مطالعه تأثیر برخی از پروبیوتیک‌ها بر سرعت رشد *سالمونلا پاراتیفی* در شیر در شرایط رشد توأمان

حمید میرزائی[1*]، افشین جوادی[1]، یوسف انگوری[2]

۱. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
۲. دانش آموخته دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران
* نویسنده مسؤول مکاتبات: hmirzaii@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۸۷/۸/۷، پذیرش نهایی: ۸۹/۱۱/۲٦)

چکیده

هدف از مطالعه حاضر تعیین تأثیر پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی*، *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* بر سرعت رشد *سالمونلا پاراتیفی* در شرایط رشد توأمان در شیر می‌باشد. برای این منظور، ابتدا به داخل ۵۰۰ میلی‌لیتر شیر استریل، cfu/ml ۱/۵×۱۰^۸ باکتری *سالمونلا پاراتیفی* فعّال شده اضافه و بعد از همگن‌سازی در ۵ ارلن‌مایر استریل به‌طور مساوی توزیع شد. ارلن اول به‌عنوان کشت انفرادی لحاظ گردید و به ارلن‌های دوم تا پنجم به ترتیب cfu/ml ۱/۵×۱۰^۸ از باکتری‌های پروبیوتیک فوق‌الذّکر تزریق و بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، pH و تعداد *سالمونلا پاراتیفی* موجود در هر میلی‌لیتر از آن‌ها به‌ترتیب با استفاده از pHمتر و کشت مخلوط در محیط سالمونلا شیگلا آگار (SSA) محاسبه گردید. این عملیّات ۱۰ بار تکرار و میانگین pH و *سالمونلا پاراتیفی* موجود در هر میلی‌لیتر از کشت انفرادی و کشت‌های توأمان با پروبیوتیک‌ها با استفاده از آزمون‌های آماری مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون تعقیبی توکی در سطح α=۰/۰۵ در ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری، رشد توأمان *لاکتوباسیلوس کازئی*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به‌طور معنی‌دار رشد *سالمونلا پاراتیفی* را مهار کردند (p<۰/۰۱). لکن در همین شرایط تأثیر مهاری رشد توأمان *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* معنی‌دار نبود. در ضمن در ۲٤ و ٤۸ ساعت اول گرمخانه‌گذاری، رشد توأمان پروبیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، pH نمونه‌های شیر را در مقایسه با نمونه شاهد به‌طور معنی‌دار کاهش دادند (p<۰/۰۱). در مجموع می‌توان گفت که مصرف محصولات حاوی *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* می‌تواند در جلوگیری از بروز عفونت با *سالمونلا پاراتیفی* واقع شود. البتّه انجام مطالعات بیشتر در این زمینه به‌ویژه در شرایط بدن موجود زنده ضرورت دارد.

مجله دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، ۱۳۸۹، دوره ٤، شماره ۳، پیاپی ۱۵، صفحات: ۸۸۲-۸۷۵.

کلید واژه‌ها: *سالمونلا پاراتیفی*، پروبیوتیک‌ها، رشد توأمان، شیر

مقدمه

دستگاه گوارش انسان خاستگاه طبیعی جمعیّت بزرگ و پویایی از باکتری‌ها می‌باشد (۱۷). این اکوسیستم پیچیده دارای

حدود بیش از ۵۰۰ گونه باکتری است (۳). اطّلاعات زیادی درباره نقش مهّم این باکتری‌ها در حفظ سلامتی و پیشگیری از بیماری‌ها به‌دست آمده است (۱۹ و ۲۳). تخریب فلور کولون توسط پاتوژن‌ها، آنتی‌ژن‌های غذایی و یا دیگر مواد آسیب‌رسان می‌تواند منجر به اختلال عملکردی روده‌ای شود (۲، ٤، ۵، ١٦، ۲۳، ۲۸ و ۳۰). لاکتوباسیل‌ها و بیفیدیوباکتریوم‌ها که دارای پیشینه طولانی در تولید محصولات لبنی هستند، به‌طور سنتی در فرآورده‌های پروبیوتیکی برای محافظت از چنین اثرات زیان‌بار مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۳).

لاکتوباسیل‌ها بلافاصله بعد از تولد نوزاد انسان در لوله گوارش مستقر می‌شوند. در افراد سالم، لاکتوباسیل‌ها به‌طور طبیعی در محوّطه دهانی (10^{3}–10^{4} cfu/g) ، ایلئوم (10^{3}–10^{7} cfu/g) و کولون (10^{4}–10^{8} cfu/g) وجود دارند و این باکتری‌ها در واژن به‌عنوان میکروارگانیسم غالب می‌باشند (۱۸). لاکتوباسیل‌ها دامنه وسیعی از ترکیبات ضد باکتریایی را تولید می‌کنند که شامل کاتابولیت‌های قندی نظیر اسیدهای آلی، کاتابولیت‌های اکسیژن نظیر پراکسید هیدروژن، ترکیبات پروتئینی مانند باکتریوسین‌ها، سایر پپتیدهای با وزن مولکولی کوچک و پروتئین‌ها یا پپتیدهای ضدقارچی، متابولیت‌های آمینواسیدی و چربی نظیر اسیدهای چرب، اسید فنیل لاکتیک، اسید OH-phenyllactic و دیگر ترکیبات نظیر روترین و روتری‌سایکلین می‌باشند (۲۹ و ۳۲). باکتریوسین‌های تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها، پپتیدها یا پروتئین‌های ضد باکتریایی هستند که فقط بر روی باکتری‌های گرم مثبت اثر مهاری از خود نشان می‌دهند. گزارش شده که ترکیبات با وزن مولکولی پایین نظیر اسید لاکتیک فقط در مقابل باکتری‌های بیماری‌زای گرم منفی دارای اثر مهاری می‌باشند (۱ و ۲۵).

بیفیدوباکتریوم‌ها جزئی از فلور طبیعی کولون انسان می‌باشند که به‌طور نسبی به تعداد زیاد وجود دارند (10^{9}– 10^{10} cfu/g). تعداد بیفیدوباکتریوم‌های موجود در لوله گوارش بستگی به سلامت، سن و تغذیه انسان دارد (۲۲). یافته‌های مطالعات مختلف اثرات مفید بیفیدوباکتریوم‌ها را نشان داده‌اند (۱۵، ۲۷ و ۲۸). این باکتری‌ها به سلامت میزبان کمک می‌کنند و این کار را توسط متعادل نمودن میکروب‌های روده‌ای، تخمیر اولیگوساکاریدهایی که غیر قابل هضم می‌باشند و در روده کوچک جذب نمی‌شوند و با ایجاد اثرات روی باکتری‌های دیگر انجام می‌دهند. طبق تحقیقات زیادی مهار دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به‌وسیله بیفیدوباکتریوم‌ها در شرایط *in vitro* و *in vivo* به‌اثبات رسیده است که در مقالات معتبر به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زائی هم‌چون اشریشیاکولی، سالمونلا و روتاویروس اشاره شده است (۱۲ و ۲۹).

مکانیسم‌های متعددی برای عمل مهاری بیفیدوباکتریوم‌ها در مقابل پاتوژن‌های گرم منفی پیشنهاد شده است که شامل کاهش pH محیطی به وسیله تولید اسیدهای آلی، عمل مهاری مولکول‌های تجزیه نشده اسید آلی، رقابت بر سر مواد مغذی، رقابت برای دسترسی به محل‌های اتصال، تحریک سیستم ایمنی میزبان و تولید مواد ضدّ باکتریایی ویژه می‌باشند. اسیدهای آلی به ویژه اسید استیک و اسید لاکتیک دارای خواص مهاری قوی علیه باکتری‌های گرم منفی هستند، با این وجود فقط تعداد کمی از پژوهشگران تولید اسیدهای آلی را تنها فاکتور مسئول برای فعّالیت آنتاگونیستی بیفیدوباکتریوم‌ها دانسته‌اند (۸ و ۹). در بسیاری از گزارشات پیشنهاد شده است که مواد مهاری دیگری نیز ممکن است در اثرات آنتاگونیستی به‌خوبی شرکت کنند (۲۹).

در این مطالعه تأثیر ٤ باکتری پروبیوتیک شامل *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* (*Bifidobacterium angulatum*)، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (*Bifidobacterium bifidum*)، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* (*Lactobacillus acidophilus*) و *لاکتوباسیلوس کازئی* (*Lactobacillus casei*) بر سرعت رشد و تکثیر *سالمونلا پاراتیفی* در محیط شیر در طول ٢٤ تا ٤٨ ساعت نگه‌داری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد (دمای بدن انسان) مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

لاکتوز براث (Lactose broth)، محیط آب پپتونه (Peptone water)، محیط MRS آگار (Man-Rogosa-Sharp)، محیط آگار مغذی (Nutrient Agar)، محیط سالمونلا شیگلا آگار (Shigella Agar Salmonella) (ساخت کارخانه مرک)، سویه‌های *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* PTCC= ١٣٦٦، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* PTCC= ١٦٤٤، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* PTCC= ١٦٤٣، از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران و مایه لاکتیک حاوی سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* ٠١، ساخت کارخانه Hansen CHR از کارخانه شیر پاک تهران و سویه *سالمونلا پاراتیفی* از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز تهیّه گردید. جهت فعّال‌سازی باکتری‌ها طبق پیشنهاد مرکز تولید کننده، سویه‌های پروبیوتیک لیوفیلیزه در ارلن مایرهای حاوی ١٠٠ میلی‌لیتر آب پپتونه و سویه *سالمونلا پاراتیفی* در ارلن مایر حاوی ١٠٠ میلی‌لیتر لاکتوز براث تلقیح شده و محیط‌های حاصله به مدت ٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس جهت تشکیل پرگنه از محتویات ٤ ارلن حاوی پروبیوتیک‌های فعّال شده در ٤ پلیت حاوی MRS آگار در شرایط بی‌هوازی و از محتویات ارلن حاوی باکتری *سالمونلا پاراتیفی* فعّال شده در پلیت حاوی آگار مغذی در شرایط هوازی به‌صورت سطحی (Surface plate method) کشت و به مدّت ٤٨-٢٤ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. سپس حدود $1/5\times10^{8}$ CFU/ ml از *سالمونلا پاراتیفی* در ٥٠٠ میلی‌لیتر از نمونه شیر استریل تلقیح شده و بعد از حدود ١٥ دقیقه همگن‌سازی در ٥ ارلن‌مایر ١٠٠ میلی‌لیتری استریل به‌طور مساوی توزیع گردید. ارلن اول به‌عنوان کنترل بوده و به ارلن‌های دوم تا پنجم به ترتیب حدود $1/5\times10^{8}$ CFU/ ml از پروبیوتیک‌های فوق‌الذّکر تزریق گردید و ارلن‌های حاصله به مدّت ٢٤ تا ٤٨ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری و pH نمونه‌ها با دستگاه pHمتر اندازه‌گیری شد. سپس از محتویّات ٥ ارلن در ٢٤ ساعت اول بعد از گرمخانه‌گذاری تا 10^{-7} و در ٢٤ ساعت دوم تا 10^{-6} سریال رقت تهّیه گردید و از رقت‌های 10^{-5} تا 10^{-7} در ٢٤ ساعت اول و از رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-6} در ٢٤ ساعت دوم بعد از گرمخانه‌گذاری در محیط SSA به‌روش مخلوط (Pour plate method) کشت داده شد و از پلیت‌های حاوی ٣٠٠-٣٠ عدد پرگنه جهت شمارش پرگنه‌ها و محاسبه تعداد *سالمونلا پاراتیفی* موجود در هر میلی‌لیتر از محتویات آن‌ها استفاده گردید و میانگین pH و تعداد *سالمونلا پاراتیفی* موجود در هر میلی‌لیتر از محتویّات کشت‌های فوق با استفاده از آزمون‌های آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way of Variance Analysis) و آزمون تعقیبی توکی (Tukey) مقایسه شد و جهت محاسبه میزان اثر مهاری هر کدام از پروبیوتیک‌های فوق بر رشد *سالمونلا پاراتیفی* از فرمول زیر استفاده گردید.

$$\text{درصد مهار رشد سالمونلا پاراتیفی} = \frac{\text{تعداد سالمونلا پاراتیفی در کشت توامان} - \text{تعداد سالمونلا پاراتیفی در کشت انفرادی}}{\text{تعداد سالمونلا پاراتیفی در کشت انفرادی}} \times 100$$

یافته‌ها

نتایج مربوط به تأثیر هر یک از پروبیوتیک‌های مذکور بر تعداد سالمونلا پاراتیفی و pH محیط شیر در شرایط رشد توأمان در جداول ۱ و ۲ آورده شده است.

همان‌طوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، بر اساس آنالیز آماری، میانگین تعداد *سالمونلا پاراتیفی* در نمونه‌های کشت حاوی *S. paratyphi* ،*S. paratyphi + L.acidophilus* *B.bifidum*+ و *S. paratyphi +L.casei* بعد از ٢٤ و ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری به‌طور معنی‌دار کمتر از میانگین آن در کشت حاوی *S. paratyphi* تنها می‌باشد ($p<$۰/۰۱). بر اساس نتایج حاصله، رشد توأمان *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم*، *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم*، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* در ٢٤ ساعت به‌ترتیب ١٤/٠١، ٣٥/٧٤، ٢٩/٦٤ و ٥٠/٩٣ درصد و در ٤٨ ساعت به ترتیب ٣٠/٨٨، ٥٠/٦١، ٤٤/١٨ و ٥٦/٤٩ درصد رشد *سالمونلا پاراتیفی* را مهار نمود.

جدول ۱- میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد تعداد سالمونلا پاراتیفیدر کشت‌های تحت مطالعه (Log CFU/ml)

نوع کشت	تعداد *سالمونلا پاراتیفی* بر حسب Log CFU / ml							
	بعد از ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری				بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری			
	N	Mean	SD	SE	N	Mean	SD	SE
S. paratyphi	١٠	٨/٣٣٥^{d}	٠/٢٨٣	٠/٠٥٠	١٠	٧/٦٣٥^{d}	٠/١٦٥	٠/٠٢٩
S. paratyphi+B. angulatum	١٠	٨/٠٥٦^{cd}	٠/٤٣٤	٠/٠٧٧	١٠	٧/٥٦٠^{cd}	٠/١٨٧	٠/٠٣٣
S. paratyphi +B. bifidum	١٠	٧/٥٩٩^{ab}	٠/٦٨٦	٠/١٢١	١٠	٧/٣٨٠^{ab}	٠/٢٦١	٠/٠٤٦
S. paratyphi+L. acidophilus	١٠	٧/٧٧٠^{bc}	٠/٦٠٨	٠/١٠٧	١٠	٧/٤٤٩^{bc}	٠/٢٣٤	٠/٠٤١
S. paratyphi + L. casei	١٠	٧/٢٣٩^{a}	٠/٩١٢	٠/١٦١	١٠	٧/٢٢١^{a}	٠/٣٥١	٠/٠٦٢

خطای استاندارد=SE انحراف معیار=SD میانگین=Mean تعداد تکرار آزمایش=N

a، b، c و d: در هر ستون تفاوت بین میانگین‌هائی که حروف مشترک ندارند، معنی‌دار می‌باشد.

جدول ۲- میانگین، انحراف معیار و خطای استاندارد pH در کشت‌های تحت مطالعه

نوع کشت	بعد از ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری				بعد از ٢٤ ساعت گرمخانه‌گذاری			
	N	Mean	SD	SE	N	Mean	SD	SE
S. paratyphi	١٠	٥/٣٢٧^{b}	٠/١٠٥	٠/٠٣٠	١٠	٥/٧١٦^{c}	٠/٢٦٠	٠/٠٨٢
S. paratypli+B. Angulatom	١٠	٥/٢٩٣^{b}	٠/١٧١	٠/٠٥٠	١٠	٥/٥٧٤^{bc}	٠/٢٧١	٠/٠٨٦
S. paratypli+B. Bifidum	١٠	٤/٦٩٨^{a}	٠/٥٥٢	٠/١٥٩	١٠	٤/٩٦٨^{ab}	٠/٦٢٥	٠/١٩٨
S. paratypli+L. acidophilus	١٠	٤/٦٣٢^{a}	٠/٤٠٥	٠/١١٧	١٠	٥/٠٥٢^{ab}	٠/٥٢١	٠/١٦٥
S. paratyphi + L. casei	١٠	٤/٣٣٧^{a}	٠/٤٦٠	٠/١٣٣	١٠	٤/٨١٨^{a}	٠/٦٨٠	٠/٢١٥

خطای استاندارد=*SE* انحراف معیار=*SD* میانگین=*Mean* تعداد تکرار آزمایش=*N*

a، b و c: در هر ستون تفاوت بین میانگین‌هائی که حروف مشترک ندارند، معنی‌دار می‌باشد

همان‌طورکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، بر اساس آزمون آماری میانگین مقدار pH در نمونه‌های کشت حاوی *S. paratyphi +B.* ،*S. paratyphi +L. acidophilus* و *S. paratyphi +L. casei bifidum* بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری به‌طور معنی‌دار کمتر از میانگین آن در کشت حاوی *S. paratyphi* تنها می‌باشد ($p<۰/۰۱$). ولی تفاوت بین میانگین pH در نمونه‌های حاوی کشت‌های *S. paratyphi* تنها و *S. paratyphi +B. angulatum* بعد از ۲٤ و ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری غیر معنی‌دار بود.

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، رشد توامان *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* به‌طور معنی‌دار اثر مهاری بر *سالمونلا پاراتیفی* دارد ($p<۰/۰۱$) و بر اساس نتایج مندرج در جدول ۲، کاهش pH می‌تواند یکی از عوامل این اثر مهاری مطرح شود. این نتایج توسط گزارشات Gibson و Wang مورد تأیید قرار گرفته‌اند (١٤). آن‌ها پی‌بردند که خاصیّت مهاری *بیفیدوباکتریوم ایفنتیس* بر علیه *اشریشیا کولی* و *کلستریدیوم پرفرنجنس* تنها مربوط به تولید اسید نمی‌باشد. در واقع پیشنهاد می‌شود که متابولیت‌های پایه تنها فاکتورهای مؤثر در عمل مهاری نیستند. فاکتورهای دیگر شامل رقابت بر سر مواد غذایی، تغییرات پتانسیل اکسیداسیون–احیا، هم‌چنین H2O2، دی‌استیل و باکتریوسین، مواد مهاری شبه باکتریوسین تولید شده به‌وسیله بعضی از سویه‌های بیفیدوباکتریوم و لاکتوباسیل می‌باشند. این مورد به‌طور کلی پذیرفته شده است که اثر مهاری لاکتوباسیل‌ها و بیفیدوباکتریوم‌ها نتیجه عمل متقابل این فاکتورها می‌باشد (١٤).

تولید ترکیبات ضد باکتریایی ویژه به‌وسیله بیفیدوباکتریوم‌ها قبلاً گزارش شده است. برای مثال دو سویه بیفیدوباکتریوم از مدفوع نوزادان جدا شده‌اند که دارای فعالیت کشندگی قوی علیه چندین باکتری بیماری‌زا هستند. این باکتری‌ها شامل سالمونلا انتریتیکا سروتیپ تیفی‌موریوم SL1344 و *اشریشیاکولی* C1845 می‌باشند. این اثر کشندگی به تولید توده‌هایی با وزن مولکولی کوچک بالقّوه و مولکول‌های لیپوفیلیک نسبت داده شده‌اند. علاوه بر این مواد ضدّ باکتریایی تولید شده به‌وسیله بیفیدوباکتریوم سویه اینفنتیس که بر علیه *اشریشیا کولی* مؤثر می‌باشند، توسّط تقطیر متانول/استون مورد تغلیظ قرار گرفتند (١٥). یک توده پروتئینی با وزن مولکولی پایین به‌نام BIF که به‌وسیله *بیفیدوباکتریوم لانگوم* تولید می‌شود تنها ترکیب فعّال در برابر باکتری گرم منفی است که تا به‌حال شناسایی شده است (١٠، ١١ و ١٢). این پروتئین به‌طور مستقیم خاصیّت مهاری یا کشندگی ندارد بلکه اتّصال *اشریشیا کولی* به سلول‌های اپیتلیال در انسان را مهار می‌کند. به‌طور مشابه تولید ترکیبات ضدّ باکتریایی ویژه به‌وسیله بیفیدوباکتریوم‌ها در گزارشات دیگر نیز پیشنهاد شده است (١٣).

در مطالعات دیگری نشان داده شده است که مهار *سالمونلا انتریتیکا* سروتیپ تیفی موریوم SL1344 و *اشریشیا کولی* C1845 به‌طور مستقیم مربوط به تولید اسیدهای آلی و کاهش pH محیط می‌باشد. البتّه نمی‌توان ترکیبات ضدّ باکتریایی دیگر را نادیده گرفت ولی شرکت آنها در مهار این پاتوژن‌های گرم منفی ناچیز به‌نظر می‌رسد. به‌نظر حضور اسیدهای آلی اساسی‌ترین مکانیسم مهار بیفیدوباکتریوم‌ها می‌باشد. اسیدهای آلی به‌صورت مولکول کامل وارد باکتری‌ها شده و در درون سیتوپلاسم باکتری تجزیه می‌شوند. کاهش نهایی pH درون سلول باکتری و تجمّع فرم یونیزه اسیدهای آلی در درون باکتری منجر به مرگ پاتوژن می‌شود (٢٦). همان‌طوری‌که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، رشد توأمان *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* بر خلاف *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* اثر مهاری بر *سالمونلا پاراتیفی* نداشته است. این نتایج با یافته‌های سایر پژوهشگران در این‌که که فعالیّت ضدّ باکتریایی بیفیدوباکتریوم‌ها از سویه‌ای به سویه دیگر متفاوت است، مطابقت دارد. این نتایج نشان می‌دهند که انتخاب سویه‌های بیفیدوباکتریوم به‌عنوان پروبیوتیک بایستی به‌دقّت بر اساس ملاک‌های مورد نظر انجام گیرد (٢٠). بر

اساس نتایج حاصل از تحقیق حاضر، *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* اثر مهاری معنی‌دار بر *سالمونلا پاراتیفی* دارند ($p<۰/۰۱$) و کاهش pH محیط می‌تواند یکی از عوامل این اثر مهاری مطرح شود. این موضوع به‌طور کامل مورد قبول واقع شده که اسیدهای آلی ضعیف هم‌چون اسید لاکتیک فعالیّت ضدّ باکتریایی قوی از خود نشان می‌دهند (۱). اسید لاکتیک در کولون انسان در غلظت‌های پایین وجود دارد. این اسید به‌عنوان یک محصول واسطه در تخمیر کربوهیدرات‌ها تولید می‌شود. در کولون این اسید آلی به اسیدهای چرب کوتاه زنجیر تبدیل شده، که می‌توانند غلظتی بالای ۱۰۰ mM را داشته باشند و بنابراین اسید لاکتیک به‌عنوان یکی از عوامل ضدّ باکتریایی بر علیه پاتوژن‌های گرم منفی می‌تواند عمل کند (۷، ۲۲ و ۳۱). بر اساس استنباط بعضی از محقّقین تنها در گزارشات معدودی تولید اسیدهای آلی به عنوان فاکتور اصلی در فعالیّت لاکتوباسیل‌ها بر علیه باکتری‌های گرم منفی پیشنهاد شده است (۱۳ و ۲۵). در مقابل، در بسیاری از مطالعات، تولید ترکیبات ضدّ باکتریایی دیگر علّت فعالیّت لاکتوباسیل‌ها علیه سالمونلا و اشریشیاکلی گفته شده است (۲۹). پیش از این نشان داده شده است که مواد مهاری نظیر مولکول‌های هیدرواستاتیک و آروماتیک مانند mevalonolactone که به‌وسیله *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* تولید می‌شوند تنها در pHهای پایین و در حضور اسید لاکتیک بر علیه باکتری‌های گرم منفی فعالیّت می‌کنند (۲٤). مهم‌تر این‌که اسید لاکتیک فعالیّت خود را از طریق نفوذپذیر ساختن دیواره باکتری گرم منفی انجام می‌دهد و بنابراین فعالیّت ضدّ باکتریایی دیگر ترکیبات مهاری را باعث می‌شود (۱). علاوه بر این اسید فنیل لاکتیک و اسید OH-phenyllactic به‌طور گسترده توسط لاکتوباسیل‌ها تولید می‌شوند و طیف وسیعی از فعالیّت ضد قارچی را در غلظت‌های ۴۰۰–۱۰۰ µM نشان می‌دهند (۲۱ و ۳۲). همچنین اسید فنیل لاکتیک در غلظت‌های ۸۰–۲۰ mM فعالیت مهاری علیه باکتری‌های گرم مثبت *لیستریا مونوسیتوجنز*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *آنتروکوکوس فکالیس* و همچنین علیه باکتری‌های گرم منفی از قبیل ***Providecia stuartii*** و ***Klebsiella oxytoca*** را نشان می‌دهد (٦).

در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که اگر سلول‌های زنده *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* و *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و *لاکتوباسیلوس کازئی* از طریق مصرف فرآورده‌های مناسب حاوی آن‌ها در دستگاه گوارشی انسان مستقر گردند، می‌توانند در پیشگیری از بروز بیماری‌های ناشی از *سالمونلا پاراتیفی* مفید باشند. البتّه انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه به‌خصوص در شرایط بدن موجودات زنده ضرورت دارد.

منابع

1. Alakomi, H.L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane, Appl. Environ. Microbiol. 66:2001-2005.
2. Bartlett, J.G., Chang, T.W. and Gurwith, M. 1987. Antibiotic-associated pseudomembranous colitis due to toxin-producing clostridia. N. Engl. J. Med. 57:141-145.
3. Blaut, M.D., Collins, M., Welling, G.W., Dore, J., van Loo, J. and de Vos, W. 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: The EU human gut flora project. British Journal of Nutrition. 87:203-211.
4. Borgia, M., Sepe, N., Brancato, V. and Borgia, R.A. 1982. A controlled clinical study on *Streptococcus faecium* preparation for the prevention of side reactions during long-term antibiotic therapy. Curr. Ther. Res. 31:265-271.
5. Colombel, J.F., Corot, A., Neut, C. and Romond, C. 1987. Yoghurt with *Bifidobacterium longum* reduces erythromycin-induced gastrointestinal effects. Lancet. 2:43.
6. Dieuleveux, V., Lemarinier, S. and Gueguen, M. 1998. Antimicrobial spectrum and target site of D-3-phenyllactic acid. Int. J. Food Microbiol. 40:177-183.

7. Duncan, S., Louis, P. and Flint, H.J. 2004. Lactate-utilizing bacteria, isolated from human faeces that reduce butyrate as a major fermentation product. Appl. Environ. Microbiol. 70:5810-5817.
8. Fooks, L.J. and Gibson, G.R. 2002. In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens, FEMS Microbiol. Ecol. 39:67-75.
9. Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. 1997. Proteinaceous factor(s) in culture supernatant fluids of Bifidobacteria which prevents the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* to gangliotetraosylceramide. Applied and Environmental Microbiology. 63:506-512.
10. Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. 1999. Purification and characterization of a novel protein produced by *Bifidobacterium longum* SBT2928 that inhibits the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 (CFA/II) to angliotetraosylceramide. Journal of Applied Microbiology. 86:615-621.
11. Fujiwara, S., Hashiba, H., Hirota, T. and Forstner, J.F. 2001. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: Suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliotetraosylceramide on the cell surface. International Journal of Food Microbiology. 67:97-106.
12. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66:365-378.
13. Gagnon, M., Kheadr, E.E., Le Blay, G. and Fliss, I. 2004. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by bifidobacterial strains of human origin. International Journal of Food Microbiology. 92:69-78.
14. Gibson, G.R. and Wang, X. 1994. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. Journal of Applied Bacteriology. 77:412-420.
15. Gomes, A.M.P. and Malcata, F.X. 1999. *Bifidobacterium spp*. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. Trends in Food Science and Technology. 10:139-157.
16. Gorbach, S.L., Chang, T.W. and Goldin, B. 1987. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus GG*. Lancet. 26:1519.
17. Guarner, F. and Malagelada, J.R. 2003. Gut flora in health and disease. Lancet. 361:512-519.
18. Hill, G.B., Eschenbach, D.A. and Holmes, K.K. 1984. Bacteriology of the vagina. Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. 86:23-S39.
19. Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. and Huis in't Veld, J.H. 1998. Overview of gut flora and probiotics. International Journal of Food Microbiology. 41:85-101.
20. Ibrahim, S. and Bezkorovainy, A. 1993. Inhibition of *Escherichia coli* by bifidobacteria. Journal of Food Protection. 56:713-715.
21. Lavermicocca, P., Valerio, F. and Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. Appl. Environ. Microbiol. A 69:634-640.
22. Macfarlane, S. and Macfarlane, G.T. 2003. Regulation of short-chain fatty acid production, Proc. Nutr. Soc. 62:67-72.
23. Marteau, P., Seksik, P. and Jian, R. 2002. Probiotics and intestinal health effects: A clinical perspective. British Journal of Nutrition, 88(Suppl 1):51-S57.
24. Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara. M. 1999. A new type of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 86:29-35.
25. Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, T. and Takeda, Y. 2001. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic Lactobacillus strains due to production of lactic acid. Int. J. Food Microbiol. 68:135-140.
26. Reid, G., Jass, J., Sebulsky, M.T. and McCormick, J.K. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. Clinical Microbiology Reviews. 16:658-672.
27. Salminen, S., Isolauri, E. and Salminen, E. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: Successful strains and future challenges. Antonie Van Leeuwenhoek. 70:347-358.
28. Salminen, S., Ouwehand, A.C. and Isolauri, E. 1988. Clinical application of probiotic bacteria. Int. Dairy J. 8:563-572.
29. Servin, A.L. 2004. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology Reviews. 28:405-440.
30. Siitonen, S., Vapaatalo, H., Salminen, S., Gordin, A., Saxelin, M., Wikberg, R. and Kirkkola, A. 1990. Effect of *Lactobacillus GG*. yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. Ann. Med. 22:57-59.

31. Topping, D.L. and Clifton, P.M. 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides., Physiol. Rev. 81:1031-1064.
32. Valerio, F., Lavermicocca, P., Pascale, M. and Visconti. A. 2004. Production of phenyllactic acid by lactic acid bacteria. An approach to the selection of strains contributing to food quality and preservation. FEMS Microbiol. Lett. 233:289-295.
33. Vaughan, E.E. and Mollet, B. 1999. Probiotics in the new millennium. Nahrung. 43:148-S153.