foodborne Intoxications. (2nd ed.) Tehran University Press. Tehran, Iran.
- Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J., Mattila - Sandholm, T. (2000) Probiotic bacteria safety, functional and technological Properties. J. Biotechnol. 84: 197-515.



EFFECT OF SOME PROBIOTICS ON *ESCHERICHIA COLI* O₁₅₇:H₇ DURING ASSOCIATED GROWTH IN MILK

Mirzaei, H.^{1*}, Nahaei, M. R.², Javadi, A.¹, Ahmadi-Manesh, M.³

¹Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz-Iran.

²Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz-Iran.

³Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz-Iran.

(Received 18 February 2007 , Accepted 22 July 2008)

Abstract:

In the past two decade, the application of probiotics to the inhibition of pathogenic or microorganisms has recieved much interest. The aim of the present was to study the effect of *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on *Escherichia coli* O₁₅₇:H₇ was evaluated during associated growth in milk. At first a quantity of 1.5×10^8 *E. coli* O₁₅₇:H₇ was inoculated to 500 ml of sterilized milk, homogenized and distributed equally in five erlene meyers. The first erlene meyer was considered as the control one and into the second, third, fourth and fifth a quantity of 1.5×10^8 of the above probiotics were inoculated, respectively. after 24 and 48 hours of incubation at 37 °C, pH and the number of *E. coli* per ml of them were determined using pH meter and pour plate method in VRBA medium. This procedure was repeated 10 times and the mean of pH and number of *E. coli* per ml of the Control and probiotic treatments was compared by one way ANOVA Results showed that associated growth of mentioned probiotics significantly ($p < 0.01$) inhibited the growth rate of *E. coli* O₁₅₇:H₇ during 48 hours incubation. The pH of sample containing *E. coli* + *L. Casei* was lower than the control after 48 hours incubation ($p < 0.01$). It can be concluded that the consumption of products containing mentioned probiotics could have beneficial effects on prevention and treatment of *E. coli* O₁₅₇:H₇ contamination.

Key words: *E. coli* O₁₅₇:H₇, probiotics, associated growth, milk.

*Corresponding author's email: h-mirzaii@iau.ac.ir, Tel: 0411-6373935, Fax: 0411-6372274

