



ارزیابی اثر ضد باکتریایی سویه های پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی

نجمه نامدار^{۱*}، دکتر یحیی تهمتن^۲، دکتر محمد کارگر^۳، دکتر محمد حسین حسینی^۲

^۱ کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان

^۲ استادیار بخش باکتری شناسی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی - شیراز

^۳ دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروبیولوژی

چکیده

سابقه و هدف: اشریشیا کلی O157:H7 یکی از پاتوژن های نوظهور منتقل شونده از طریق غذا است که بیماری های خطرناکی مانند سندرم اورمی همولیتیک (HUS) را در انسان ایجاد می کند. هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر پروبیوتیکی بیفیدو باکتریوم علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

مواد و روش کار: این پژوهش به صورت تجربی بر روی سویه های جدا شده از نمونه های بالینی و سویه استاندارد اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد. تمامی نمونه های بالینی در محیط های هارت اینفیوژن براث و تریپتون سویا براث غنی سازی و سپس در محیط های اختصاصی CT-SMAC کشت داده شدند. از آزمون های بیوشیمیایی، سرولوژی، PCR چندگانه و کشت در رده سلولی ورو برای تایید و پروتایپینگ سویه های وروتوکسیژنیک اشریشیا کلی O157:H7 استفاده شد. همچنین برای ارزیابی اثر آنتاگونیسمی گونه های پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بر سویه های بیماری زا روش انتشار در آگار (AGD) بکار برده شد.

یافته ها: با توجه به میزان پروبیوتیک مورد استفاده، تمامی سویه های مورد بررسی دارای قطر هاله ۱۵ تا ۳۰ میلی متر بر روی سویه های مولد شیگا توکسین اشریشیا کلی O157:H7 بودند. اثر آنتاگونیسمی سویه های پروبیوتیک در pH خنثی نشان داده شد. اما اسیدهای آلی تاثیر معنی داری بر مهار سویه های بیمارزا نداشتند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که باکتری های پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بر روی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 اثر مهار داری دارد، اما دلیل این تاثیر تنها تولید اسیدهای آلی و pH اسیدی نمی باشد.

واژگان کلیدی: پروبیوتیک ها، بیفیدو باکتریوم، اشریشیا کلی O157:H7، اثر آنتاگونیستی

دریافت مقاله: تیرماه ۸۸ پذیرش برای چاپ: شهریور ۸۸

مقدمه

(۲). این باکتری اسهال خونی شدید و بیماری های پرخطری مانند سندرم اورمی همولیتیک (Hemolytic uremic syndrome=HUS)، کولیت هموراژیک (Hemorrhagic Colitic=HC)، ترمبوتیک ترمبوسیتوپنی پورپورا (Thrombotic thrombocytopenic purpura =TTP) را ایجاد می کند (۳ و ۴). این باکتری به عنوان یکی از پاتوژن های منتقل شونده از طریق غذا (Food-borne pathogen) شناخته شده است

اشریشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC) سویه O157:H7 یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های روده ای در انسان می باشد (۱ و

(* آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان
تلفن: ۰۷۹۱ ۳۳۳۶۷۰۳

ایجاد بیماری های حاد، دوز عفونی کننده پایین، داشتن عوامل بیماری زایی گوناگون و امکان انتقال آن از مواد غذایی روش های مناسب برای پیشگیری و بهبود بیماری می تواند از نظر بهداشتی بسیار مهم باشد.

در مطالعات مختلف اثر پروبیوتیک ها در ممانعت و درمان طیف وسیعی از بیماری های روده ای به اثبات رسیده است (۱۱). پروبیوتیک ها به گروهی از ارگانسیم های غیر بیماری زا گفته می شود که دارای اثرات سودمندی برای میزبان خود هستند (۱۲). پروبیوتیک ها به صورت پودرهای خشک شده و یا به همراه محصولات تخمیری مصرف می شوند. این گروه از باکتری ها در قسمت های مختلف بدن به ویژه دهان، دستگاه گوارش، دستگاه ادراری تناسلی و دستگاه تنفسی فوقانی نقش مهمی در باز دارندگی عفونت دارند. امروزه استفاده از ارگانسیم های پروبیوتیکی مانند لاکتوباسیلوس ها، بیفیدو باکتریوم ها، انتروکوکوس ها، کلاستریدیوم ها و ساکارومیسس ها متداول شده است (۱۳).

انواعی از لاکتوباسیلوس ها و دیگر پروبیوتیک ها با تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، آمینو اسیدهایی مانند سیستین و گلوتامین نقش محافظتی علیه پاتوژن ها در روده ایفا می کنند. به طور کلی پروبیوتیک ها با تولید محصولات ضد باکتریایی (مانند باکتروسین ها، بوتریک اسید، متابولیت های اکسیژن مثل پراکسید هیدروژن)، تولید اسید های چرب با زنجیره کوتاه، رقابت با باکتری های پاتوژن برای اشغال رسته های سطحی و اکتساب مواد غذایی، تولید آنزیم های متفاوت و تجزیه بهتر مواد غذایی، تحریک انتروسیت ها برای تولید سیتوکین ها، تنظیم و تحریک سیستم ایمنی و اثر بر بیان ژن های بیماریزا می تواند اثرات درمانی سودبخشی را داشته باشد (۱۱، ۱۳ و ۱۴).

بیفیدو باکتریوم ها از باکتری های گرم مثبتی هستند که میکروفلور غالب و طبیعی روده ۸۰ درصد از کودکان و ۲۵ درصد بزرگسالان محسوب می شود. با توجه به اثرات پروبیوتیکی بیفیدو باکتریوم ها استفاده از آن ها در فرآورده های لبنی به ویژه ماست متداول شده است (۱۳). هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر آنتاگونیسمی ۴ سویه پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم بر علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

(۵). توانایی بقای این باکتری در شرایط اسیدی باعث شده که باکتری بتواند در غذاهایی با pH اسیدی زیست کند. این باکتری فلور طبیعی روده حیواناتی مانند گاو، بز و گوسفند می باشد و از این رو فرآورده های لبنی آلوده مانند شیر غیر پاستوریزه، محصولات گوشتی، همبرگر پخته نشده نیز مهم ترین راه های انتقال این باکتری محسوب می شوند. اشریشیا کلی تولید کننده توکسین شیکاگا (Shiga toxin producing *E. coli* = STEC) در غذاهایی مانند آب سیب، سوسیس، سس مایونز می تواند به مدت طولانی زنده بماند. یکی دیگر از توانایی های این باکتری دوز عفونی کننده پایین (کمتر از ۱۰۰) آن می باشد (۵ و ۶). به همین دلیل تمامی سویه های انتروهوموراژیک اشریشیا کلی مشاهده شده در حیوانات از عوامل خطر برای انسان محسوب می شوند. اما سروتیپ O157 می تواند سبب بیماری در انسان شود و خطری برای دام های بالغ ندارد (۷ و ۸).

عوامل حدت اشریشیا کلی O157:H7 مانند توکسین ها، آدهسین، همولیزین، لیپوپلی ساکارید و تاژک نقش اساسی را در پایین بودن دوز عفونی این باکتری دارند (۸).

Stx-1 و Stx-2 مهمترین توکسین های تولید شده توسط این باکتری هستند (۹). همچنین شیکاگاتوکسین (Stx) و لیپوپلی ساکارید (LPS) مهم ترین عوامل در ایجاد کننده HUS محسوب می شوند (۴). همچنین به دلیل اثرات کشنده توکسین در رده سلولی ورو (Vero Cell) تهیه شده از کلیه میمون سبز آفریقایی، به آن وروتوکسین (VT) نیز می گویند (۳).

استفاده از آنتی بیوتیک ها به منظور درمان و پیشگیری از عفونت های ناشی از این باکتری نه تنها باعث ایجاد مقاومت دارویی در آن می شود بلکه سبب به هم خوردن فلور نرمال مفید دستگاه گوارش شده و بدن را مستعد به انواع بیماری های روده ای می کند. از طرفی استفاده از آنتی بیوتیک در درمان سبب می شود که فاز حامل Stx، سیکل کافت (لیتیک) را طی کند و باعث افزایش ترشح Stx و پیشرفت بیماری به سمت HUS در افراد دریافت کننده آنتی بیوتیک گردد (۷ و ۱۰).

درمان بیماری های ناشی از EHEC محدود به مراقبت های نگهدارنده می باشد. بنابراین با توجه به اهمیت این باکتری در

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

اندازه	توالی	پرایمر	ژن
۵۵۵ bp	TTCGCTCTGCAATAGGTA	Stx1-F	<i>stx-1</i>
	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	Stx1-R	
۴۲۵ bp	ATATCCGTTTAAATGGCTATCT	Eae-F	<i>eae-A</i>
	AATCTTCTGCGTACTGTGTTC	Eae-R	
۱۱۸ bp	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	Stx2-F	<i>stx-2</i>
	AGGGGTCGATATCTCTGTCC	Stx2-R	
۲۱۰ bp	CGCAACAAACTGAAGCAAAGG	Hly:F	<i>hly</i>
	TTGGCGGCACATTTGTCAC	Hly:R	

مواد و روش ها

الف) سویه میکروبی و شرایط رشد: سویه های پروبیوتیک بیفیدو باکتریوم انیمالیس (*B. animalis*)، بیفیدو باکتریوم لاکتیس (*B. lactis*)، بیفیدو باکتریوم لانگوم (*B. longum*) و بیفیدو باکتریوم بیفیدوم (*B. bifidum*) بود که از کارخانه شیر پگاه شیراز به صورت لیوفیلیزه تهیه گردید.

باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از دانشگاه ادینبرگ انگلستان به عنوان سویه ی کنترل تهیه شد. چندین سویه باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از حیوانات اهلی جدا شد که برای تمامی آن ها تست های بیوشیمیایی، آنتی سرم اختصاصی اشریشیا کلی O157:H7 و PCR انجام شد. تمام جدایه های اشریشیا کلی O157:H7 در محیط براین هارت اینفیوژن برات (BHI) و تریپتون سویا برت (TSB) و در شرایط هوازی ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. بیفیدو باکتریوم ها De Man-Rogosa_Sharp و محیط MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط بی هوازی به مدت ۲۰ ساعت گرماگذاری شد (۱۵ و ۱۶).

به وسیله روش PCR چندگانه ویروتایپینگ سویه های اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد و سویه های واجد ژنهای *stx-1*، *stx-2*، *eae A* و *hly* انتخاب شدند. همچنین اثر تخریبی سویه ها بر روی رده سلولی ورو (VERO) مربوط به میمون سبز آفریقایی تایید شد (vero cell assay) برای انجام این تست، ۰/۵ میکرو لیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری اشریشیا کلی O157:H7 به رده سلولی ورو تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در آنکوباتور واجد ۵٪ CO₂ گرماگذاری شد. سپس اثرات تخریب سلولی (CPE) در زیر میکروسکوپ معکوس

(Invert Microscope) ارزیابی شد. سویه های وروتوکسیژنیک

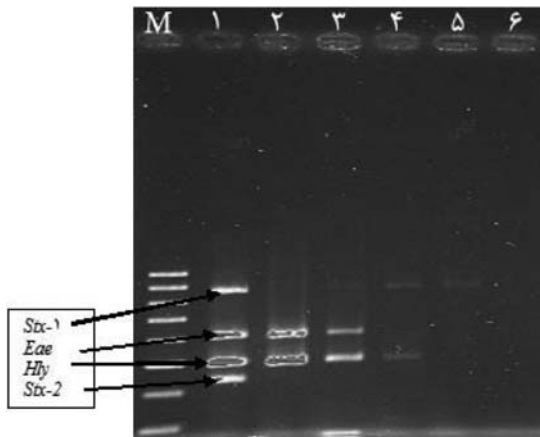
برای مرحله بعد انتخاب و در گلیسرول ۲۰ درصد در دمای ۷۰- درجه سانتی گراد ذخیره سازی شد (۱۵ و ۱۶).

ب) تعیین تایپ باکتری: تعیین گروه سرولوژی پس از انجام تست های بیوشیمیایی و با استفاده از سرم های تجاری شرکت بهارافشان با روش آگلوتیناسیون بر روی لام انجام شد.

ج) ویروتایپینگ: به وسیله روش PCR چندگانه ویروتایپینگ سویه های تست و کنترل اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد. PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرو لیتر حاوی Tris-HCL با غلظت ۰/۲mM، MgCl₂ با غلظت ۳mM، dNTPs با غلظت ۰/۲mM، KCl با غلظت ۱۰mM، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمرز Taq، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) و ۱ میکرو لیتر DNA انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر اپندورف با شرایط دمایی ۳ دقیقه و اسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل و اسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه به مدت ۳۵ ثانیه و گسترش در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و در نهایت گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد.

پس از انجام واکنش PCR، محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بر مایید با دستگاه Kodack gel scan، عکسبرداری شد (۳).

و) آماده سازی محلول رویی حاصل از کشت باکتری ها: یک سی سی از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتریایی اشریشیا کلی O157:H7 را به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰rpm سانتریفوژ کرده و محلول



شکل ۱. نتایج PCR: ردیف M سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ردیف ۱: سویه واجد ۴ ژن، ردیف ۲: سویه واجد ۲ ژن، ردیف ۳: سویه واجد ۳ ژن، ردیف ۴: سویه واجد ۲ ژن، ردیف ۵: سویه واجد ۱ ژن و ردیف ۶: کنترل منفی.

برای ارزیابی اثر محلول رویی پروبیوتیک در مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7، برای این منظور از روش انتشار در آگار استفاده گردید. در پلیت های مولر هینتون به وسیله دستگاه پانچ، چاهک های یکسان ایجاد شد. در هر چاهک از غلظت بالاتر به کمتر به ترتیب مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از محلول رویی پروبیوتیک ریخته شد و پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در حرارت ۳۷ درجه هاله عدم رشد اندازه گیری شد (۱۷).

همچنین تاثیر پروبیوتیک ها و محلول رویی حاصل از آن ها در pH خنثی بر روی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 در محیط مولر هینتون آگار واجد باکتری در حرارت ۳۷ درجه و زمان ۲۴ ساعت ارزیابی گردید. برای ارزیابی تاثیر اسیدهای آلی بر رشد باکتری نیز اسید بوتریک و اسید سیتریک با pH خنثی در محیط مولر هینتون آگار واجد باکتری در شرایط یاد شده اضافه گردید.

برای آنالیز آماری یافته های این پژوهش از نسخه ی ۱۱/۵ نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای برای آن ها استفاده گردید. مرز معنی داری در $p < 0.05$ قرار داده شد.

نتایج

در این بررسی اثر سویه های بیفیدو باکتریوم روی سویه استاندارد اشریشیا کلی O157:H7 و ۸۴ سویه باکتری جدا شده از نمونه های بالینی دارای ژن های بیماری زا در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد.

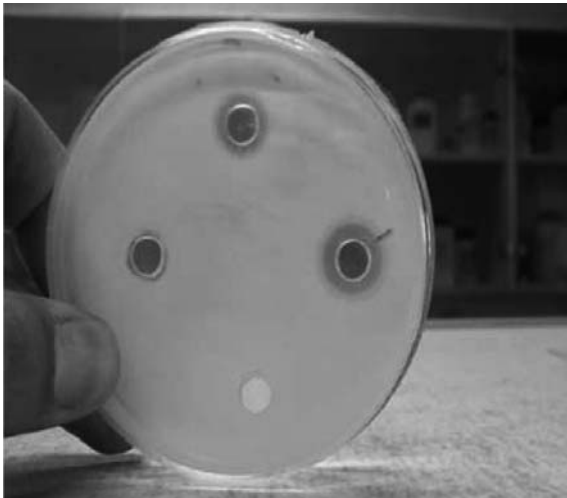
رویی به یک لوله استریل منتقل گردید. سپس دوبار از فیلتر ۰/۲ میکرومتر برای اطمینان از جداسازی باکتری عبور داده شد. همچنین کشت ۲۰ ساعته بیفیدو باکتریوم ها در دور ۳۵۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی آن نیز دو بار فیلتر شد. سپس لوله های حاوی محلول رویی حاصل از رشد باکتری ها، قبل از مطالعه در حرارت ۴ درجه نگهداری گردید (۱۷-۱۵).

ز) اندازه گیری pH و خنثی سازی سوسپانسیون باکتریایی پروبیوتیک ها و محلول رویی حاصل از رشد آن ها: در ابتدا pH سوسپانسیون تهیه شده از سویه های بیفیدو باکتریوم نگهداری شده به مدت ۲۰ ساعت در محیط MRS اندازه گیری گردید و سپس با استفاده از محلول NaOH ۰/۱ درصد pH آن خنثی گردید و سپس مراحل یاد شده در مورد آن تکرار گردید (۱۶).

ح) تهیه رقت های متفاوت: برای تهیه مقدار غلیظ شده ی محلول رویی ۳ لوله استریل تهیه و مقدار ۸ سی سی از محلول رویی را در هر کدام ریخته و در یخچال قرار داده، پس از آنکه مقدار آن ها به ۱، ۲ و ۴ سی سی رسید، به عنوان مقادیر متفاوت از محلول رویی غلیظ شده استفاده شد.

رقت های ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۸ با استفاده از PBS استریل تهیه شد. برای جلوگیری از آلودگی پس از تهیه ی هر رقت نمونه ها فیلتر شدند. از استاندارد ۰/۵ مک فارلند برای بررسی تعداد باکتری ها استفاده شد و پس از کشت آن ها روی محیط های جامد (TSA و MRS) تعداد آن ها شمارش گردید (۱۷).

ط) ارزیابی اثر آنتاگونیسمی: برای بررسی خاصیت ضد میکروبی پروبیوتیک ها علیه اشریشیا کلی O157:H7 از روش نفوذ در ژل با انتشار در آگار (Agar diffusion assay) استفاده شد. از سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی O157 دارای ژن های متفاوت با کشت ۲۴ ساعته، مقدار یک سی سی روی محیط مولر هینتون آگار ریخته و آن را روی سطح پلیت به طور کامل برای ایجاد سطح یکنواخت پخش شد. پس از ایجاد حفره با دستگاه پانچ و شماره گذاری حفره ها رقت های مختلف پروبیوتیک درون آن ها ریخته شد و در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری گردید. سپس قطر هاله عدم رشد اطراف چاهک ها اندازه گیری شد (۱۵، ۱۶ و ۲۴).



شکل ۲. نتایج AGD: پروبیوتیک ها و محلول رویی آن ها قادر به مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7 روی پلیت های مولر هینتون آگار بود.

شرایط آزمایشگاهی و درون سلولی نشان داده اند که سویه های دارای ژن *stx-2* در مقایسه با سویه های واجد ژن *stx-1* و یا هر دو ژن *stx-1* و *stx-2* بیماری زا تر می باشند (۲۵). نتایج ارزیابی ما در این پژوهش نیز تایید کننده فرضیه یاد شده بود.

فعالیت ضد میکروبی و تولید باکتریوسین توسط لاکتوباسیلوس ها به وسیله Ogunbanw و همکاران در سال ۲۰۰۳ مورد بررسی قرار گرفت. محققین یاد شده با استفاده از روش چاهک نشان دادند که لاکتوباسیلوس ها از رشد اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس و پرسیسینا انتروکولیتیکا جلوگیری می کنند (۱۷ و ۱۸).

Kabir و همکاران در سال ۲۰۰۰ با استفاده از روش چاهک نشان دادند که مخلوط شیر تخمیر شده شامل لاکتوباسیلوس کازئی، رشد پاتوژن های روده ای شامل شیگلا دیسانتری، سالمونلا تایفی موریوم و اشریشیا کلی را مهار می سازد (۱۷ و ۱۹). Conconnier و همکاران در همان سال گزارش کردند مصرف محلول رویی کشت لاکتوباسیلوس فرمنتوم، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوکوکوس لاکتیس بر روی گروه گسترده ای از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن اثرات بازدارنده رشد دارد (۱۷ و ۲۰). نفوذ مواد مترشحه توسط پروبیوتیک ها و محلول رویی آن ها در ژل با تأثیر بر روی اشریشیا کلی O157:H7 سبب مهار رشد آن ها می گردد. پروبیوتیک ها با تولید اسید های چرب با زنجیره ی کوتاه، آمینواسیدهایی از جمله سیستئین و گلوتامین نقش محافظتی خود را علیه پاتوژن های روده ای ایفا می کند. همچنین آن ها با

همه ی کلنی های تخمیرکننده لاکتوز در تست های بیوشیمیایی اختصاصی اشریشیا کلی شامل سیترات، اوره، TSI، MR-VP، SIM مثبت شدند. همچنین با استفاده از آنتی سرم اختصاصی وجود O157:H7 تایید گردید.

ارزیابی بیماری زایی باکتری اشریشیا کلی O157:H7 با پایش ژن های بیماری زای شیگاتوکسین (*stx-1* و *stx-2*)، *hly* و *eaeA* با روش PCR چندگانه انجام شد. نتایج PCR نشان داد که برخی از سویه ها (۳ درصد) دارای هر ۴ ژن و ۶۵ درصد نمونه ها یک تا ۴ ژن یاد شده را داشتند (تصویر ۱).

سپس با استفاده از روش انتشار در آگار خاصیت ضد باکتریایی پروبیوتیک ها علیه اشریشیا کلی O157:H7 دارای ژن های متفاوت ارزیابی شد. به طور کلی در اطراف چاهک های حاوی پروبیوتیک روی پلیت های مولر هینتون آگار پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری هاله ی عدم رشد باکتری های *E.coli* O157:H7 آشکار گردید (تصویر ۲). قطر هاله عدم رشد با توجه به میزان پروبیوتیک بین ۱۵ تا ۳۰ میلی متر بود.

با اینکه هاله عدم رشد باکتری های اشریشیا کلی O157:H7 واجد ژن های شیگاتوکسین و *eaeA* متفاوت بود، اما میزان آن با اشریشیا کلی های دارای ژن *stx-1* و *stx-2* و یا ژن ها (*hly* و *eae*) تفاوت معنی داری نداشت ($p < 0.05$). همچنین هاله عدم رشد اشریشیا کلی های واجد ژن *stx-2* به تنهایی مشابه هاله عدم رشد دیگر پروبیوتیک ها بود. پروبیوتیک ها تقریباً به یک اندازه اثر بازدارندگی روی رشد اشریشیا کلی های واجد یک یا چند ژن داشتند.

پروبیوتیک ها و محلول رویی حاصل از رشد آن ها با pH خنثی نیز توانست رشد اشریشیا کلی O157:H7 را در شرایط آزمایشگاه مهار کند. اسیدهای آلی با pH خنثی اثر قابل ملاحظه ای روی مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7 نداشت (تصویر ۳).

بحث

در این پژوهش با توجه به اهمیت بیماری زایی سویه های انتروهمورازیک اشریشیا کلی O157:H7 اثر مهار پروبیوتیک ها بر روی آن ها ارزیابی گردید. بسیاری از دانشمندان با بررسی اثر سویه های اشریشیا کلی O157:H7 دارای ژن های متفاوت در



شکل ۳. اثر سوسپانسیون پروبیوتیکی و اسید های آلی با pH خنثی در مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7 : اطراف چاهک های حاوی اسید آلی (دو چاهک پایین) در مقایسه با چاهک حاوی پروبیوتیک (دو چاهک بالا) رشد باکتری ممانعت نشده است.

کلی O157:H7 نمی تواند باشد (۱۵). به همین دلیل در این پژوهش ما نیز اثر آنتاگونیسمی اسیدهای آلی بر رشد باکتری اشریشیا کلی O157:H7 مورد بررسی قرار دادیم. نتایج نشان داد که اسیدهای آلی نمی توانند اثر قابل ملاحظه ای بر علیه این باکتری ایجاد نمایند. به نظر می رسد که عوامل دیگری مانند باکتریوسین ها، تولید و ترشح متابولیت های آلی و گلیکولپیدهایی با فعالیت بیولوژیک قوی در اثر مهار بر علیه این باکتری می تواند نقش تعیین کننده داشته باشد. اثر اسیدهای آلی و باکتریوسین ها و متابولیت های آلی تولید شده توسط پروبیوتیک ها علیه اشریشیا کلی O157:H7 روی رده سلولی ورو نیز بررسی شد و نتایج مشابهی حاصل گردید. متابولیت های آلی تولید شده حتی زمانی که pH محیط خنثی شد مانع تخریب رده سلولی ورو توسط اشریشیا کلی O157:H7 گردید (نتایج در این مقاله ذکر نشده است).

به همین دلیل، ارزیابی اثرات آنتاگونیسمی پروبیوتیک ها بر روی اشریشیا کلی O157:H7 در حیوانات آزمایشگاهی مانند موش، خرگوش، خوکچه هندی می تواند زمینه استفاده کاربردی آنها در انسان را فراهم آورد.

تولید آنزیم های متفاوت (پروتئاز و لیپازها)، و اثر روی بیان ژن های بیماری زای باکتری های پاتوژن، اثر مهار بر روی آن ها ایفا می کند. اثر باکتریوسیدال (کشنده) بیفیدو باکتریوم ها علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاه این مساله را تایید ساخت (۱۰).

Gagnon و همکاران در سال ۲۰۰۴ اثر آنتاگونیسم بیفیدو باکتریوم ها را علیه اشریشیا کلی O157:H7 با روش کشت نقطه ای در آگار (Agar Spot Test) بررسی کردند و اثر مهار بر رشد این باکتری را در شرایط آزمایشگاه به وسیله بیفیدو باکتریوم ها را ثابت نمودند (۱۵).

Gopal و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی محلول روی غلیظ شده بیفیدو باکتریوم ها بر علیه اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی با روش AGD نشان دادند. همچنین محققین یاد شده نشان دادند که افزایش غلظت محلول روی موجب افزایش کفایت آنتاگونیسمی بر علیه اشریشیا کلی O157:H7 می شود (۲۱ و ۲۳) که این مساله با نتایج پژوهش ما هم خوانی داشت.

محققین یاد شده نشان دادند که بین اثر پروبیوتیک ها و محلول رویی آن ها، روی سویه های اشریشیا کلی O157:H7 واجد ژن های بیماری زای مختلف بر خلاف نتایج درون سلولی (In vivo) اثر معنی داری وجود ندارد (۲۳).

Takahashi و همکاران نیز اثر ضد باکتریایی محلول رویی خنثی شده (pH ۷) پروبیوتیک ها را علیه باکتری های پاتوژن در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند (۴).

در این پژوهش، با بررسی pH خنثی شده پروبیوتیک ها در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شد که سوسپانسیون خنثی شده پروبیوتیک ها نیز می تواند بر رشد سویه پاتوژن اشریشیا کلی O157:H7 اثر مهار داشته باشد.

Gibson و Wang نشان دادند سویه های *B. infantis* و *B. longum* می توانند بر علیه بسیاری از سویه های گرم منفی و گرم مثبت پاتوژن اثر آنتاگونیسمی داشته باشند. محققین یاد شده پس از خنثی سازی pH سوسپانسیون باکتریایی و محلول رویی پیشنهاد دادند که تولید اسیدهای آلی تنها عامل آنتاگونیستیک علیه اشریشیا

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سویه های مختلف بیفیدو باکتریوم به عنوان پروبیوتیک قادر به مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7 مولد شیگا توکسین در شرایط آزمایشگاهی می باشد. اما برای استفاده از پروبیوتیک ها به منظور پیشگیری و درمان بیماری های ناشی از این باکتری نیاز به پژوهش های بیشتری وجود دارد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای مهندس حنیف پور مدیر تولید محترم کارخانه شیر پگاه فارس به دلیل در اختیار قرار دادن سویه های پروبیوتیک و راهنمایی های ارزنده کمال سپاسگزاری را دارند.

References

1. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-Induced changes in Epithelial Barrier Function. *Infection and Immunity*, 2008; 1340-1348.
2. Tarr PI, Grodon CA, Chandler WL. Shiga toxin producing *Escherichia coli* and hemolytic uremic syndrome. *Lancet*, 2005; 41:219-226.
3. Pamela HR, Davis KC, Garstka WR, Bhunia AK. Lactate dehydrogenase release assay from vero cells to distinguish verotoxin producing *Escherichia coli* from non vero toxin producing strains. *Journal of microbiological methods*, 2000; 43:171-178.
4. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS immunology and medical microbiology*, 2004; 41:219-226.
5. Momose Y, Hirayama K, Iton K. Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2008; 93:141-149.
6. Chaucheyras-Durand F, Madic J, Dondin F, Martin C. Biotic and abiotic factors influencing in vitro growth of *Escherichia coli* O157:H7 in ruminant digestive contents. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006; 72(6): 4136-4142.
7. Steven MPS, Diemen PWV, Dziva F, Jones P, Wallis T. Options for the control of enterohemorrhagic with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by mice. *FEMS Immunology and medical microbiology*, 2004; 41:219-226.
8. Konada EY, Parken JC, Tran HT, Bryla DA, Robbins JB, Szo SC. Investigation vaccine for *Escherichia, pseudomonas aeruginosa* recombinant exoprotein A conjugates in adults. *Infect Dis* 1998; 177:338-387.
9. Sherman P, Soni R, Petric M, Karmali M. Surface properties of the vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Infection and Immunity*, 1987; 55(8): 1824-1829.
10. Perna NT, Plunkett G, Burland V, et al. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*, 2001; 409:529-533.
11. Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Moon HW. Pathogenesis of *Escherichia coli* O157:H7 in wean calves. *Adv Exp Med Biol*, 1999; 473:173-177.
12. sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung PH, Ngo PSC, Goulet J, Tompkins TA. Probiotic reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6-Induced changes in polarized T84 Epithelial cell monolayers by inducing Bacterial Adhesion and cytoskeletal Rearrangements. *Infection and Immunity*, 2005; 73(8):

- 5183-5188.
13. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neat F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as agents-physiological effect and clinical benefits. *Animal pharmacolther* 2005; 22:495-512.
 14. Mckp S, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Kinght SC. Mechanism Action of probiotics: Recent Advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2008; 15(2): 300-305.
 15. Gagnon M, Kheadr EE, Blay GL, Fliss I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. *Food microbiology*. 2004; 92:69-78.
 16. Trejo FM, Minnaard J, Perez FP, DE Antoni GL. Inhibition of *Clostridium difficile* by Bifidobacterium supernatants. *Anaerobe*, 2006; 12:186-193.
 17. Khyani A, Mozafary N, Jandaghy Nand Ghaemi A. Antagonistic effect of lactic bacteria present in youghurt against pathogenic bacteria. *Journal of Gorgan University of Medical Sciences*, 2006; 8(1): 28-32. [In persian].
 18. Ogunbanwo ST, Sanni AT, Onilude AA. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2003; 2(8): 219-213.
 19. Tamime A, Robinson R. Nutritional value of youghart. *Jornal of Dairy Science and thecnology*, 1998; 1: 365-369.
 20. Coconnier MH, Lievin V, Hemery E, Servin AL. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol*, 1998; 64:4573-4580.
 21. Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, 2001; 67: 207-216.
 22. Griffin PM, Ostoff SM, Tauxe RV, Green KD, Well JC, Lewis JH, Blake PA. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. abroad clinical spectrum. *Ann Intern Med*, 1998; 109:705-712.
 23. Aldo PF, Juremi OC, Carlos ASM. The dangers of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: an emergent pathogen. *Rev Biomed*, 2002;13:124-129.
 24. Jin LZ, Marquardt RR, Zhao X. Antagonism of *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.* and *Bifidobacteria spp.* Against Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Department of Animal Science.



Evaluation of Antagonistic Effect of Probiotics *Bifidobacteria* spp. on *E.coli* O157:H7 *in vitro*

Najmeh Namdar¹, Yahya Tahamtan², Mohammad Kargar³,
Mohammad Hosein Hoseini²

¹M.Sc. Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

²Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.

³Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran

Abstract

Background and Objectives: *E. coli* O157:H7 is recognized to be one of the most important food-borne pathogens causing hemolytic uremic syndrome (HUS). The purpose of this study was to evaluate the effects of probiotics *Bifidobacteria* spp. against growth or activity of *E.coli* O157:H7 was used *in vitro*.

Material and methods: This experimentally study was performed on strains isolated from clinical samples and standard *E. coli* O157:H7. All samples were enriched on BHI and TSA media and then, cultured on CT-SMAC. For confirmation of verotoxigenic *E. coli*, biochemical, serological testes, multiplex PCR and culture on Vero cell line were performed. Also, agar gel diffusion assay was used to detect the antagonistic activity of the probiotic bacteria against pathogenic bacteria.

Results: Result and discussion: According to used amount of probiotic, all the investigated strains showed a 15-30 diameter blanked area on Shiga producer *E. coli* O157:H7. The effect has been repeated in neutral pH, while organic acids had any meaningful effects on the pathogen strains.

Conclusion: Probiotics are able to inhibit growth of *E.coli* O157:H7 and it's not only because of organic acid or low pH but also it's because of produce other antibacterial agents.

Keywords: Probiotics, *Bifidobacteria*, *E. coli* O157:H7, Antagonistic Effect

Correspondence to: Najmeh Namdar

Tel: (+98)791-3336703

E-mail: najistar@yahoo.com

Journal of Microbial World 2009, 2(3), 161-168