مجله دنیای میکروب ها
سال دوم، شماره سوم، پاییز ۱۳۸۸
صفحات ۱۶۸-۱۶۱

ارزیابی اثر ضد باکتریایی سویه های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم 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 وسرم 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 بیماری‌های خطرناکی مانند سندرم اورمی همولیتیک (HUS) را در انسان ایجاد می‌کند. هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر پروبیوتیکی بیفیدوباکتریوم علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد.

مواد و روش کار: این پژوهش به صورت تجربی بر روی سویه‌های جدا شده از نمونه های بالینی و سویه استاندارد اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد. تمامی نمونه های بالینی در محیط های براین 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 ویروتایپینگ سویه های وروتوکسیژنیک اشریشیا کلی O157:H7 استفاده شد. همچنین برای ارزیابی اثر آنتاگونیسمی گونه های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم 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 اشریشیاکلی O157:H7 بودند. اثر آنتاگونیسمی سویه های پروبیوتیک در pH خنثی نشان داده شد. اما اسیدهای آلی تاثیر معنی داری بر مهار سویه های بیماریزا نداشتند.

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

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

دریافت مقاله: تیرماه ۸۸ پذیرش برای چاپ: شهریور ۸۸

مقدمه

اشریشیا کلی انتروهموراژیک (EHEC) سویه *O157:H7* یکی از مهم ترین عوامل ایجاد عفونت های روده ای در انسان می باشد (۱ و 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 می‌کند (۳ و ۴). این باکتری به عنوان یکی از پاتوژن های منتقل شونده از طریق غذا (Food-borne pathogen) شناخته شده است

*) آدرس برای مکاتبه: جهرم، دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان
تلفن: ۰۷۹۱ ۳۳۳۶۷۰۳
پست الکترونیک: najistar@yahoo.com

(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 می‌باشد و از این رو فراورده های لبنی آلوده مانند شیر غیر پاستوریزه، محصولات گوشتی، همبرگر پخته نشده نیز مهم‌ترین راه های انتقال این باکتری محسوب می شوند. اشریشیاکلی تولید کننده توکسین شیگا (Shiga toxin producing *E. coli* = STEC) در غذاهایی مانند آب سیب، سوسیس، سس مایونز می تواند به مدت طولانی زنده بماند. یکی دیگر از توانایی‌های این باکتری دوز عفونی کننده پایین (کمتر از ۱۰۰) آن می‌باشد (۵ و ۶). به همین دلیل تمامی سویه های انتروهموراژیک اشریشیاکلی مشاهده شده در حیوانات از عوامل خطر برای انسان محسوب می شوند. اما سروتیپ O157 می‌تواند سبب بیماری در انسان شود و خطری برای دام‌های بالغ ندارد (۷ و ۸).

عوامل حدت اشریشیاکلی O157:H7 مانند توکسین‌ها، ادهسین، همولیزین، لیپوپلی ساکارید و تاژک نقش اساسی را در پایین بودن دوز عفونی این باکتری دارند (۸).

Stx-1 و Stx-2 مهمترین توکسین‌های تولید شده توسط این باکتری هستند (۹). همچنین شیگاتوکسین (Stx) و لیپوپلی ساکارید (LPS) مهم‌ترین عوامل در ایجاد کننده HUS محسوب می‌شوند (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 می‌گویند (۳).

استفاده از آنتی بیوتیک‌ها به منظور درمان و پیشگیری از عفونت‌های 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 فاژ 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 بیماری‌های ناشی از EHEC محدود به مراقبت‌های نگهدارنده می‌باشد. بنابراین با توجه به اهمیت این باکتری در ایجاد بیماری‌های حاد، دوز عفونی کننده پایین، داشتن عوامل بیماری زایی گوناگون و امکان انتقال آن از مواد غذایی روش‌های مناسب برای پیشگیری و بهبود بیماری می‌تواند از نظر بهداشتی بسیار مهم باشد.

در مطالعات مختلف اثر پروبیوتیک ها در ممانعت و درمان طیف وسیعی از بیماری‌های روده‌ای به اثبات رسیده است (۱۱). پروبیوتیک‌ها به گروهی از ارگانیسم‌های غیر بیماری‌زا گفته می‌شود که دارای اثرات سودمندی برای میزبان خود هستند (۱۲). پروبیوتیک‌ها به صورت پودرهای خشک شده و یا به همراه محصولات تخمیری مصرف می‌شوند. این گروه از باکتری ها در قسمت‌های مختلف بدن به ویژه دهان، دستگاه گوارش، دستگاه ادراری تناسلی و دستگاه تنفسی فوقانی نقش مهمی در باز دارندگی عفونت دارند. امروزه استفاده از ارگانیسم‌های پروبیوتیکی مانند لاکتوباسیلوس ها، بیفیدوباکتریوم‌ها، انتروکوکوس ها، کلاستردیوم‌ها و ساکارومیسس ها متداول شده است (۱۳).

انواعی از لاکتوباسیلوس ها و دیگر پروبیوتیک‌ها با تولید اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه، آمینو اسید هایی مانند سیستئین و گلوتامین نقش محافظتی علیه پاتوژن ها در روده ایفا می کنند. به طور کلی پروبیوتیک‌ها با تولید محصولات ضد باکتریایی (مانند باکتریوسین‌ها، بوتریک اسید، متابولیت‌های اکسیژن مثل پراکسید هیدروژن)، تولید اسید های چرب با زنجیره کوتاه، رقابت با باکتری‌های پاتوژن برای اشغال رسپتورهای سطحی و اکتساب مواد غذایی، تولید آنزیم های متفاوت و تجزیه بهتر مواد غذایی، تحریک انتروسیت‌ها برای تولید سیتوکین‌ها، تنظیم و تحریک سیستم ایمنی و اثر بر بیان ژن های بیماریزا می تواند اثرات درمانی سودبخشی را داشته باشد (۱۱، ۱۳ و ۱۴).

بیفیدوباکتریوم‌ها 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 بیفیدوباکتریوم ها استفاده از آن ها در فراورده های لبنی به ویژه ماست متداول شده است (۱۳). هدف از این پژوهش، ارزیابی اثر آنتاگونیسمی ۴ سویه پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم بر علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی می باشد.

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش.

ژن	پرایمر	توالی	اندازه
stx-1	Stx1-F	TTCGCTCTGCAATAGGTA	۵۵۵ bp
	Stx1-R	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	
eae-A	Eae-F	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	۴۲۵ bp
	Eae-R	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	
stx-2	Stx2-F	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	۱۱۸ bp
	Stx2-R	AGGGGTCGATATCTCTGTCC	
hly	Hly:F	CGCAACAAACTGAAGCAAAGG	۲۱۰ bp
	Hly:R	TTGGCGGCACATTTGTCAC	

مواد و روش ها

الف) سویه میکروبی وشرایط رشد: سویه‌های پروبیوتیک بیفیدوباکتریوم انیمالیس (*B. animalis*)، بیفیدوباکتریوم لاکتیس (*B. lactis*)، بیفیدوباکتریوم لانگوم (*B. longum*) و بیفیدوباکتریوم 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 سویه‌ی کنترل تهیه شد. چندین سویه باکتری اشریشیا کلی O157:H7 از حیوانات اهلی جدا شد که برای تمامی آن ها تست‌های بیوشیمیایی، آنتی سرم اختصاصی اشریشیا کلی O157:H7 و PCR انجام شد. تمام جدایه های اشریشیا کلی O157:H7 در محیط براین هارت اینفیوژن براث (BHI) و تریپتون سویا برث (TSB) و در شرایط هوازی ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری گردید. بیفیدوباکتریوم‌ها در De Man-Rogosa_Sharp و محیط MRS در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد وشرایط بی هوازی به مدت ۲۰ ساعت گرماگذاری شد (۱۵و۱۶).

به وسیله روش PCR چندگانه ویروتایپینگ سویه‌های اشریشیا کلی *O157:H7* انجام شد و سویه‌های 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 میکرولیتر از کشت ۲۴ ساعته باکتری اشریشیا کلی O157:H7 به رده سلولی ورو تلقیح و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در آنکوباتور واجد ۵٪ CO_2 گرماگذاری شد. سپس اثرات تخریب سلولی (CPE) در زیر میکروسکوپ معکوس (Invert Microscope) ارزیابی شد. سویه‌های 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 تست‌های 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 میکرولیتر حاوی Tris-HCL با غلظت ۱۰mM، MgCl2 با غلظت ۳mM، dNTPs با غلظت ۰/۲mM، KCl با غلظت ۱۰mM، ۱ واحد آنزیم DNA پلیمراز Taq، ۲۰ پیکومول از هر یک از پرایمرها (جدول ۱) و ۱ میکرولیتر DNA انجام شد. واکنش در دستگاه ترموسایکلر اپندورف با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت 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 برماید 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

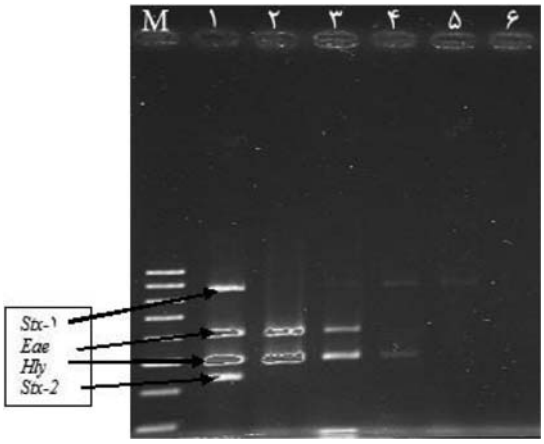
رویی به یک لوله استریل منتقل گردید. سپس دوبار از فیلتر ۰/۲ میکرومتر برای اطمینان از جداسازی باکتری عبور داده شد. همچنین کشت ۲۰ ساعته بیفیدوباکتریوم‌ها در دور ۳۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و محلول رویی آن نیز دو بار فیلتر شد. سپس لوله‌های حاوی محلول رویی حاصل از رشد باکتری‌ها، قبل از مطالعه در حرارت 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 بیفیدوباکتریوم نگهداری شده به مدت ۲۰ ساعت در محیط MRS اندازه گیری گردید و سپس با استفاده از محلول ۰/۱NaOH درصد pH آن خنثی گردید و سپس مراحل یاد شده درمورد آن تکرار گردید (۱۶).

ح) تهیه‌ی رقت های متفاوت: برای تهیه مقدار غلیظ شده‌ی محلول رویی ۳ لوله استریل تهیه و مقدار ۸ سی‌سی از محلول رویی را در هر کدام ریخته و در یخچال قرار داده، پس از آنکه مقدار آن ها به ۱، ۲ و ۴ سی‌سی 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 یا انتشار در آگار (Agar diffusion assay) استفاده شد. از سوسپانسیون باکتریایی اشریشیا کلی *O157* دارای ژن‌های 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 شماره‌گذاری حفره ها رقت‌های مختلف پروبیوتیک درون آن‌ها 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 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 پلیت‌های مولر هینتون به وسیله دستگاه پانچ، چاهک‌های 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 پروبیوتیک‌ها و محلول رویی حاصل از آن‌ها 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 یافته‌های این پژوهش از نسخه‌ی ۱۱/۵ نرم افزار SPSS و آزمون مربع کای برای آن‌ها استفاده گردید. مرز معنی داری در $p<۰/۰۵$ قرار داده شد.

نتایج

در این بررسی اثر سویه‌های بیفیدوباکتریوم روی سویه استاندارد اشریشیا کلی O157:H7 و ۸۴ سویه باکتری جدا شده از نمونه‌های بالینی دارای ژن‌های بیماری زا در شرایط آزمایشگاه ارزیابی شد.

همه‌ی کلنی‌های تخمیرکننده لاکتوز در تست‌های 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 ژن‌های بیماری‌زای شیگا توکسین (*stx-1* و *stx-2*)، *hly* و *eaeA* با روش PCR چندگانه انجام شد. نتایج PCR نشان داد که برخی از سویه‌ها (۳درصد) دارای هر ۴ ژن و ۶۵ درصد نمونه‌ها یک تا ۴ ژن یاد شده را داشتند (تصویر۱).

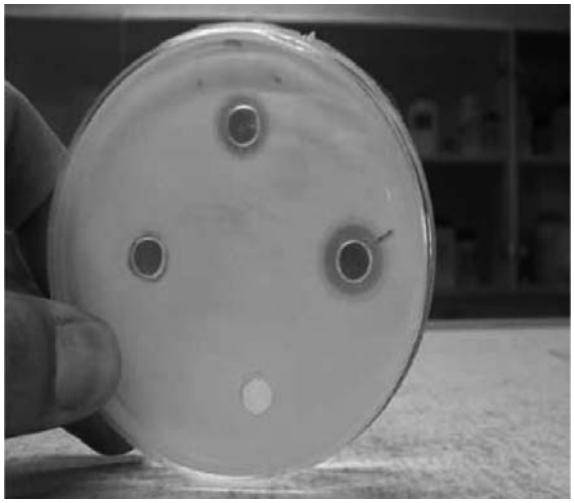
سپس با استفاده از روش انتشار در آگار خاصیت ضد باکتریایی پروبیوتیک‌ها علیه اشریشیاکلی O157:H7 دارای ژن‌های متفاوت ارزیابی شد. به طور کلی در اطراف چاهک‌های حاوی پروبیوتیک روی پلیت های مولر هینتون آگار پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری هاله‌ی عدم رشد باکتری های *E.coli* O157:H7 آشکار گردید (تصویر۲). قطر هاله عدم رشد با توجه به میزان پروبیوتیک بین ۱۵ تا ۳۰ میلی متر بود.

با اینکه هاله عدم رشد باکتری‌های اشریشیاکلی 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 (*eae* و *hly*) تفاوت معنی‌داری نداشت ($p<۰/۰۵$). همچنین هاله عدم رشد اشریشیا کلی‌های واجد ژن *stx-2* به تنهایی مشابه هاله عدم رشد دیگر پروبیوتیک ها بود. پروبیوتیک ها تقریبا به یک اندازه اثر بازدارندگی روی رشد اشریشیاکلی‌های واجد یک یا چند ژن داشتند.

پروبیوتیک ها و محلول رویی حاصل از رشد آن ها با pH خنثی نیز توانست رشد اشریشیاکلی O157:H7 را در شرایط آزمایشگاه مهار کند. اسیدهای آلی با pH خنثی اثر قابل ملاحظه‌ای روی مهار رشد اشریشیاکلی O157:H7 نداشت (تصویر۳).

بحث

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



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

شرایط آزمایشگاهی و درون سلولی نشان داده اند که سویه‌های 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 لاکتوباسیلوس‌ها به وسیله Ogunbanw و همکاران در سال ۲۰۰۳ مورد بررسی قرار گرفت. محققین یاد شده با استفاده از روش چاهک نشان دادند که لاکتوباسیلوس‌ها از رشد اشریشیا کلی، باسیلوس سرئوس و یرسینیا 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 پاتوژن‌های روده‌ای شامل شیگلا دیسانتری، سالمونلا تایفی موریوم و اشریشیاکلی 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 گسترده‌ای از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی پاتوژن اثرات بازدارنده رشد دارد (۱۷و۲۰). نفوذ مواد مترشحه توسط پروبیوتیک‌ها و محلول رویی آن ها در ژل با تأثیر بر روی اشریشیا کلی O157:H7 سبب مهار رشد آن‌ها می‌گردد. پروبیوتیک‌ها با تولید اسید های چرب با زنجیره ی کوتاه، آمینواسیدهایی از جمله سیستئین و گلوتامین نقش محافظتی خود را علیه پاتوژن‌های روده‌ای ایفا می‌کند. همچنین آن‌ها با

تولیدآنزیم‌های متفاوت (پروتئاز و لیپازها)، و اثر روی بیان ژن‌های بیماری زای باکتری‌های پاتوژن، اثر مهاری خود را روی آن‌ها ایفا می کند. اثر باکتریوسیدال (کشنده) بیفیدوباکتریوم‌ها علیه رشد اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاه این مساله را تایید ساخت (۱۰).

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

Gopal و همکاران نیز در سال ۲۰۰۱ اثر ضد میکروبی محلول رویی غلیظ شده بیفیدوباکتریوم‌ها بر علیه اشریشیا کلی O157:H7 در شرایط آزمایشگاهی با روش AGD نشان دادند. همچنین محققین یاد شده نشان دادند که افزایش غلظت محلول رویی 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 آن‌ها، روی سویه‌های اشریشیاکلی O157:H7 واجد ژن‌های بیماری زای مختلف بر خلاف نتایج درون سلولی (In vivo) اثر معنی داری وجود ندارد (۲۳).

Takahashi وهمکاران نیز اثر ضد باکتریایی محلول رویی خنثی شده (pH ۷) پروبیوتیک ها را علیه باکتری‌های 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 پروبیوتیک‌ها نیز می‌تواند بر رشد سویه پاتوژن اشریشیا کلی O157:H7 اثر مهاری داشته باشد.

Gibson و Wang نشان دادند سویه‌های *B. longum* و *B. infantis* می‌توانند برعلیه 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

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 نمی‌تواند باشد (۱۵). به همین دلیل در این پژوهش ما نیز اثر آنتاگونیسمی اسیدهای آلی بر رشد باکتری اشریشیاکلی O157:H7 مورد بررسی قرار دادیم. نتایج نشان دادکه اسیدهای آلی نمی‌توانند اثر قابل ملاحظه ای برعلیه این باکتری ایجاد نمایند. به نظر می رسد که عوامل دیگری مانند باکتریوسین‌ها، تولید و ترشح متابولیت های آلی و گلیکولیپیدهایی با فعالیت بیولوژیک قوی در اثر مهاری بر علیه این باکتری می‌تواند نقش تعیین کننده داشته باشد. اثر اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها 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 می‌تواند زمینه استفاده کاربردی آنها در انسان را فراهم آورد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که سویه‌های مختلف بیفیدوباکتریوم به عنوان پروبیوتیک قادر به مهار رشد اشریشیا کلی O157:H7 مولد شیگا توکسین در شرایط آزمایشگاهی می‌باشد. اما برای استفاده از پروبیوتیک ها به منظور پیشگیری و درمان بیماری‌های 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 دراختیار قرار دادن سویه‌های پروبیوتیک و راهنمایی‌های 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 chengesin Epithelial Barrier Faunction. Infection and Immunity, 2008; 1340-1348.
2. Tarr PI, Grodon CA, Chandler WL. Shiga toxin producing *Escherichia coli* and hemolytic uremic syndrom. Lancet, 2005; 41:219-226.
3. Pamela HR, Davis KC, Garstka WR, Bhunia AK. Lactat dehydrogenase realase 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 *Clostridum butricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS immunology and medical microbiology, 2004; 41:219-226.
5. Momose Y, Hirayam K, Iton K. Effect of organic acids on inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 colonization in gnotobiotic mice associated with infant intestinal microbiota. Antonie Leeu Wenhoek, 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. Appled 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 Clostridum butricum on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by mice. FEMS Immuonology and medical microbiology, 2004; 41:219-226.
8. Konada EY, Parken JC, Tran HT, Bryla DA, Robbins JB, Szo SC. Investigation vaccine for Escherichia, pseodomonas aeruginosa recombinant exoprotein A conjugates in adults. Jinfect 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. Propiotic reduce Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6-Induced chenges 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. Mkcp 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 orgin. Food microbiology. 2004; 92:69-78.
16. Trejo FM, Minnaard J, Perez FP, DE Antoni GL. Inhibition of Closttridum difficle by Bifidobacterium supernatants. Anearobe, 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 Lactobcillus 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 Bifidobacterum lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Eschrichia 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.

Journal of Microbial World
Volume 2, No. 3, 2009

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

Najmeh Namdar[1], Yahya Tahamtan[2], Mohammad Kargar[3], Mohammad Hosein Hoseini[2]

[1]M.Sc. Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researcher's Clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi vaccine and Serum Research Institute, Shiraz, Iran.
[3]Associate 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-born 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