

## بقاء *Escherichia coli* O157:H7 در دوغ های صنعتی، سنتی و دوغ پروبیوتیکی حاوی لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

حسین جمالی فر<sup>۱</sup> - احمد رضا شاهوردی<sup>۲</sup> - نسرین صمدی<sup>۱</sup> - احمد زاهری<sup>۳</sup> - محمد رضا فاضلی<sup>۱</sup> \*

۱ - گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲ - گروه بیوتکنولوژی دارویی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۳ - گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور قشم

\*نویسنده مسئول: دکتر محمد رضا فاضلی، گروه کنترل دارو و غذا دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران،

mofazeli@yahoo.com

دریافت ۸۸/۴/۲۷ پذیرش ۸۸/۶/۲۸

### چکیده:

زمینه و هدف: دوغ، نوعی نوشیدنی لبنی است که از ماست تهیه شده و می تواند به جای نوشابه در سبب غذایی ایرانی ها قرار بگیرد و تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه به کلسیم و حاوی ویتامین های B2 و B6 و B12 باشد. علاوه بر مزایای تغذیه ای، دوغ حاوی باکتری های مفیدی است که اثرات زیادی بر سلامت دستگاه گوارش دارند. از آن جمله می توان اثرات ضد میکروارگانیزم های پاتوژن بخصوص *Escherichia coli* O157:H7 را نام برد که با تولید توکسین می تواند باعث بیماری های گوارشی و دستگاه ادراری همچون کولیت هموراژیک (hemorrhagic colitis) و سندرم اورمیک همولیتیک (hemolytic uremic syndrome) شود. این باکتری بعنوان یک عامل پاتوژن food-borne مطرح است و می تواند از طریق شیر و سایر مواد لبنی، آب آلوده و نیز گوشت به انسان منتقل شود. در این تحقیق نقش آنتاگونیستی دوغ بر علیه باکتری پاتوژن *Escherichia coli* O157:H7 بررسی شد.

روش بررسی: بقای باکتری ذکر شده در ۵ نوع دوغ صنعتی، ۳ نوع دوغ محلی و یک نوع دوغ تهیه شده از ماست اسیدوفیلوس با استارتر *S.thermophilus* و *Lactobacillus acidophilus* با اندازه گیری کینتیک مرگ باکتری پاتوژن به روش شمارش در پلیت مورد بررسی قرار گرفت. یافته ها: نتایج بدست آمده نشان داد که هر چند تمامی انواع دوغ ها قادر به کاهش بار میکروبی باکتری پاتوژن شدن ولیکن دوغ های سنتی یا محلی در مدت زمان بسیار کوتاهتری نسبت به دوغ های صنعتی تعداد کل باکتری های *Escherichia coli* O157:H7 به کمتر از ۱۰ واحد تشکیل دهنده کلنی در هر میلی لیتر کاهش دادند.

نتیجه گیری: با توجه به مدت زمان اثر هر یک از این دوغ ها و زمان ماند ماده غذایی در معده که بیش از یک ساعت طول نمی کشد لذا استفاده از نوشیدنی های پروبیوتیکی مثل دوغ محلی و اسیدوفیلوسی با غذا که در مدت زمان ۳۰ دقیقه باعث کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری های بیماری زا می شوند می تواند در پیشگیری از آلودگی های میکروبی و عفونت های مختلف موثر باشد.

واژه های کلیدی: دوغ، اشیریشیاکلی O157:H7، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

## مقدمه

کننده اسید لاکتیک به منظور حفظ و بهبود سلامت انسان بسیار طولانی است. هفتاد سال قبل از میلاد مسیح، مورخ رومی (Roman) استفاده از فرآورده های تخمیری شیر را به منظور درمان گاستروانتریت توصیه نمود. در سال های اخیر، توجه بیشتری به بررسی علمی این باکتری ها و مکانیسم های اثر آنها در پیشگیری و درمان بیماری های مختلف معطوف گردیده است. بنابر این هدف از این تحقیق بررسی نقش آنتاگونیستی دوغ به عنوان یک نوشیدنی بر علیه باکتری بیماریزای *E. coli* O157:H7 می باشد (۹-۴). برای این منظور بقای باکتری ذکر شده در ۵ نوع دوغ صنعتی، ۳ نوع دوغ محلی و نیز دوغ تهیه شده از ماست اسیدوفیلوس با استارتر *S. thermophilus* و *L. acidophilus* مورد بررسی قرار گرفت.

## روش بررسی

**طرز تهیه دوغ محلی:** نصف یک بطری ۱/۵ لیتری از آب پر گردیده سپس ۳۰ گرم ماست منطقه استان قم و یک گرم نمک به آن اضافه کرده و در آخر بقدری شیر به این مخلوط اضافه می شود تا بطری پر شود بطوریکه نصف بطری حاوی آب و نصف آن شیر باشد. سپس درب بطری بسته شده و به مدت یک روز در جای گرمی قرار داده شد. برای اینکه دوغ حاوی گاز باشد بمدت سه روز نگه داری می شود. سپس بطری به مدت ۳ الی ۴ ساعت داخل یخچال گذاشته تا دوغ خنک شود.

بررسی بقای *Escherichia coli* O157:H7 در

**دوغ های صنعتی و دوغ تهیه شده از ماست با استارتر اسیدوفیلوس:** ابتدا دوغ های مختلف صنعتی مثل دوغ ۱، دوغ ۲، دوغ ۳ و دوغ ۴ و دوغ های محلی (دوغ ۵) به صورت آماده از بازار مصرف تهیه شد. برای تهیه دوغ های معمولی اسیدوفیلوس ابتدا با استفاده از شیر و استارتر (شرکت هانسن) *(L. acidophilus, S. thermophilus)* ماست اسیدوفیلوسی تهیه شد سپس با اضافه کردن آب و یک گرم نمک از آنها دوغ به روشی که ذکر گردید تهیه شد. تمامی دوغ ها به دو دسته تقسیم شده و pH یکسری از آنها را با سود یک نرمال خنثی کرده سپس باکتری

دوغ نوعی نوشیدنی لبنی است که از ماست تهیه شده و اولین بار هندی ها آنرا تحت نام لاسی تهیه نمودند که دو طعم مختلف داشت: شور و شیرین. دوغ شور را با ادویه جات از جمله فلفل مخلوط می نمودند. برای تهیه نوع شیرین، گلاب، انبه یا لیمو را با دوغ مخلوط می کردند. امروزه در برخی کشورها از جمله ایران و ترکیه از این نوشیدنی استفاده می شود. دوغ را از مخلوط کردن ماست، آب، نمک و دیگر مواد افزودنی از جمله اسانس نعنا تهیه می کنند. از سال ۲۰۰۲ میلادی استفاده از دوغ های شیرین که به لاسی شیرین شباهت داشت در ایالات متحده آمریکا مرسوم شد. مردم آمریکا به این فراوده لبنی، نوشیدنی ماست می گویند. یک نوشیدنی لبنی مناسب که می تواند جای نوشابه را در سبد غذایی تمام ما ایرانی ها بگیرد دوغ است، نوشیدنی سالم و مفیدی که تأمین کننده یک چهارم نیاز روزانه به کلسیم و حاوی ویتامین های B2 و B6 و B12 است از این رو دقیقاً برعکس نوشابه، قوی کننده استخوان ها است. دوغ علاوه بر مزایای تغذیه ای، حاوی باکتری های مفیدی است که اثرات زیادی بر سلامت دستگاه گوارش دارند بطوریکه مصرف مداوم آن می تواند موجب عدم رشد ارگانیزم های مضر شود.

*Escherichia coli* O157:H7 یکی از باکتری های مهم پاتوژن می باشد که با تولید توکسین می تواند عامل بیماری های گوارشی و دستگاه ادراری همچون کولیت هموراژیک (colitis hemorrhagic) و نیز سندرم اورمیک همولیتیک (hemolytic uremic syndrom) محسوب شود. این باکتری بعنوان یک عامل بیماریزای food-borne مطرح است و می تواند از طریق شیر و سایر مواد لبنی، آب آلوده و نیز گوشت به انسان منتقل شود. در آمریکا سالانه حدود ۶۳۰۰۰ نفر با این باکتری آلوده شده و مرگ و میر ناشی از آن ۶۱ نفر می باشد (۳-۱).

پروبیوتیک ها، ارگانیزم های زنده ای هستند که با تعدیل فلور میکروبی روده، اثرات مفیدی را بر سلامت میزبان اعمال می کنند. از هزاران سال قبل، مصرف پروبیوتیک ها بصورت سنتی در کشور های مختلف جهان رایج بوده است بطوریکه استفاده از میکرو ارگانیزم های زنده در غذا به ویژه باکتری های تولید

نتایج بدست آمده از شمارش تعداد کلنی های زنده باکتری *Escherichia coli O157:H7* (جدول ۱) در محیط کشت مک کانکی سوربیتول آگار نشان داد که در مدت ۳۰ دقیقه در دوغ ۱، دوغ ۳، دوغ ۴ و دوغ ۵ کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری *O157:H7* *Escherichia coli* مشاهده نشد ولیکن در دوغ ۲ دو سیکل لگاریتمی کاهش مشاهده گردید. پس از مدت زمان ۸ ساعت (۴۸۰ دقیقه) تعداد باکتری های زنده *Escherichia coli O157:H7* در دوغ های صنعتی ۱، ۲ و ۴ به کمتر از ۱۰ cfu/ml رسید ولی در دوغ ۳ به ۱۰<sup>۳</sup> cfu/ml تقلیل یافته در حالیکه در دوغ ۵ و کلیه دوغ های فوق که بوسیله سود خنثی شده بودند پس از گذشت ۸ ساعت هیچ تغییری در تعداد باکتری های زنده *Escherichia coli O157:H7* ایجاد نشده بود.

جدول ۱: بررسی بقاء *Escherichia coli O157:H7* در دوغ های صنعتی با روش شمارش در پلیت (تعداد تلقیح اولیه ۱۰<sup>۶</sup> cfu/ml × ۵/۶ و زمان بر حسب دقیقه می باشد)

دوغ های صنعتی	دوغ ۱	دوغ ۲	دوغ ۳	دوغ ۴	دوغ ۵
PH	۳/۸	۳/۸	۳/۷	۳/۶	۳/۹
زمان (دقیقه)					
۱۵	۲/۳ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۳ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۱/۲ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۹ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۴ × ۱۰ <sup>۶</sup>
۳۰	۱/۹ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۸/۰۰ × ۱۰ <sup>۴</sup>	۵/۰۰ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۴ × ۱۰ <sup>۶</sup>	۲/۱ × ۱۰ <sup>۶</sup>
۶۰	۴/۳ × ۱۰ <sup>۴</sup>	< ۱۰	۱/۳ × ۱۰ <sup>۵</sup>	۲/۷ × ۱۰ <sup>۴</sup>	۲/۰۰ × ۱۰ <sup>۵</sup>
۱۲۰	< ۱۰	< ۱۰	۱/۱ × ۱۰ <sup>۵</sup>	۲/۴ × ۱۰ <sup>۳</sup>	۵/۰۰ × ۱۰ <sup>۵</sup>
۲۴۰	< ۱۰	< ۱۰	۱/۰۰ × ۱۰ <sup>۴</sup>	< ۱۰	۲/۳ × ۱۰ <sup>۵</sup>
۳۰۰	< ۱۰	< ۱۰	۲/۸ × ۱۰ <sup>۳</sup>	< ۱۰	۴/۹ × ۱۰ <sup>۵</sup>
۴۸۰	< ۱۰	< ۱۰	۲/۳ × ۱۰ <sup>۳</sup>	< ۱۰	۵/۰۰ × ۱۰ <sup>۵</sup>

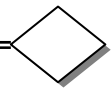
باکتری های زنده *Escherichia coli O157:H7* در دوغ های محلی به کمتر از ۱۰ cfu/ml رسید در حالیکه کلیه دوغ های فوق که بوسیله سود خنثی شدند پس از گذشت ۸ ساعت هیچ تغییری در تعداد باکتری های زنده *Escherichia coli O157:H7* مشاهده نشد.

*E. coli O157:H7* جدا شده در محیط برات کشت داده شد و تعداد cfu/ml ۱۰<sup>۶</sup> از باکتری به هر ۱۰۰ میلی لیتر نمونه دوغ اضافه گردید بطوریکه در هر میلی لیتر دوغ حدود ۱۰<sup>۶</sup> cfu/ml باکتری زنده وجود داشته باشد. در فواصل زمانی مختلف از دوغ ها نمونه گیری شد و تعداد باکتری *E. coli O157:H7* زنده در محیط اختصاصی سوربیتول مک کانکی آگار به روش Pour plate بررسی و ثبت گردید.

### یافته ها

بررسی بقای *Escherichia coli O157:H7* در دوغ های صنعتی، دوغ های محلی و دوغ تهیه شده از ماست با استارتر اسیدوفیلوس:

نتایج بدست آمده از شمارش تعداد کلنی های زنده باکتری *Escherichia coli O157:H7* (جدول ۲) در محیط کشت مک کانکی سوربیتول آگار نشان داد که در مدت ۳۰ دقیقه تعداد *Escherichia coli O157:H7* در دوغ های محلی کاهش قابل توجهی نشان داد بطوریکه در دوغ محلی ۳ در ۳۰ دقیقه به کمتر از ۱۰ cfu/ml رسید. پس از مدت زمان ۸ ساعت تعداد



جدول ۲: بررسی بقای *Escherichia coli* O157:H7 در دوغ های محلی با روش شمارش در پلیت (تعداد تلقیح اولیه  $10^6 \text{ cfu/ml}$  و زمان بر حسب دقیقه می باشد)

دوغ ۴	دوغ محلی ۳	دوغ محلی ۲	دوغ محلی ۱	دوغ ها
۳/۶	۳/۵۵	۴/۰۰	۳/۸	PH
زمان (دقیقه)				
۲/۹ × ۱۰ <sup>۵</sup>	۲/۰۰ × ۱۰ <sup>۴</sup>	۲/۸ × ۱۰ <sup>۵</sup>	۴/۰۰ × ۱۰ <sup>۴</sup>	۱۵
۲/۴ × ۱۰ <sup>۵</sup>	< ۱۰	۱/۴ × ۱۰ <sup>۴</sup>	۳/۲ × ۱۰ <sup>۳</sup>	۳۰
۲/۷ × ۱۰ <sup>۴</sup>	< ۱۰	۱/۶ × ۱۰ <sup>۲</sup>	۲/۰۰ × ۱۰ <sup>۲</sup>	۶۰
۲/۴ × ۱۰ <sup>۳</sup>	< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	۱۲۰
< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	۲۴۰
< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	۳۰۰
< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	< ۱۰	۴۸۰

دوغ ۱: دوغ خانگی ، دوغ ۲: دوغ خانگی ، دوغ ۳: دوغ مشک ، دوغ ۴: دوغ تهیه شده از ماست حاوی *Lactobacillus acidophilus*

#### بحث

تواند دلیل تغییرات کمی باکتری ها طی پروسه نگهداری ماست باشد(۶).

Guraya و Dineen در ۱۹۹۸ نشان دادند که *Escherichia coli* O157:H7 در ماست می تواند تا ۳۷ روز زنده بماند. Ogwaro و همکارانش در سال ۲۰۰۲ نشان دادند که *Escherichia coli* O157:H7 می تواند در طول یک دوره تخمیر در دمای مختلف زنده مانده و کاملا از محیط غذایی حذف نگردد (۱۱ - ۱۰). تمامی تحقیقات صورت گرفته بیشتر روی ماست می باشد ولیکن تحقیق حاضر روی دوغ که یک محصول شرقی و بخصوص ایرانی است می باشد و نشان داده شد که دوغ های محلی می توانند یک نوشیدنی خوب و تامین کننده سلامت جامعه باشد .

#### نتیجه گیری

نتایج ما نشان می دهد استفاده از نوشیدنی های پروبیوتیکی مثل دوغ محلی با غذا باعث کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری های بیماری زا می شوند .

اثر ضد باکتریایی ماست بر *Escherichia coli* O157:H7 توسط محققین مختلفی نشان داده شده است. (۶،۴،۱). برخی از تحقیقات اثر باکتری کش ماست را در (۴/۴-۴/۴) pH اسیدی نشان داده اند (۲). نتایج ما نیز نشان داد که دوغ های محلی اثرات ضد میکروبی بهتری نسبت به دوغ های صنعتی دارند . با توجه به مدت زمان اثر هریک از این دوغ ها و زمان ماند ماده غذایی در معده که بیش از یک ساعت طول نمی کشد لذا استفاده از نوشیدنی های پروبیوتیکی مثل دوغ محلی و اسیدوفیلوسی با غذا که در مدت زمان ۳۰ دقیقه باعث کاهش قابل توجهی در تعداد باکتری های بیماری زا می شوند می تواند در پیشگیری از آلودگی های میکروبی و عفونت های مختلف موثر باشد . Massa و همکاران نشان داده اند که پس از تلقیح شیر با  $10^3$  و  $10^7 \text{ cfu ml}^{-1}$  *Escherichia coli* O157:H7 و انجام فرماتاسیون طی ۵-۰ ساعت در  $42^\circ\text{C}$  و نگهداری ماست ایجاد شده در  $4^\circ\text{C}$  ، پس از ۷ روز تعداد باکتری ها از میزان  $3/49 \text{ log}_{10} \text{ cfu}$  به  $2/73 \text{ ml}^{-1}$  و از میزان  $7/38 \text{ log}_{10} \text{ cfu ml}^{-1}$  به  $5/41$  کاهش یافته است. کاهش pH از  $6/4$  به  $4/5$  می

تحقیقات علوم دارویی دانشکده داروسازی.

تشکر و قدردانی: با تشکر و قدردانی از زحمات بیدریغ  
معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز

## References

- 1- Kasimoglu A, Akgun S. *Survival of Escherichia coli O157:H7 in the processing and post-processing stages of acidophilus yogurt*. International Journal of Food Science and Technology 2004;39:563-568 .
- 2- Attai R, Whalen PJ, Shahani KM , Amer MA. *Inhibition of growth of Staphylococcus aureus during production of acidophilus yogurt*. Journal of Food Protection 1987, 50: 224-228.
- 3- Coia JE. *Clinical, microbiological and epidemiological aspects of Escherichia coli O157:H7 infection*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 1998, 20: 1-9.
- 4- Kotz CM, Peterson LR, Moody JA, Savaiano DA, Levitt MD. *In vitro antibacterial effect of yogurt on Escherichia coli*. Digestive Diseases and Sciences, 1990; 35: 630-637.
- 5- Maher MM, Jordan KN, Upton ME , Coffey A. *Growth and survival of E. coli O157:H7 during the manufacture and ripening of smear-ripened cheese produced from raw milk*. Journal of Applied Microbiology, 2001; 90: 201-207.
- 6- Massa S, Altieri C, Quaranta V, De Pace R. *Survival of Escherichia coli O157:H7 in yogurt during preparation and storage at 4°C*. Letters in Applied Microbiology, 1997; 24:347-350.
- 7- Ogwaro BA, Gibson H, Whitehead M, Hill DJ. *Survival of Escherichia coli O157:H7 in traditional African yogurt fermentation*. International Journal of Food Microbiology, 2002; 79, 105-112.
- 8- Gulmes M, Guven A. *Survival of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes 4b and Yersinia enterocolitica O3 in ayran and modified kefir as pre- and postfermentation contaminant*: Vet. Med. – Czech 2003; 48 (5): 126-132.
- 9- Oie S, Ishitobi J, Sawa A, Tomita M, Kamiya A. *In vitro bactericidal activity of antimicrobial agents against enterohaemorrhagic Escherichia coli*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2004; 54(5):897-903.
- 10 - Dineen SS, Takeuchi K, Soudah JE, Boor KJ. *Persistence of Escherichia coli O157:H7 in dairy fermentation systems*. Journal of Food Protection 1998; 61: 1602-1608.
- 11 - Guraya R, Frank JF, Hassan AN. *Effectiveness of salt, pH, and diacetyl as inhibitors for Escherichia coli O157:H7 in dairy foods stored at refrigerated temperatures*. Journal of Food Protection 1998; 61: 1098-1102.