

مجله علمی - پژوهشی زیست فناوری میکروبی دانشگاه آزاد اسلامی
تابستان 1390، دوره سوم، شماره نهم، صفحه 34-29

بررسی فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس بر چندین باکتری بیماری زای خانواده ی انتروباکتریاسه

لیلا شیرازی¹، مهدی رهنما¹، محمد مهدی سلطان دلال²

1- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد زنجان، گروه میکروبیولوژی، زنجان، ایران
2- دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، گروه پاتوبیولوژی، تهران، ایران
نویسنده مسؤول: دکتر محمد مهدی سلطان دلال. دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده بهداشت، بخش میکروب شناسی، گروه پاتوبیولوژی، تهران، ایران. soltanirad34@yahoo.com

دریافت: 90/4/16 پذیرش: 90/6/31

چکیده

زمینه و هدف: درمان با واسطه میکروبی امری در حال توسعه است، که در آن پروبیوتیک ها به خصوص باکتری های لاکتیک اسید نقش اساسی دارند. در این مطالعه سعی شده تا خواص ضد میکروبی پروبیوتیک ها بر روی تعدادی از پاتوژن های شایع دستگاه گوارش بررسی شود.

روش بررسی: در این مطالعه دو سویه لاکتوباسیلوس، متعلق به گونه های استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (ATCC 4356) و لاکتوباسیلوس روتری (ATCC 23272) برای بررسی اثرات ضد میکروبی علیه سه سویه ی پاتوژن دستگاه گوارش، شامل شیگلا سونئی (ATCC 9290)، سالمونلا انتریکا (BAA-708) و اشریشیاکلی (ATCC 25922) استفاده شد و تست Agar Spot برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک هابه کار رفت. در این روش 2 میکرو لیتر از سویه ی پروبیوتیک مورد نظر بر روی کشت پور پلیت سویه ی پاتوژن قرار داده شده و پس از 24 ساعت هاله ی عدم رشد اندازه گیری شد. به منظور کاهش خطا هر آزمون 3 بار تکرار شده و میانگین قطر هاله ی عدم رشد، توسط دو پروبیوتیک مقایسه گردید.

یافته ها: نتایج توصیف کننده ی اثرات ضد میکروبی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری بود. در هر دو سویه ی پروبیوتیک بیشترین اثر مهارتی علیه شیگلا سونئی ثبت شد و اثر مهارتی آن ها علیه باکتری های سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی به ترتیب در ردیف دوم و سوم بودند.

نتیجه گیری: بررسی ها نشان می دهند که استفاده از لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جهت پیشگیری و درمان عفونت های دستگاه گوارش به عنوان راه کاری مهم و عملی، منطقی و قابل قبول است.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، پاتوژن های روده ای، درمان میکروبی

مقدمه

ساخته می شود و طیف عملکردی وسیعی علیه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی دارد(11)، تا جایی که این گستره شامل قارچ ها، مخمرها و پروتوزوا ها نیز می شود(12).

از سوی دیگر خانواده ی انتروباکتریاسه (Enterobacteriaceae) بزرگترین و نامتجانس ترین مجموعه ی باسیل های گرم منفی با اهمیت فوق العاده در پزشکی می باشند، و شامل ارگانیسم هایی هستند که در همه جا حاضر بوده و در تمام جهان در خاک، آب و سبزیجات یافت می شوند و به عنوان قسمتی از فلور روده ای نرمال در بیشتر حیوانات و هم چنین انسان ها محسوب می شوند(13).

این باکتری ها عامل بیماری های مختلفی در انسان بوده و 30-35 درصد کل باکتری می ها، بیش از 70 درصد عفونت های مجاری ادراری و بسیاری از عفونت های روده ای را به خود اختصاص داده اند. برخی از آن ها مانند گونه هایی از سالمونلا و شیگلا همیشه همراه با ایجاد بیماری بوده و برخی دیگر مانند اشریشیاکلی، کلبسیلا پنومونیه و پروتئوس میرابلیس به عنوان اعضای فلور طبیعی نرمال می باشند که می توانند عفونت های فرصت طلب ایجاد نمایند. گروه سوم نیز آن هایی هستند که به عنوان ارگانیسم های کومنسال بوده و تنها هنگامی بیماری زا می شوند که ژن های فاکتور بیماری زایی روی پلاسمید ها، باکتریوفازها یا جزایر پاتوژنیسیته را به دست آورند. به طور مثال اشریشیاکلی مرتبط با گاستروانتریت. باید توجه داشت همان طوری که آنتی بیوتیک های جدید به سرعت مطرح می شوند، ارگانیسم ها نیز می توانند مقاومت به آن ها را در خود توسعه دهند. این مقاومت می تواند روی پلاسمید های قابل انتقال کد شود و بین گونه ها، جنس ها و حتی خانواده های باکتری ها مبادله گردد (13).

بنابر آن چه که گفته شد، پرداختن به روابط عملکردی بین پروبیوتیک ها و باکتری های خانواده ی انتروباکتریاسه امری مهم و جالب به نظر می رسد. در این مطالعه، ما از دو باکتری لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان الگوی پروبیوتیکی استفاده کرده و به آنالیز قدرت عملکرد ضد میکروبی آن ها علیه سه باکتری از شایع ترین باکتری های پاتوژن دستگاه گوارش پرداخته ایم.

استفاده از پروبیوتیک ها برای افزایش سلامت و بهبود دستگاه گوارش افراد پیشنهادی دیرینه است(1و2)، ولی اختصاص دومین رتبه برای بیماری های حاد دستگاه گوارش در سراسر جهان نشان می دهد که این امر چندان مهم جلوه نکرده است(3). در سال های اخیر مطالعات انجام گرفته، تأیید کننده ی اثرات ضد پاتوژنی پروبیوتیک ها می باشد(4و5) و این در حالی است که درمان با واسطه ی میکروبی در حال توسعه بوده و باکتری های مفید در آن، به عنوان عوامل درمانی در اختلالات ایمنی و بیماری های عفونی ایفای نقش می کنند.

مشخصه ی مهم باکتری های پروبیوتیک شامل توانایی این باکتری ها برای سرکوب ازدیاد ارگانیسم های بیماری زا و قدرت بیماری زایی آن ها می باشد. باکتری های لاکتیک اسید (LAB) از قبیل *Lactobacillus spp.* فاکتورهای ضد میکروبی و باکتریوسین های متعددی تولید می کنند که شامل small heat-stable antibiotics، non-lanthonine با پپتیدهای فعال غشایی و پروتئین های درشت heat-labile است. در واقع این کمپلکس باکتریوسینی از یک یا چند بخش شیمیایی تشکیل شده است(6). به علت تولید فاکتورهای ضد میکروبی متعدد، پروبیوتیک ها به عنوان عوامل درمانی و پیش گیری کننده از بیماری های عفونی ایجاد شده با پاتوژن های دهانی، روده ای و ادراری-تناسلی مطرح شده اند(7). در این میان لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس جایگاه خاصی را به خود اختصاص داده اند. هر دو باکتری مذکور به ویژه لاکتوباسیلوس روتری، بیشترین گستردگی را از میان گونه های لاکتوباسیلوس، در حیوانات به خود اختصاص داده اند و این باکتری ها از معدود باکتری های لاکتوباسیلوس طبیعی موجود در روده ی انسان ها بوده و از این نظر دارای نقاط قوت و تفکر انگیز خاصی هستند(8و9).

در حال حاضر فعالیت وسیع ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری به عنوان مهمترین عامل دارای پتانسیل درمانی برای جلوگیری یا درمان عفونت ها مطرح است(10). یکی از ترکیبات ضد میکروبی تولید شده به وسیله ی لاکتوباسیلوس روتری، روترین می باشد که فاقد پپتید یا پروتئین مرکب بوده و در طی تخمیر گلسیرول تولید می گردد. در واقع روترین یک ترکیب (3-HPA)-hydroxypropionaldehyde- β مشتق شده از گلسیرول است که تحت شرایط بی هوازی

روش بررسی

برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس علیه یک دیگر نیز می توان از روش Agar Spot استفاده کرد. در این مرحله یکی از لاکتوباسیلوس ها را به غلظت 1×10^7 در 7 میلی لیتر محیط MRS که حاوی 2% glycerol , 0/7% agar بود، کشت داده و از Spot لاکتوباسیلوس دیگر روی آن انتقال یافت. سپس به مدت 18-24 ساعت در شرایط بی هوازی و در دمای 37°C انکوبه گردید. پس از 18-24 ساعت انکوباسیون، هاله ی اطراف Spot ها اندازه گیری شد.

هاله هایی با قطر 1 میلی متر و بیشتر، به عنوان نتایج مثبت ثبت گردید. در این بررسی هر آزمون سه بار تکرار شده و از میانگین سه آزمون برای ارزیابی نتایج استفاده شد (7). برای تفسیر نتایج نیز از آمار توصیفی استفاده گردید.

یافته ها

پس از سه بار تکرار هر آزمون، قطر هاله های ایجاد شده بر حسب میلی متر اندازه گیری شد. سپس میانگین داده ها برای هر سویه باکتری ثبت و با سویه های باکتری های دیگر مقایسه شدند (جدول 1).

نتایج نشان می دهند که پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای اثر مهارى بر روی باکتری های اشریشیاکلی، سالمونلا انتریکا و شیگلا سونئی می باشند (شکل 1).

با بررسی اثر خواص ضد میکروبی این دو لاکتوباسیل علیه یکدیگر، نتایج نشان دهنده ی عدم فعالیت آنتاگونیستی این دو پروبیوتیک بر ضد یکدیگر بود (جدول 2).

جدول 1. مقایسه ی اندازه ی هاله ی عدم رشد (بر حسب میلی متر) سویه های انتروپاتوژن مورد مطالعه به وسیله ی لاکتوباسیلوس ها

باکتری های مورد استفاده	شیگلا سونئی	سالمونلا انتریکا	اشریشیا کلی
لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	20/66mm	17/33mm	11/66mm
لاکتوباسیلوس روتری	18/33mm	13/66mm	9/66mm

سویه ی باکتری ها و محیط کشت آن ها: سه سویه ی شایع پاتوژن دستگاه گوارش شامل شیگلا سونئی ATCC 9290 ، سالمونلا انتریکا BAA-708 و اشریشیاکلی ATCC 25922 در این مطالعه به عنوان الگوی پاتوژنی استفاده شدند. سویه های مورد نظر از کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و بیماری زای ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شده و جهت احیاء بر روی محیط Brain Heart Infusion (BHI) کشت داده شده و به مدت 24 ساعت در شرایط هوازی و دمای 37°C انکوبه شدند. در مطالعه ی حاضر از دو سویه لاکتوباسیلوس متعلق به گونه های استاندارد لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس PTCC 1643 یا ATCC 4356 و لاکتوباسیلوس روتری PTCC 1655 یا ATCC 23272 که از کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی و بیماری زای ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شده بود استفاده گردید. سپس هر دو سویه بر روی محیط Man- (MRS) Rogosa-Sharpe کشت داده شده و به مدت 24-48 ساعت در دمای 37°C در شرایط بی هوازی انکوبه گردید.

روش مورد استفاده برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی پروبیوتیک ها تست Agar Spot برای تشخیص فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در مقابل یکدیگر و نیز علیه سویه های پاتوژن ذکر شده در این تحقیق، استفاده گردید، که طبق آن پس از کشت شبانه روزی لاکتوباسیلوس ها بر روی محیط MRS، کلنی های رشد کرده بر روی محیط با استفاده از PBS جمع آوری شده و $2\mu\text{L}$ از هر لاکتوباسیلوس به صورت Spot بر روی محیط BHI آگار حاوی 20mM گلوکوز تلقیح شده و به مدت 24 ساعت در دمای 37°C و شرایط بی هوازی انکوبه گردید. به کار بردن گلوکز در این مطالعه امری مهم بوده که جهت تولید باکتریوسین ها مورد استفاده قرار می گیرد.

پس از انکوباسیون، Spot ها به محیط حاوی 7mL soft agar که شامل (BHI, 2% glycerol, 0/7% agar) بوده و غلظت 1×10^6 از سویه ی پاتوژن مورد نظر با سوآپ سر پنبه استریل، به طور یکنواخت به آن تلقیح شده بود انتقال داده شد. سپس سویه ها به مدت 1 ساعت در شرایط بی هوازی و دمای 37°C انکوبه شده و ادامه ی انکوباسیون در شرایط هوازی و به مدت 18-24 ساعت در همان دما انجام یافت.

میکروبی و اثرات آنتاگونیستی با پاتوژن ها در اتصال به جایگاه ها و کلونیزاسیون در سطوح مخاطی روده است و به رقابت در کسب مواد غذایی و تکثیر در بین پروبیوتیک و پاتوژن می انجامد، فعالیت می کنند. در این بین آن چه واضح است، تعدیل سیستم ایمنی و سودمندی مجموعه ی پروبیوتیک ها بر سلامتی میزبان است (15).

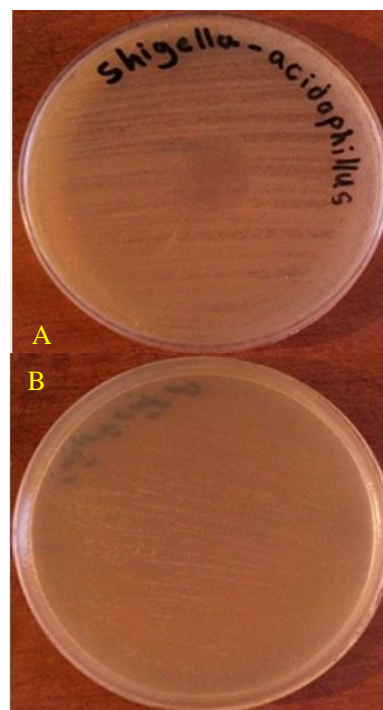
این مطالعه با هدف تعیین میزان اثر ضد میکروبی لاکتوباسیلوس روتری و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به عنوان الگوی پروبیوتیکی بر روی پاتوژن های شایع دستگاه گوارش انجام گرفته است. همچنین هدف دیگری که در این بررسی دنبال شده است، تعیین اثر آنتاگونیستی دو پروبیوتیک مذکور علیه یکدیگر می باشد. نتایج حاصل از مطالعه ی حاضر نشان می دهد که هر دو پروبیوتیک مورد مطالعه، اثر مہاری چشمگیری در رشد پاتوژن های مورد نظر دارند. و هیچ گونه هاله ی عدم رشدی حاصل از اثر آنتاگونیستی دو پروبیوتیک علیه یکدیگر مشاهده نمی شود. لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای اثر مہاری رشد بر شیگلا سونئی با هاله ی (20mm-22) بیشترین اثر را نشان می دهد. در حالی که قطر هاله ی ایجاد شده به وسیله ی لاکتوباسیلوس روتری بر ضد این باکتری (19-18mm) می باشد. هاله ایجاد شده علیه سالمونلا انتریکا توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (18-17mm) و به وسیله لاکتوباسیلوس روتری (14-12mm) می باشد. در نهایت لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس هاله ای با قطر (12-11mm) و لاکتوباسیلوس روتری هاله ای با (10-8mm) علیه اشریشیاکلی ایجاد می کند. در نگاهی بر تاریخچه ی بررسی های انجام گرفته در این زمینه، نتایج به دست آمده توسط سایر همکاران، مؤید بررسی حاضر است. چنانچه در سال 1992، Apella و همکارانش در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی و لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از رشد شیگلا سونئی ممانعت می کنند (16). در سال 2001، Strus و همکارانش خاصیت ضد پاتوژنی سویه های لاکتوباسیلوس را علیه پاتوژن های بی هوازی دستگاه گوارش بررسی کرده و تأثیر مثبت آن ها را بر ضد این پاتوژن ها اثبات کردند (17). در مطالعه دیگری که، توسط Van Niel و همکارانش روی درمان اسهال نوزادان با استفاده از لاکتوباسیلوس ها انجام گرفت نتایج نشان دهنده ی بهبود این کودکان طی درمان پروبیوتیکی بود (18).

Reid و همکارانش در مطالعه ای که برای اثبات ممانعت لاکتوباسیلوس ها از ابتلا به عفونت های روده ای ناشی از

جدول 2. بررسی عدم هاله ی رشد دو پروبیوتیک علیه یکدیگر

هاله عدم رشد*	باکتری Spot	باکتری کشت زمینه
-	لاکتوباسیلوس روتری	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس
-	لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس	لاکتوباسیلوس روتری

*- نشان دهنده ی عدم تشکیل هاله ی رشد است.



شکل 1. ایجاد هاله ی عدم رشد در شیگلا سونئی توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس (شکل A) و عدم وجود هاله ناشی از اثر آنتاگونیستی دو پروبیوتیک (شکل B).

بحث

برطبق گزارش FAO/WHO باکتری های لاکتیک اسید (LAB) به طور طبیعی ساکن لوله گوارشی انسان می باشند و همچنین دارای تاریخچه ی طولانی در فرآورده های تخمیری هستند. علت مطرح بودن این باکتری ها اثرات مثبت آن ها در روند سلامتی افراد می باشد (14). ممانعت از فعالیت پاتوژن ها توسط پروبیوتیک ها می تواند تأثیر مهمی در سلامتی فرد در مقابل عفونت با پاتوژن های شایع دستگاه گوارش باشد. در واقع امروزه پروبیوتیک ها به عنوان عوامل مدیریتی عفونت های روده ای شناخته شده اند که با مکانیسم های متعددی که اساساً شامل ترشح مواد ضد

علیه یکدیگر در کشت همزمان نداشته و در واقع دارای اثر آنتاگونیستی علیه یکدیگر نمی باشند.

نتیجه گیری

با توجه به نتایجی که از این بررسی به دست می دهد می توان ادعا نمود که استفاده از باکتری های لاکتیک اسید از جمله لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس روتری که جزئی از خانواده ی پروبیوتیک ها مطرح هستند دارای اثر درمانی و پیشگیری کننده در عفونت های روده ای می باشند. هر چند که وسعت بخشیدن به طیف ضد میکروبی پروبیوتیک ها مستلزم تحقیقات و بررسی های بیشتری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله لازم می دانند از سرکار خانم ترانه پیمانہ ابدی محتسب، آقایان محمد حسین یزدی و امیر علی رضانی به خاطر زحماتشان در انجام مراحل مختلف این مقاله، تشکر و قدردانی نمایند.

References

1. Sanders ME., Medivite RW. *Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health.* Journal of Nutrition 2000; 130: 384-390.
2. Reid G. & Burton J. *Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria.* Microbes and Infection 2002; 4: 319-324.
3. Preliminary Foodnet data on the incidence of food borne illness-selected sites United States, 2002. MMWR More Mortal Wkly rep, 2003; P52: 340.
4. Saavedra J. *Probiotics and infectious diarrhea.* American Journal of Gastroenterology. 2000; 95: 16-18.
5. Elmer GV. *Probiotics: 'Living Drugs'.* American Journal of Health-system Pharmacy. 2001; 58: 1101-1109.
6. Servin AL. *Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens.* FEMS Microbiol Rev. 2004; 28: 405-440.
7. 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: 166-171.
8. Casas IA., Dobrogosz WJ. *Validation of the probiotic concept: Lactobacillus reuteri confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals.* Microb Ecol Health Dis. 2000; 12: 257-285.
9. Kailasapathy K. & Chin J. *Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium spp.* Immunology and Cell Biology. 2000; 78: 80-88.

پاتوژن ها انجام دادند، نتایج نشان دهنده ی تأثیر مثبت پروبیوتیک ها علیه پاتوژن های روده ای بود (19). همچنین فعالیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس برویس توسط Ogunbanw و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. آن ها با استفاده از روش چاهک نشان دادند که این دو پروبیوتیک از رشد اشریشیاکلی (8-6mm)، باسیلوس سرئوس (10-8mm) و یرسینیا انتروکلی تیکا (7-6mm) جلوگیری می کنند(20). در گزارشات حاصل از بررسی های Servin و Coconnier نیز بیان شده است که پروبیوتیک ها با تولید متابولیت هایی از قبیل اسید استیک و اسید لاکتیک که سبب تغییر در pH می شوند و با تولید مواد خارج سلولی و قابل انتشار و مکانیسم های دیگر از جمله ممانعت از چسبندگی و اتصال و تهاجم به سلول های اپی تلیال به وسیله ی پاتوژن ها از رشد و بیماری زایی آن ها جلوگیری می کنند(21).

همچنین Hubner و Surawicz طی تحقیقات خود، توانایی درمان و پیشگیری از عفونت های روده ای توسط پروبیوتیک ها را نشان دادند(22). Cleusix و همکارانش نیز طی آزمایشاتی نشان دادند که لاکتوباسیلوس روتری با تولید ماده ای به نام روترین، از رشد و فعالیت پاتوژن های روده ممانعت می کند (23). فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین از جمله روترین توسط لاکتوباسیلوس روتری علیه باکتری های پاتوژن شایع دستگاه گوارش و نیز بر ضد پروبیوتیک های لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کارژی و لاکتوباسیلوس جانسونی به وسیله ی Spinler و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. نتایج گزارش شده، نشان دهنده ی جلوگیری از رشد باکتری های پاتوژن و عدم فعالیت ضد میکروبی بر سایر پروبیوتیک های ذکر شده توسط لاکتوباسیلوس روتری بود(7). در مطالعه ی حاضر نیز، آنچه در بررسی نتایج ثبت شده بدست می دهد، دارا بودن اثر مهاری قوی تر لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس نسبت به لاکتوباسیلوس روتری بر هر سه انتروپاتوژن است که به ترتیب بیشترین هاله ی عدم رشد مشاهده شده مربوط به شیگلا سونئی، سالمونلا انتریکا و اشریشیاکلی می باشد. در مطالعه ی فوق هر دو پروبیوتیک دارای خاصیت ضد میکروبی بودند که این خاصیت با ایجاد هاله ی عدم رشد در کشت همزمان پاتوژن و Spot پروبیوتیک به اثبات رسید. در بررسی که بر روی فعالیت ضد میکروبی این دو لاکتوباسیل علیه یکدیگر صورت گرفت، نتایج نشان داد که این دو پروبیوتیک هیچ گونه هاله ی عدم رشدی

10. Rosenfeldt V, Michaelsen Kf, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tevede M et al. *Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers*. *Pediatr Infect Dis J*. 2002; 21: 417-419.
11. Axelsson LT, Chung TC, Dobrogosz WJ, Lindgren SE. *Production of a broad spectrum antimicrobial substance by Lactobacillus reuteri*. *Microb Ecol Health Dis*. 1989; 2: 131-136.
12. Chung TC, Axelsson L, Lindgren E, Dobrogosz WJ. *In vitro studies on reuterin synthesis by Lactobacillus reuteri*. 1989; 37-144.
13. Murray PR, Rosental KS, Pfaller MA. *Enterobacteriaceae*; In: *Medical Microbiology*. 5th ed, Elsevier Mosby, Philadelphia. 2006; pp:100-3.
14. FAO-WHO. *Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization*. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Rep. Food and Health Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization, Washington, DC. 2002
15. Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. *In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus*. *Food Research International*. 2007; 40: 629-636.
16. Apella MC, Gonzalez SN, Nader de Macias ME. *In vitro studies on the growth of Shigella sonnei by Lactobacillus casei and Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1992; 73: 480-483.
17. Strus M, Pakosz K, Gosciniak H. *Antagonistic activity of Lactobacillus bacteria strains against anaerobic gastrointestinal tract pathogens (Helicobacter pylori, Campilobacter coli, Campilobacter jejuni, Clostridium difficile)*. *Medycyna Doswiadczalna i Mikrobiologia*. 2001; 53: 133-142.
18. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. *Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis*. *Pediatrics*. 2002; 109: 678-684.
19. Reid G, Burton J. *Use of Lactobacillus to prevent infection by pathogenic bacteria*. *Microbes Infect*. 2002; 4: 319-24.
20. Ogunbanwo ST, Sanni AL, Onilude AA. *Characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum F1 and Lactobacillus brevis OGI*. *African Journal of Biotechnology*. 2003; 2(8): 219-227.
21. Servin AL, Coconnier MH. *Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2003; 17(5): 741-754.
22. Huebner ES, Surawicz CM. *Probiotics in the prevention and treatment of gastrointestinal infections*. *Gastroenteral Clin NorthAm*. 2006; 35(2): 355-365.
23. Cleusix V, Lacroix C, Vollenweider S, Duboux M, Le Blay G. *Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by Lactobacillus reuteri against intestinal bacteria*. *BMC Microbiol*. 2007; 7: 101.