مطالعه تأثیر رشد توامان پروبیوتیکها (لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدو باکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم) و اشریشیاکولای در شیر استریل تجارتی

دکتر حمید میرزائی*[۱]، دکتر افشین جوادی[۲]، دکترعلی غیاثی خسروشاهی[۳]

چکیده

هدف از این مطالعه بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های لاکتوباسیلوس‌کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم بر سرعت رشد اشریشیاکولای در شرایط آزمایشگاهی و رشد توامان در شیراستریل تجارتی بمنظور ارزیابی اولیه تأثیر مصرف پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و درمان مسمویت‌های غذایی انسان با منشأ اشریشیاکولای می‌باشد. ابتدا بداخل ۴۰۰ میلی لیتر شیر استریل حاوی ۱/۵ درصد چربی،یک میلی لیتر محلول حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ عدد باکتری اشریشیاکولای فعال شده اضافه و بعد از همگن سازی در ۴ ارلن مایر بطور مساوی توزیع شد. ارلن اول بعنوان کشت انفرادی لحاظ شد و به ارلن‌های دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک میلی لیتر محلول حاوی $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ عدد از باکتریهای پروبیوتیک فوق تزریق شد و بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، pH و تعداد اشریشیاکولای در هر میلی لیتر از آنها با استفاده از کشت مخلوط در محیط VRBA شمارش شد. این عملیات۱۰ بار تکرار و میانگین pH و اشریشیاکولای موجود در هر میلی لیتر از کشت انفرادی و کشت های توامان با پروبیوتیک‌ها با استفاده از آزمونهای آماری مورد مقایسه قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که رشد توامان لاکتوباسیلوس‌کازئی و بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم بطور معنی‌دار سرعت رشد اشریشیاکولای را مهار می‌کنند (P<۰/۰۱) ولی اثرمهاری بیفیدوباکتریوم بیفیدوم معنی‌دار نبوده است (P>۰/۰۵). لذا مصرف محصولات حاوی لاکتوباسیلوس‌کازئی بهمراه بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم می‌تواند در جلوگیری از بروز عفونت با اشریشیاکولای مفید واقع شود. البته انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بویژه در شرایط بدن موجودات زنده(In vivo) ضرورت دارد.

واژگان کلیدی: *اشریشیاکولای، لاکتوباسیلوس‌کازئی، بیفیدو باکتریوم آنگولاتوم، بیفید و باکتریوم بیفیدوم، رشد توامان.*

Study on the effect of concurrent growth of some probiotics (Lactobacillus casei, Bifidobacterium angulatum and B.bifidum) and E.Coli in commercial sterilized milk

Mirzaei, H.[*1], Javadi, A.[2], Ghiasi Khosroshahi, A.[3]
1- Department of Food Hygiene, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran*
2- Department of Food Hygiene, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
3- Graduated of veterinary medicine, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran

The purpose of this study was to investigate the effect of *L. casei, B. angulatum and B. bifidum* same-time growth of probiotics *L. casei, B. angulatum and B. bifidum* with *E.coli* in commercial sterilized milk to evaluate the provisional effects of probiotics on *E.coli* food-borne infection in human. At first one ml of solution containing 1.5×10^8 of activated *E.coli* was added to 400 ml of sterilized milk 1.5% fat and after homogenization it was divided equally in four parts. The first parts was considered as individual culture and the other parts recieved one ml of solution containing of 1.5×10^8 of the above probiotics respectively. After 24 hours of incubation at 37 ˚C, pH and the number of *E.coli* per ml was counted using pour plate method in VRBA medium. This procedure was repeated 10 times and the mean of pH and number of *E.coli* in individual culture and experimental cultures were compared. The results indicated that *L.casei* and *B.angulatum* significantly can reduce the growth rate of *E.coli* (P<0.01) but *B.bifidum* can not (P>0.05). Thus the consumption of products containing *L.casei* and *B.angulatum* could be prevent some E.coli infection, however further information respect to invivo experiments should be gathered.

Key words: *E.coli, L.casei, B.angulatum, B.bifidum, Associated growth*

مقدمه

محققین تعاریف مختلفی در خصوص پروبیوتیک‌ها (Probiotics) ارائه نموده و اثرات بسیار متعددی را به آنها نسبت داده‌اند. فولر (Fuller) در سال ۱۹۸۹

*۱- بخش بهداشت مواد غذایی دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز،ایران
۲- بخش بهداشت مواد غذایی دانشگاه دامپزشکی ، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز،ایران
۳- دانش آموخته دکتری حرفه‌ای دامپزشکی،دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان «مکمل غذایی حاوی میکروب‌های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده اثرات مفید در بدن میزبان ایجاد می‌نماید» تعریف نمود که در این تعریف اثرات مفید پروبیوتیک‌ها فقط از طریق میکروفلور روده شناخته شده است. محققین دیگر پروبیوتیک‌ها را تحت عنوان « فرآورده هایی از سلولهای میکروبی یا اجزایی از سلولهای میکروبی که اثر مفیدی روی سلامت و آسایش انسان دارند» تعریف نمودند. براساس این تعریف پروبیوتیک‌ها محدود به میکروبها ی زنده نیستند و اشکال غیر زنده پروبیوتیک‌ها نیز روی سلامت انسان تأثیر می‌گذارند(۴ و ۱۹). بر اساس مطالعات متعددی که بصورت آزمایشگاهی(In vitro) و روی موجودات زنده(In vivo) اعم از جمعیت‌های انسانی و نیز حیوانات مختلف آزمایشگاهی صورت گرفته است خواص بسیار با ارزشی از جمله اثرات ضد جهش‌زا و ضد سرطان‌زایی، تقویت و تحریک سیستم ایمنی بدن، مقاومت در مقابل پاتوژنهای روده‌ای، درمان و پیشگیری اسهالهای ویروسی و باکتریایی، اثر مهاری روی سرطان قولون، اثر پیشگیری روی سرطان مثانه ، تقویت سیستم ایمنی، مهار رشد باکتریهای رودهٔ باریک، درمان عفونت‌های مجاری ادراری – تناسلی، درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط هلیکوباکترپیلوری (Helicobacter pylori) بهبود عدم تحمل لاکتوز و کاهش کلسترول سرم خون و ... را به پروبیوتیک‌ها نسبت داده‌اند (۵، ۷، ۸، ۱۷و۱۹). جنس اشریشیا(Escherichia) حداقل متشکل از ۶ گونه می‌باشد و در این میان اشریشیاکولای گونه‌ای است که بیشترین اهمیت را دارا است. این باکتری عامل بیماری در انسان و دام بوده و عامل اسهال در کشور های در حال توسعه و مکانهای با فقر بهداشتی می‌باشد .جنس اشریشیاکولای شامل ۵ تیپ بیماریزا می‌باشد که هر کدام علایم بالینی خاصی را سبب می‌شوند. بطور کلی اختلالات مربوط به این جنس شامل موارد عفونت‌های سیستم ادراری، بیماری‌های اسهالی، سپتی سمی، مننژیت نوزادان و گاستروآنتریت مسافرینی که به کشورهایی با وضع بهداشتی نامطلوب مسافرت می‌کند، را سبب می‌شوند (۱، ۲و۳). در این مطالعه تأثیر سه باکتری پروبیوتیک شامل لاکتوباسیلوس کازئی (Lactobacillus casei)، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم (Bifidobacterium angulatum)، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (B.bifiidum) بر سرعت رشد و تکثیر اشریشیاکولای در محیط شیر در طول ۲۴ ساعت نگهداری در ۳۷ درجه سانتیگراد مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش کار

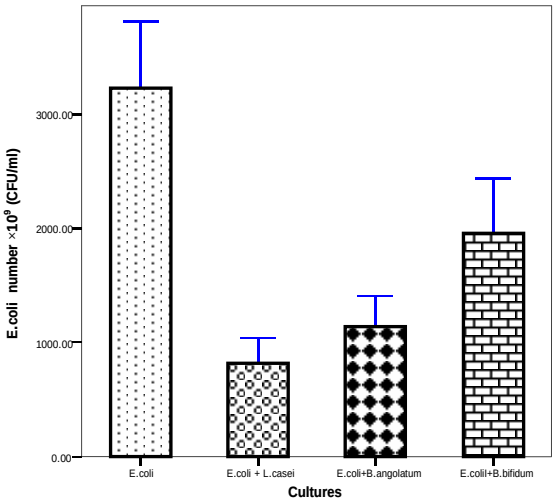
محیط آب پپتونه (Peptone water)، **محیط** MRS آگار (Man-Rogosa -Sharpe)، محیط نوترینت براث (Nutrient broth)، محیط V.R.B.A (Violet Red Bile Agar) (ساخت کارخانه مرک)، سویهٔ بیفیدوباکتریوم بیفیدوم (PTCC=۱۶۴۴)، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم (pTcc=۱۳۶۶)، اشریشیاکولای (pTcc=۱۳۹۹) از کلکسیون قارچها و باکتریهای عفونی ایران وابسته به سازمان پژوهشهای علمی صنعتی ایران، مایهٔ لاکتیک حاوی لاکتوباسیلوس کازئی سویه ۰۱ (ساخت کارخانه HCR HANSEN) از کارخانهٔ شیر پاک تهران تهیه گردید. جهت فعال‌سازی طبق پیشنهاد مرکز تولید کننده سویه‌های پروبیوتیک و اشریشیاکولای لیوفیلیزه به ترتیب در ارلن مایرهای حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط آب پپتونه و نوترینت براث تلقیح و محیط‌های حاصله بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. سپس جهت تشکیل پرگنه از محتویات ۳ ارلن مایر حاوی *لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* فعال شده در ۳ پلیت حاوی محیط MRS آگـار و از محتـویات ارلن حاوی اشریشیاکولای فعال شده در محیط نوترینت آگار بصورت سطحی (Surface plate method) کشت داده، پلیت‌های مربوط

به پروبیوتیک در شرایط بی‌هوازی و بمدت ۴۸ ساعت و پلیت حاوی اشریشیاکولای درشرایط هوازی بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شدند و با استفاده از روش نفلومتر مک فارلند (McFarland) از پرگنه های تشکیل شده رقت های حاوی تعداد مشخص از باکتریهای فوق الذکر تهیه گردید(۱۵) سپس مراحل زیر به تعداد ۱۰ بار تکرار شد: ابتدا ۴۰۰ میلی لیتر شیر استریل تجارتی حاوی ۱/۵ درصد چربی در یک ارلن مایراستریل ریخته شده و یک میلی لیتر از محلول حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ عدد از باکتری اشریشیاکولای (از محلول لوله شماره ۰/۵ مک فارلند) به آن تلقیح و بعد از همگن سازی در ۴ ارلن مایراستریل بطور مساوی توزیع گردید. سپس به داخل ارلن دوم، سوم و چهارم به ترتیب یک میلی لیتر از محلول حاوی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ عدد از باکتریهای لاکتوباسیلوس‌کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم تلقیح شد و به ارلن اول فقط ۱ میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل بعنوان گروه شاهد اضافه گردید و ارلن‌های فوق بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد گرمخانه گذاری شده و متعاقباً pH نمونه‌ها با دستگاه pH سنج اندازه‌گیری و تعداد اشریشیاکولای در هر میلی لیتر از محتویات آنها با استفاده از کشت مخلوط (Pour plate method) در محیط VRBA شمارش شد و میانگین pH ها و تعداد اشریشیاکولای در هر میلی لیتر از محتویات کشت‌های فوق با استفاده از آزمونهای آماری آنالیز واریانس یکطرفه و آزمونT مستقل با همدیگر مقایسه شدند جهت محاسبه میزان اثر مهاری هر کدام از پروبیوتیک‌ها بر رشد اشریشیاکولای از فرمول زیر استفاده گردید:

$$\text{درصدمهاراشریشیاکولای} = \frac{\text{تعداد اشریشیاکولای در کشت توأمان} - \text{تعداد اشریشیاکولای در کشت انفرادی}}{\text{تعداد اشریشیاکولای در کشت انفرادی}}$$

نتایج

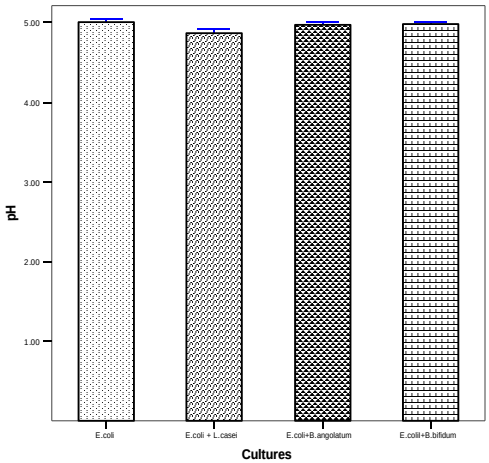
نتایج تحقیق در دو نمودار (۱) و (۲) آورده شده است.



نمودار ۱ : تعداد سلولهای زنده اشریشیاکولای در کشت انفرادی و کشت های توامان با پروبیوتیک‌ها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد

همانطوریکه در نمودار (۱) دیده می شود میانگین تعداد اشریشیاکولای در کشت انفرادی و کشت‌های توامان با لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به ترتیب برابر $۱۰^{۹}\times$ (۱۴۲ ± ۴۷۶)، $۱۰^{۹}\times$ (۶۸± ۱۳۹)، $۱۰^{۹}\times$ (۸۶ ± ۱۸۴) و $۱۰^{۹}\times$ (۱۵۰ ± ۳۲۶) $cfuml^{-1}$ برآورده شدکه بر اساس آزمون تی مستقل(Independent-Samples T test) تعداد سلولهای زنده اشریشیاکولای کشت انفرادی بطور معنی‌دار بیشتر از تعداد آنها در کشت‌های توامان با لاکتوباسیلوس‌کازئی و بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم می‌باشد (P <۰/۰۱) ولی با تعداد سلولهای زنده اشریشیاکولای در کشت توامان با بیفیدوباکتریوم بیفیدوم اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد(P> ۰/۰۵). طبق محاسبه مشخص شد که رشد توامان لاکتوباسیلوس‌کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به ترتیب ۷۰/۷، ۶۱/۲ و ۳۱/۴ درصد

رشد اشریشیاکولای را مهار می‌کنند.



نمودار ۲ : **pH** نمونه شیر حاوی اشر شیاکولای انفرادی و نمونه‌های شیر حاوی اشریشیاکولای توام با پیروبیوتیک‌ها بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در ۳۷ درجه سانتیگراد

همانطور که در نمودار (۲) مشاهده می‌شود pH کشت انفرادی و کشت‌های توامان با لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم و بیفیدوباکتریوم بیفیدوم به ترتیب ۵/۰۱±/۰۰۸، ۴/۸۷±۰/۰۳، ۴/۹۷±۰/۰۲ و ۴/۹۹±۰/۰۱ برآورد شده که بر اساس آزمون آماری آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی توکی(Tukey) pH محیط نمونه‌های شیر مربوط به کشت توامان اشریشیاکولای با لاکتوباسیلوس کازئی و بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم بطور معنی‌دار پائین‌تر از نمونه شیر حاوی اشریشیاکولای تنها برآورد شد (P<۰/۰۱). در صورتی که pH نمونه شیر حاوی کشت توأمان اشریشیاکولای با بیفیدوباکتریوم بیفیدوم نسبت به pH نمونه شیر کشت تنهای اشریشیاکولای اختلاف معنی‌داری نشان نداد(P> ۰/۰۵).

بحث

همانطوریکه در نمودار (۱) نشان داده شده نتایج حاصله از این طرح حکایت از آن دارد که رشد توامان *لاکتوباسیلوس کازئی* و *بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم* بطور معنی‌دار رشد *اشریشیاکولای* PTCC=۱۳۹۹ را مهار می‌کنند و بر اساس نتایج مندرج در نمودار (۲) کاهش pH محیط می تواند یکی از عوامل موثر در این اثر مهاری باشد.این یافته‌ها با نتایج محققین دیگر همخوانی دارد. آنها دریافتند که در شرایط رشد توامان، *بیفیدوباکتریوم اینفنتیس*(B.infantis) اثر مهاری بر رشد*اشریشیاکولای* و کلستریدیوم پرفرجنس دارد و نیز نتیجه گرفتند که این اثر مهاری ضرورتاً مربوط به تولید اسید نمی‌باشد (۱۴). سایر دانشمندان فاکتورهای دیگر از جمله رقابت بر سر مواد مغذی ،تغییر خاصیت اکسید اسیون و احیاءمحیط، تولید موادی مانند آب اکسیژنه، دی استیل، ترکیبات مهاری شبیه باکتریوسین تولید شده توسط تعدادی از سویه‌های بیفیدوباکتریوم و LAB **(**Lactic Acid Bacteria**)** را بر اثر مهاری پروبیوتیک‌ها روی رشد باکتریهای بیماریزا مؤثر گزارش کرده اند(۱۴). در مطالعه دیگری طی یک تحقیق آزمایشگاهی اثر مهاری چند سویه بیفیدوباکتر را بر روی باکتریهای بیماریزای گرم منفی مورد مطالعه قرار داده شد. نتایج حاصله نشان داد که عامل اصلی اثر مهاری بیفیدوباکتریها بر روی سالمونلا آنتریکا **(**S.enterica**)** سروتیپ تیفی موریوم ۱۳۴۴ SL و اشریشیاکولای C۱۸۴۵ تولید اسیدهای آلی و کاهش pH محیط کشت تا ۴/۵ در مدت ۷۲ ساعت می‌باشد. آنها تولید سایر ترکیبات ضد میکروبی را رد نکردند ولی تأکید کردند که تأثیر این مواد در مهار پاتوژنهای گرم منفی ناچیز می‌باشد(۱۳). محقق دیگری گزارش کرده که کشت توأمان لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس‌باعث‌کاهش عمر استافیلوکوکوس اورئوس، شیگلا فلکسنری، اشریشیاکولای، کلبسیلا پنومونیا، باسیلوس‌سرئوس، سودوموناس‌آئروجینوزا و سویه‌های آنتروباکتریاسه در محیط کشت می‌شود. مواد ضد میکروبی

با وزن مولکولی پائین ناشناخته که مستقل از تولید اسیدلاکتیک هستند اثری بر روی سویه های لاکتوباسیلوس یا بیفیدوباکتریوم ندارد. فعالیت ضد میکروبی این باکتری علیه سالمونلا تیفی موریوم در موش آلوده نیز نشان داده شده است (۲۰). این محقق همچنین گزارش نمود که لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس مواد غیر باکتریوسینی (ناشناخته و متفاوت با اسیدلاکتیک) تولید می‌کند که در شرایط آزمایشگاهی به گستردگی، مانع از رشد پاتوژنهای گرم مثبت و منفی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا منوسیتوژنس، سالمونلاتیفی‌موریوم، شیگلافلکسنری،* کلبسیلاپنومونیا، *سودوموناس آئروجینوزا و آنتروباکتریاسه* می‌شود ولی اثر مهاری روی *لاکتوباسیلها و باکتری های بیفیدو* ندارد (۲۰). اثر ضد میکروبی سویه LA۱ *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* علیه هلیکوباکترپیلوری در شرایط آزمایشگاهی و نیز بدن انسان توسط محققان دیگر گزارش شده است (۱۷). در مطالعه دیگری مطرح شد که هر چند سویه‌های پروبیوتیکی قادر به تولید باکتریوسین هستند، ولی نقش آنها در مهار رشد عوامل بیماریزا در بدن موجود زنده محدود خواهد بود، زیرا باکتریوسین‌های این باکتریها فقط بر روی سویه‌های بسیار نزدیک اثر مهاری دارند (۱۰). محققین دیگر به این نتیجه رسیده‌اند که شاید متابولیت هایی با وزن مولکولی پائین (پراکسید هیدروژن، اسیدلاکتیک، اسید استیک و سایر مواد معطر) و متابولیت‌های ثانویه اهمیت بیشتری داشته‌باشند زیرا دامنه عملکرد آنها علیه باکتریهای مضر (مانند *سالمونلا، اشریشیاکولای، کلستریدیوم و هلیکوباکتر*) گسترده می‌باشد (۶). در تحقیق دیگری که به صورت آزمایشگاهی انجام گرفت مشخص شد که *لاکتو باسیلوس کازئی* سویه شیروتا (LCS) در رقابت با باکتریهای دستگاه گوارش در حدود ۴۶ ٪ مانع از اتصال به سطح سلولهای Caco-2 می شوند. در این تحقیق مشخص گردید که بیشترین میزان مهار LCS (بالای۳۰٪) روی اشریشیاکولای TG1، سالمونلاتیفی **موریوم** E10، اشریشیاکولای ATCC(۱۷۷۵) و سالمونلاتیفی موریوم ATCC ۱۴۰۲۸ می‌باشد (۱۲). محقق دیگری مکانیسم‌های مربوط به اثر مهاری لاکتوباسیلها و بیفیدوباکتریا بر روی باکتریهای بیماریزا را کاهش pH محیط روده بوسیله تولید اسیدهای چرب فرار با زنجیره کوتاه، مصرف مواد مغذی و مورد نیاز باکتریهای بیماریزا و تولید ترکیبات ضد میکروبی خاص مانند باکتریوسین‌ها معرفی کرده است (۱۱).در طی یک تحقیق آزمایشگاهی دیگر اثر مهاری تعدادی از سویه‌های بیفیدوباکتر بر روی اشریشیاکلی O_{157} :H ۷ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان می دهد که عامل مهاری بیفیدوباکتریها روی اشریشیاکولای ممانعت از اتصال اشریشیاکولای به سلولهای Caco-2 توسط بیفیدوباکترها است (۱۶). در مجموع نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که رشد توامان لاکتوباسیلوس کازئی‌و بیفیدوباکتریوم آنگولاتوم سرعت رشد اشریشیا کولای را در شیر استریل تجارتی مهار می کنند و در نتیجه این فرضیه تقویت می شود که اگر سلول های زنده این پروبیوتیک ها از طریق مصرف فرآورده‌های مناسب حاوی آنها در دستگاه گوارش انسان مستقر گردند می‌توانند در پیشگیری از بروز عفونت ناشی از اشریشیاکولای و درمان آن مفید باشند. البته انجام تحقیقات بیشتر در این زمینه بخصوص در شرایط بدن موجودات زنده ضرورت دارد.

فهرست منابع

۱- حسنی طباطبایی. ع (۱۳۸۰): بیماری‌های باکتریایی دام، چاپ دوم، دانشگاه تهران: موسسه انتشارات و چاپ دانشگاه تهران. صفحه: ۲۰۷.

۲- جیمز. ام جی (۱۳۷۶): میکروبیولوژی غذایی مدرن،

ترجمه مرتضوی، علی. معتمد زادگان، علی. اعلمی، مهـران. نائب زاده، کوشان. چـاپ اول، مـشهد: انتـشارات دانـشگاه فردوسی مشهد. صفحه:۴۸۴.

۳- رضویلر. و (۱۳۸۱): میکروبهای بیماریزا در مواد غذایی و اپیـدمیولوژی مـسمومیتهای غـذایی، چـاپ دوم، تهـران: موسـسه انتـشارات و چـاپ دانـشگاه تهـران. صـفحات: ۸۴ ـ ۹۵.

۴-میرزایی. ح (۱۳۸۳): پروبیوتیک‌ها و مقدمه‌ای بر کـاربرد آنها در تأمین سلامت انـسان، چـاپ اول، تبریـز: انتـشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز . صفحات: ۲ ـ ۱.

5.Aso, Y., Akaza, h. and BLP study group. (1992): Prophylactic effects of *lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer. Uro.Int. 49 : 1125 ـ 1129.

6.Bielecka, M., Elzbieta, B.,and et al.(1998): Interaction of Bifidobacterium and Salmonella during associated growth. Int. J. Food Microbiol. 45:151-155.

7.Chapman, M.H. and Sanderson, I.R. (2003): Intestinal flora and the mucosal immune system. Annales Nestle. 1: 55 ـ 65.

8.Coconniier, M.H., lirvin, V., Hemery, E. and Servin, A.L. (1998): Antagonistic activity against Helicobacter infection in vitro and in vivo by the human lactobacillus acidophilus strain, L.B.APPL Environ Microbiol. 64: 4573 ـ 4580.

9.Gruewald, K.K. (1982): Serum cholesterol levels in rats fed skim fermented by lactobacillus. J. Food Sci. 47: 2078 ـ 2079.

10.Holzapfel, WH., Haberer, P., Geisen, R., Bjorokroth, J. and Schillinger, U. (2001): Toxonomy and importance features of probiotic microorganisms in food nutrition. Am. J. Clinical Nut. 73 : 365 ـ 373.

11.Laura, J. (2003): Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens campylobacter jejuni and Escherchia coli. Food Microbiol. 9: 231 ـ 242.

12.Lee, Y.k., Puong, K.Y., Ouwehand, A. and Salminen, S. (2003): Displacement of bacterial phatogens from mucus on Caco ـ 2 cell surface by lactobacilli. J. Med. Microbiol. 52: 925 ـ 930.

13.Lefteris, M. and Luc, D.V. (2006): The in vivo inhibition Gram negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acid. Int. Dairy J. 16: 1049 ـ 1057.

14.Lindgren, S. and Dobrogosz, W.J. (1990): Antagonistic Activities of lactic acid bacteria in food and fermentation. 87: 149 ـ 164.

15.McFarland, J.,(1907): Nephelometer:an instrument for estimating the number of bacteria in suspension used for calculating the opsonic index for vaccines. J. Am. Med. Assoc. 14:1176-1178.

16.Melanie, G., Ehab, E.K., Gwenaelle, L.B. and Ismail, F. (2004): In vitro inhibition of Escherchia coli. O157: H 7 by bifidobacterial strains of human origin. Int. J. Food Microbiol. 92 : 69 ـ 78.

17.Michetti, P., Dorta, G., Wiesel, P.H., Borassavt, D. and et al.(1999): Effect of whey based culture supernatant of lactobacillus acidophilus (johnsoni) La1 on Helicobacter pylori infection humans, Digestion. 60:203ـ209.

18.Ong, L., Herikson, A. and Shah, N. (2006): Development of probiotic cheddar cheese containing Lactobacillus acidophilus, Lb. casei, Lb. paracasei and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. Int. Dairy J. 16: 446 ـ 456.

19.Ouwehand, A., Salminens, S. and Isolavri, E. (2002): Probiotics: an overview of benefical effects.J.Antonievan Leeuwenhoek. 82:279ـ289.

20.Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Mattila ـ Sandholm, T.(2000): Probictic bacteria: safety, functional and technological Properties. J. Biotechno. 84:197ـ515.