مجله دنیای میکروب‌ها
سال پنجم، شماره سوم و چهارم (پیاپی ۱۳) زمستان ۱۳۹۱
صفحات ۱۰۴-۹۳

Original Article

ارزیابی تاثیر مهاری سویه‌های *بیفیدوباکتریوم* در کاهش اثرات سیتوتوکسیک جدایه های *اشریشیا کلی* تولید کننده وروتوکسین

نجمه نامدار[۱]، محمد کارگر[۲]، یحیی تهمتن[*۳]، محمد حسین حسینی[۳]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، باشگاه پژوهشگران جوان، [۲]دانشیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جهرم، گروه میکروب شناسی،
[۳]استادیار، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی شیراز، گروه باکتری شناسی

چکیده

سابقه و هدف: اغلب سویه‌های *اشریشیا کلی* O157:H7 توانایی اتصال محکم به سلول های ورو و تولید شیگا توکسین را دارند. این مطالعه با هدف توسعه یک مدل آزمایشگاهی پروبیوتیکی برای محافظت در برابر *اشریشیا کلی* O157:H7 انجام شد.

مواد و روش‌ها: پژوهش حاضر به صورت تجربی بر روی سویه های پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم* و سویه های شیگاتوکسینوژن *اشریشیا کلی* O157:H7 در سلول‌های تک لایه ورو انجام شد. برای این منظور سویه های پروبیوتیک در محیط MRS کشت و سپس به چاهک های رده سلولی ورو اضافه گردیدند. پس از گرماگذاری، سلول های خالص شناسایی شده واجد ژن های *stx*$_1$، *stx*$_2$ مخلوط هر دو و نیز سوسپانسیون کشت *اشریشیا کلی* O157:H7 به هر چاهک اضافه و نتایج CPE پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در انکوباتور CO2 به وسیله میکروسکوپ معکوس بررسی شد.

یافته‌ها: بر اساس مقدار شیگاتوکسین و *اشریشیا کلی* O157:H7 استفاده شده، سلول‌های ورو پیش تیمار شده با پروبیوتیک‌ها اثر متفاوتی نشان دادند. شیگاتوکسین و *اشریشیا کلی* O157:H7 به تنهایی سبب تخریب زیاد سلول شدند. اما پیش تیمار پروبیوتیکی موجب کاهش قابل ملاحظه تخریب سلول های آلوده به *اشریشیا کلی* O157:H7 گردید. در مقایسه با سلول های کنترل با توجه به میزان پروبیوتیک مورد استفاده، ۸۰ تا ۱۰۰ درصد سلول‌ها سالم باقی ماندند.

نتیجه گیری: نتایج این پژوهش نشان داد که *بیفیدوباکتریوم ها* و محلول روماند حاصل از رشد آن‌ها موجب کاهش تخریب سلول‌های ورو در حضور شیگاتوکسین و *اشریشیا کلی* O157:H7 می شوند. بنابراین امکان استفاده ازآنها در صنایع غذایی به عنوان یک مدل واکسن زنده در پیشگیری و درمان عفونت‌ها می تواند وجود داشته باشد.

واژگان کلیدی: *اشریشیا کلی* O157:H7، شیگاتوکسین، پروبیوتیک، *بیفیدوباکتریوم*.

دریافت مقاله: تیر ۱۳۹۱ پذیرش برای چاپ: شهریور ۱۳۹۱

مقدمه

زیستگاه طبیعی باکتری *اشریشیا کلی* (*E.coli*) روده انسان و حیوانات می باشد. با وجود بی خطر بودن این باکتری برخی از سویه های آن توکسین هایی تولید می کنند که موجب بروز بیماری اسهال می گردد (۱ و ۲). سویه‌هایی از این باکتری که در انسان موجب ایجاد گاستروانتریت می‌شوند را در ۶ گروه انتروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* (EPEC)، انتروتوکسیژنیک *اشریشیا کلی* (ETEC)، انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* (EHEC)، انترو اینویسیو *اشریشیا کلی* (EIEC)، انترو اگریگیتیو *اشریشیا کلی* (EaggEC) و *اشریشیا کلی* با انتشار پراکنده (DAEC) طبقه

*) آدرس برای مکاتبه: شیراز، میدان صنایع، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، گروه باکتری شناسی
تلفن: ۰۹۱۷۷۱۱۷۹۴۰ پست الکترونیک: yahyatahamtan@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

بندی کرده اند (۳). *اشریشیا کلی* O157:H7 یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری زا در انسان به شمار می آید که مهم ترین سروتیپ بیماری‌زای EHEC می‌باشد. این سویه سالانه عامل ۷۳۰۰۰ بیماری منتقل شونده از طریق غذا (Food born illness) در ایالات متحده می باشد (۳). بیماری‌هایی که توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 ایجاد می‌شوند شامل اسهال، اسهال خونی، کولیت هموراژیک (HC) و سندرم اورمی همولیتیک (HUS) می‌باشد که می‌توانند به آسیب های کلیوی و یا مرگ نیز منتهی گردند (۴). *اشریشیا کلی* O157:H7 با تولید توکسینی به نام شیگاتوکسین (Stx)، منجر به تخریب سلول های ورو می‌شود. از این رو آن ها را ورو توکسیژنیک *اشریشیا کلی* یا VTEC می نامند (۳ و ۵). گیرنده های این توکسین علاوه بر سلول های روده بر روی سلول های اپیتلیوم کلیه نیز وجود دارند. بنابراین پس از استقرار باکتری در مخاط روده و سپس کلیه می تواند باعث نارسایی حاد کلیوی و خونریزی کلیه (حالت کشنده عفونت های ناشی از EHEC) گردد. از آن جایی که ژن کد کننده Stx بر روی یک باکتریوفاژ قرار دارد، بنابراین درمان آنتی‌بیوتیکی با بر هم زدن فلور طبیعی روده موجب آزاد شدن هر چه بیشتر این سموم توسط باکتری و سخت تر شدن بیماری می‌گردد (۳).

امروزه از پروبیوتیک‌ها به عنوان باکتری‌های زنده‌ای که فرد را در برابر عوامل بیماری زا محافظت می کنند در پیشگیری و درمان عفونت‌ها استفاده می‌گردد. پروبیوتیک‌ها با مکانیسم‌های متعددی از جمله تولید مواد ضدمیکروبی، تولید مواد و اسیدهای آلی، فعال نمودن سیستم ایمنی بدن، رقابت با عامل بیماری‌زا بر سر مواد غذایی و اشغال گیرنده‌های سلول میزبان، سبب مهار رشد و تکثیر عوامل بیماری‌زا در آن محل از بدن می‌گردند. مزیت استفاده از این عوامل در مقایسه با واکسن‌ها قیمت مناسب، فراوانی، خطر کم و در برخی موارد تحریک سیستم ایمنی میزبان می‌باشد (۶ و ۷)

امروزه سویه هایی از *لاکتوباسیلوس ها*، *بیفیدوباکتریوم ها*، *ساکارومایسس ها*، *انتروکوکوس* و *کلستریدیوم ها* به عنوان پروبیوتیک شناسایی شده‌اند (۸). اغلب پروبیوتیک‌ها با مهار چسبندگی *اشریشیا کلی* O157:H7 به رده سلولی و نیز تولید مواد باکتریوسینی علیه باکتری پاتوژن، موجب کاهش تخریب رده سلولی می‌گردند (۸).

بیفیدوباکتریوم‌ها به دلیل داشتن خصوصیات ویژه‌ای می توانند به عنوان پروبیوتیک نقش مهمی در ایجاد سلامت در میزبان داشته باشند. یکی از مهم ترین ویژگی های *بیفیدوباکتریوم ها* توانایی اتصال آن‌ها به سلول‌های مخاطی می‌باشد. این امر مانع از اتصال باکتری های پاتوژن به سلول و عدم استقرار آن ها می گردد. از دیگر خصوصیات *بیفیدوباکتریوم ها* به عنوان پروبیوتیک می توان به ایجاد تعادل در میکروفلور طبیعی بدن، مقاومت در برابر استقرار باکتری های بیماری زا، کاهش میزان کلسترول سرمی، جلوگیری از جهش زایی عوامل موجود در روده و کاهش تومورهای روده، جلوگیری از عفونت مجاری ادراری به ویژه التهاب حاد معده ای و روده ای، کاهش عدم تحمل به لاکتوز و کمک به جذب کلسیم در روده اشاره نمود (۹).

به طور کلی پروبیوتیک ها میکروارگانیسم هایی هستند که با مکانیسم‌های متعددی مانند کاهش pH، ترشح مواد و پپتیدهای ضدمیکروبی، مهار چسبندگی باکتری‌های پاتوژن به سلول‌های اپی تلیال، افزایش عملکرد دفاعی، تنظیم ایمنی و اثر بر روی سلول های ایمنی می توانند به میزبان در مقابل باکتری های پاتوژن کمک نمایند (۷ و ۱۰).

این مطالعه با هدف ارزیابی اثر *بیفیدوباکتریوم ها* به عنوان پروبیوتیک در کاهش تخریب رده سلولی ورو توسط باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 انجام شد.

مواد و روش‌ها

الف) سویه میکروبی و شرایط رشد: سویه های پروبیوتیکی *بیفیدوباکتریوم انیمالیس* (*B. animalis*)، *بیفیدوباکتریوم لانگوم* (*B. longum*) و *بیفیدوباکتریوم بیفیدوم* (*B. bifidum*) به صورت تجاری (لیوفیلیزه) از کارخانه شیر پگاه شیراز تهیه شدند.

Archive of SID

www.SID.ir

باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 از دانشگاه ادینبرگ اسکاتلند به عنوان سویه کنترل تهیه شد. چندین سویه باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 از حیوانات اهلی جداسازی گردید که برای شناسایی تمامی آن ها از تست های بیوشیمیایی، آنتی سرم اختصاصی *اشریشیا کلی* O157:H7 و PCR استفاده شد. باکتری‌ها و سویه *اشریشیا کلی* O157:H7 در محیط های BHI (Heart Infusion Brain) و TSB (Trypton Soya Broth)، در شرایط هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری گردیدند. *بیفیدوباکتریوم ها* به صورت سوسپانسون مخلوط با هم در محیط De Man-Rogosa□Sharp (MRS broth)، در شرایط بی‌هوازی و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت گرماگذاری شدند. با استفاده از تکنیک PCR سویه‌های *اشریشیا کلی* O157:H7 واجد ژن‌های *stx*$_1$ *stx*$_2$ *eae* و *hly* انتخاب گردید (۱۱ و ۱۲).

ب) تعیین گروه سرولوژی: پس از جداسازی و شناسایی باکتری‌ها توسط تست‌های بیوشیمیایی با استفاده از آنتی‌سرم های تجاری به روش آگلوتیناسیون بر روی لام، گروه سرولوژی باکتری‌ها تعیین شد. برای انجام آگلوتیناسیون یک قطره از کشت باکتری در پپتون واتر با یک قطره از آنتی‌سرم اختصاصی بر روی لام در دایره ای به قطر ۱۰ میلی متر مخلوط گردید و برای ۲ دقیقه حرکت دورانی داده شد. (۷).

ج) شناسایی مولکولی سویه های اشریشیا کلی O157:H7*:* استخراج DNA با روش جوشاندن انجام شد و برای انجام PCR، مخلوط ۲/۵ میکرولیتر بافر ۱۰x، ۳ میلی‌مولار کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مول dNTPs، ۱ میکرولیتر پرایمر (جدول ۱) (۱۳)، ۱ میکرولیتر DNA و ۱ واحد آنزیم DNA پلی‌مراز *Taq* تهیه و با آب مقطر به حجم ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. سپس واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندرف (ساخت آلمان) با شرایط دمایی ۳ دقیقه واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت شدن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و در نهایت طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم برماید با دستگاه Kodack gel scan، عکسبرداری شد (۱۴).

د) آماده سازی محلول روماند حاصل از کشت باکتری ها: *بیفیدوباکتریوم‌ها* با کشت ۲۰ ساعته را در دور ۳۵۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ کرده و محلول روماند نیز دو بار با پالایه ۰/۲ میکرومتری فیلتر شد. لوله های حاوی محلول رویی حاصل از رشد باکتری‌ها با پارافیلم پوشیده و برای استفاده در مطالعه نگهداری گردیدند (۱۷-۱۵).

ه) اندازه گیری pH و خنثی سازی سوسپانسیون باکتریایی

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در این مطالعه.

ژن	پرایمر	توالی (۵' → ۳')	اندازه (bp)
***stx*$_1$**	Stx$_1$-F	TTCGCTCTGCAATAGGTA	۵۵۵
	Stx$_1$-R	TTCCCCAGTTCAATGTAAGAT	
eae	Eae-F	ATATCCGTTTTAATGGCTATCT	۳۱۵
	Eae-R	AATCTTCTGCGTACTGTGTTCA	
***stx*$_2$**	Stx$_2$-F	GTGCCTGTTACTGGGTTTTTCTTC	۱۱۸
	Stx$_2$-R	AGGGGTCGATATCTCTGTCC	
hly	Hly:F	CGCAACAAACTGAAGCAAAGG	۲۱۰
	Hly:R	TTGGCGGCACATTTGTCAC	

Archive of SID

www.SID.ir

پروبیوتیک: برای این منظور ابتدا pH سوسپانسیون باکتری های پروبیوتیک (سویه های *بیفیدوباکتریوم*) گرما گذاری شده به مدت ۲۰ ساعت در MRS broth اندازه گیری گردید. سپس با اضافه کردن NaOH یک درصد، pH محلول خنثی شد. برای جلوگیری از آلودگی، ۲ لوله از باکتری‌های کشت داده شده با شرایط یکسان انتخاب گردید و پس از ریختن NaOH در یک لوله و خنثی شدن pH محلول، همان مقدار NaOH استریل به لوله دوم افزوده شد و در آزمایشات مورد استفاده قرار گرفت (۱۶).

و) تهیه رقت های متفاوت: به منظور تهیه مقدار غلیظ شده محلول رویی، ۳ لوله استریل تهیه و مقدار ۸ سی سی از محلول رویی به هر لوله اضافه گردید و در یخچال قرار داده شد. پس از آن که مقدار آن‌ها به ۴، ۲ و ۱ سی سی رسید، به عنوان مقادیر متفاوت از محلول رویی غلیظ شده مورد استفاده قرار گرفت. رقت‌های ۱/۸، ۱/۴، ۱/۲ و ۱ با استفاده از PBS استریل تهیه شد. برای جلوگیری از آلودگی، پس از تهیه هر رقت نمونه‌ها فیلتر شدند. به منظور تهیه رقت سوسپانسیون باکتریایی از لوله مک فارلند برای بررسی تعداد باکتری‌ها استفاده شد و در صورت لزوم تهیه رقت انجام گرفت. سپس تعداد آن ها با کشت بر روی محیط‌های جامد (TSA و MRS Agar) شمارش گردید (۱۵).

ز) رده سلولی ورو(Vero): سلول ورو از موسسه سرم سازی رازی شیراز تهیه شد. سلول ها در فلاسک های $25\ cm^2$ مخصوص کشت سلولی ریخته و محیط DMEM (Dulbecco modified Eagles mineral essential medium) ساخت شرکت سیگما به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گوساله و آنتی بیوتیک های پنی سیلین و جنتامایسن روی سلول ها ریخته شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 گرما گذاری گردیدند. پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت، سلول ها تک لایه شدند و از آن برای پاساژ سلول‌ها در پلیت‌های ۶، ۱۲ یا ۹۶ خانه استفاده شد. برای این منظور ابتدا مایع رویی فلاسک خارج و به آن تریپسین ورسین (۵۰ درصد) به منظور جدا شدن سلول ها از کف پلیت اضافه شد. پس از یک دقیقه سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. پس از آن حدود ۲۵ تا ۳۰ سی سی محیط کامل (۱۰ درصد)، (۶۰ سی سی محیط DMEM تهیه شده به همراه آنتی بیوتیک های جنتامایسن و پنی‌سیلین هر کدام به مقدار ۶۰ میکرولیتر و ۶ سی سی سرم جنین گوساله) روی فلاسک ریخته و مجدداً سلول ها زیر میکروسکوپ مشاهده شدند. پس از چند بار پیپتینگ کردن آن، سلول‌ها درون پلیت‌ها تقسیم شدند. با استفاده از لام نئوبار برای شمارش، مقدار 10^5 سلول درون هر چاهک کشت سلولی ریخته شد. سپس آن را درون انکوباتور مخصوص کشت سلول قرار داده تا پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها تک لایه گردند. پس از آن محیط رویی خارج و با محیط فاقد آنتی بیوتیک جایگزین گردید. برای اطمینان در کار، چندین بار به آهستگی سلول ها توسط محیط فاقد آنتی بیوتیک شستشو داده شدند. از محیط فاقد آنتی بیوتیک به دلیل جلوگیری از اثر آنتی بیوتیک بر باکتری‌ها استفاده شد (۱۵ و ۱۶).

ح) آلوده سازی رده سلولی ورو با اشریشیا کلی O157:H7: برای این منظور یک میلی لیتر از سوسپانسیون باکتریایی حاوی *اشریشیا کلی* O157:H7 (10^8 cfu/ml ۲) با یک میلی لیتر از محیط کشت سلولی (DMEM) مخلوط گردید و به آرامی به رده سلولی اضافه شد. سپس رقت‌های مختلفی از سوسپانسیون باکتریای *اشریشیا کلی* O157:H7 به چاهک ها اضافه شد تا کمترین رقت تخریب کننده سلول توسط باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 مشخص گردد. در این مطالعه از رقت های 10^2 تا 10^8 ۲ استفاده و اثر تخریبی هر کدام از رقت ها با یکدیگر مقایسه شدند. سپس پلیت کشت سلولی ۲ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد با ۱۰ درصد CO_2 و ۹۰ درصد هوا قرار داده شد. پس از مدت زمان یاد شده برای مشاهده اثر *اشریشیا کلی* O157:H7 روی رده سلولی ورو، سلول‌ها با PBS استریل شستشو داده شدند.

ط) اثر محلول روماند کشت اشریشیا کلی O157:H7 *بر رده سلولی ورو*: ابتدا باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 سویه استاندارد (حاوی ژن های stx_1 و stx_2) در محیط TSB کشت داده شد و با دور ۳۵۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد.

Archive of SID

www.SID.ir

مایع رویی با پالایه ۰/۲ میکرومتر دو بار فیلتر گردید و پس از تهیه رقت‌های مختلف، اثر آن روی رده سلولی بررسی شد. اثر محلول رویی غلیظ شده نیز در این مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت .به ترتیب رقت‌های ۲ برابر غلیظ شده، ۱، ۱/۲، ۱/۴ و ۱/۶ روی سلول‌ها تلقیح گردیدند. سپس به مدت ۲ تا ۳ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد با ۱۰ درصد CO_2 قرار داده شدند و نتایج زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۱۵).

ی) پیش تیمار پروبیوتیکی سلول های ورو: برای این منظور تلقیح پروبیوتیک ها به رده سلولی تک لایه شده ورو و ۲ تا ۳ ساعت گرماگذاری قبل از افزودن *اشریشیا کلی* O157:H7 به سلول انجام شد. برای نشان دادن اثر پروبیوتیک‌ها در کاهش یا عدم تخریب سلول‌های تک لایه شده ورو توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 ابتدا سلول‌ها در پلیت‌های کشت سلولی کشت داده شدند. پس از گذشت ۲۴ تا ۴۸ ساعت مراحل زیر به ترتیب انجام گرفت. پس از ریختن پروبیوتیک‌ها روی سلول‌های تک لایه، در انکوباتور ۱۰ درصد CO_2 و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرما گذاری گردید. پس از ۱ تا ۲ ساعت، سوسپانسیون باکتریایی *اشریشیا کلی* O157:H7 به سلول ها اضافه شد. با توجه به مقادیر ثابت پروبیوتیک، مقادیر مختلفی از سوسپانسیون ۲۴ ساعته باکتری پاتوژن افزوده شد. پس از ثبت نتایج اولیه، مقدار پروبیوتیک افزوده شده در مرحله پیش تیمار اولیه افزایش یافت. این بار مقدار بیشتری از سوسپانسیون پروبیوتیکی بر روی سلول‌ها ریخته شد. این مقادیر به ترتیب در آزمایشات افزایش یافت به طوری که تمامی مقادیر 10^2 تا 10^8 سوسپانسیون پروبیوتیکی روی سلول‌ها ریخته شد (۱۵).

ک) پیش تیمار سلول‌های ورو با محلول رویی حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها: مقدار یک سی سی از محلول روماند تهیه شده در چاهک‌های کشت سلولی ریخته شد. پس از ۲ تا ۳ ساعت گرما گذاری مقادیر متفاوتی از سوسپانسیون باکتریایی *اشریشیا کلی* O157:H7 بر روی آن ریخته شد. چاهک ها یک ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۰ درصد CO_2 نگه داری و سپس توسط میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند. محلول رویی حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها نیز در مقادیر متفاوت تهیه شد و اثر آن ها در جلوگیری از تخریب رده سلولی توسط مقادیر مختلف *اشریشیا کلی* O157:H7 بررسی گردید (۱۵).

ل) تیمار سلول‌های ورو با پروبیوتیک‌ها و محلول روماند هم زمان با تلقیح اشریشیا کلی O157:H7: در چاهک های پلیت کشت سلولی به طور هم زمان یک سی سی از سوسپانسیون باکتریایی *اشریشیا کلی* O157:H7 و یک سی سی از سوسپانسیون پروبیوتیکی ریخته شد. این مقادیر در دفعات متعدد تغییر داده شد. این پلیت ها در مدت های متفاوتی (۱، ۲، ۳، ۶، ۱۰، ۱۲ و ۲۴ ساعت) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ۱۰ درصد CO_2 انکوبه شدند و نتایج زیر میکروسکوپ بررسی گردید (۱۵).

یافته‌ها

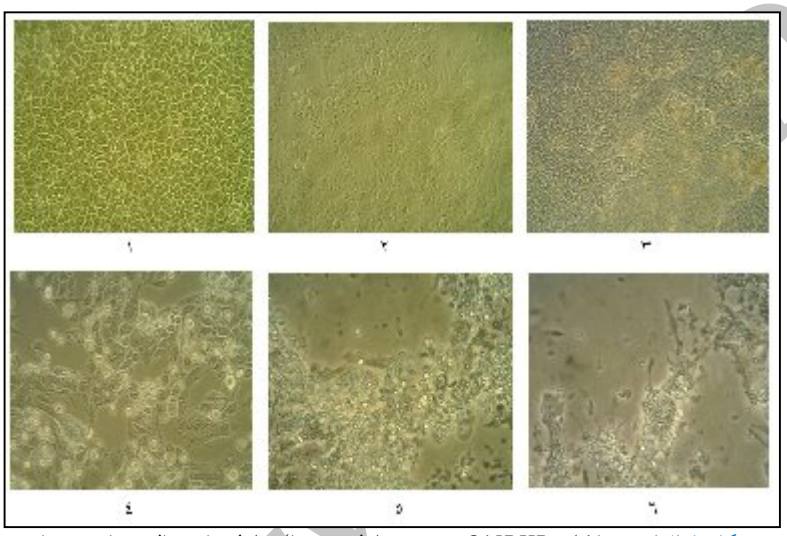
در این بررسی مشخص گردید که پروبیوتیک‌ها و محلول رویی حاصل از رشد آن ها در مقادیر مختلف سبب تخریب سلول نمی شوند. اما سوسپانسون باکتریایی *اشریشیا کلی* O157:H7 و محلول رویی حاصل از رشد آن با توجه به مقدار مورد استفاده توانایی تخریب سلول‌های ورو را دارند (شکل ۱). نتایج حاصل از شناسایی مولکولی سویه های بالینی نشان داد که برخی از سویه های *اشریشیا کلی* O157:H7 تمامی ژن های بیماری زایی (*stx_1*، *stx_2*، *hly* و *eae*) را دارند. اما برخی از آن‌ها دارای دو یا سه ژن و برخی نیز تنها یکی از ژن‌ها را داشتند. در بررسی اثر *اشریشیا کلی* O157:H7 و محلول رویی آن بسته به مقدار مورد استفاده اثر تخریبی ایجاد شده بر روی سلول‌ها متفاوت بود. به طوری که افزایش غلظت موجب افزایش تخریب سلول های ورو گردید. مقدار cfu /ml 10^4، 10^5، 10^6، 10^7 و بالاتر اثر تخریبی شدیدی را روی سلول نشان دادند. به طوری که با گذشت زمان گرماگذاری، اثرات تخریبی بیشتری مشاهده شد. اما در چاهک کنترل هیچ گونه اثر تخریبی مشاهده نگردید.

اثر تخریبی باکتری‌هایی که حاوی هر سه ژن *stx_1*، *stx_2* و *eae* بودند بیش از باکتری هایی بود که تنها یکی از ژن های *stx_1* و *stx_2* را دارا بودند. زمان گرماگذاری سلول ها نیز در

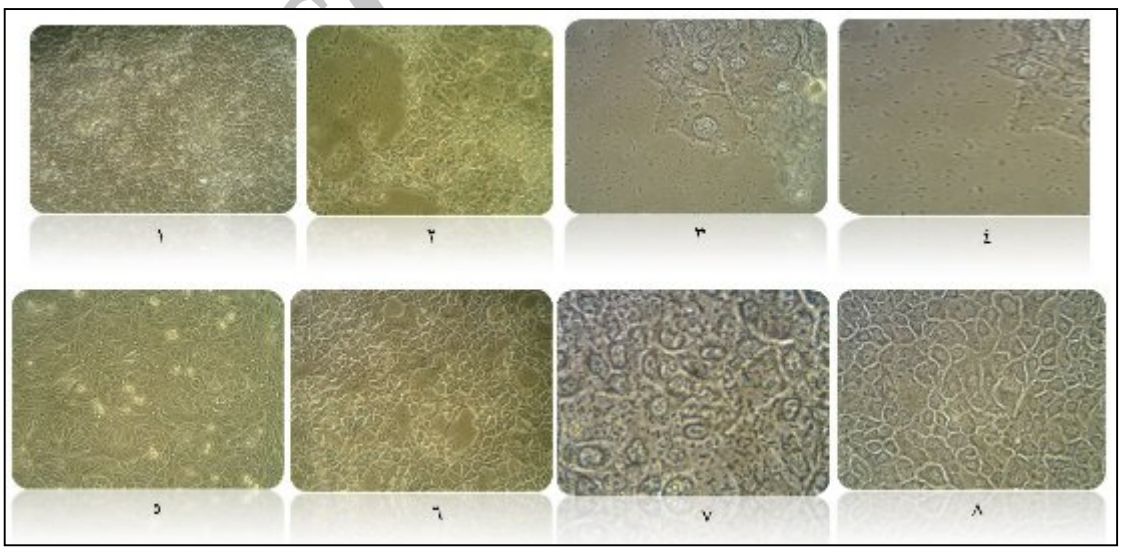
Archive of SID

www.SID.ir

تخریب بیشتر سلول‌ها موثر بود. به طوری که با گذشت زمان اثر تخریبی بیشتری بر روی سلول‌ها مشاهده گردید (شکل ۲). در زمان تیمار رده سلولی ورو یک تا دو ساعت قبل از آلودگی با *اشریشیا کلی* O157:H7 توسط پروبیوتیک یا محلول روماند آن‌ها، نتایج متفاوتی حاصل شد. اثر تخریبی سلول‌ها با توجه به تعداد باکتری های پروبیوتیک و *اشریشیا کلی* O157:H7 افزوده شده متفاوت بود (شکل ۲). در شرایط مساوی بودن میزان پروبیوتیک با باکتری پاتوژن، اثر تخریبی بسیار کمی نسبت به چاهک حاوی *اشریشیا کلی* O157:H7 مشاهده شد. اما این سلول ها نسبت به چاهک کنترل یا چاهک حاوی پروبیوتیک تخریب سلولی کمی را نشان دادند. در چاهک‌هایی که مقدار پروبیوتیک افزوده شده به رده سلولی حدود یک لگاریتم (۱۰۰۰ cfu) بیشتر از مقدار *اشریشیا کلی* O157:H7 بود،



شکل ۱: اثر *اشریشیا کلی* O157:H7 بر روی سلول ورو. ۱) سلول های سالم تیمار شده با پروبیوتیک. ۲) 10^{3} CFU ۳) 10^{4} CFU ۴) 10^{5} CFU ۵) 10^{6} CFU و ۶) 10^{7} CFU.



شکل ۲: ارزیابی اثر سویه *اشریشیا کلی* O157:H7 و پروبیوتیک‌ها بر روی رده سلولی ورو. ۱) سلول‌های ورو (کنترل). ۴-۲) اثر تخریبی *اشریشیا کلی* O157:H7 روی سلول‌های ورو به ترتیب پس از ۳، ۹ و ۲۴ ساعت. ۵) اثر پروبیوتیک‌ها روی سلول های ورو (عدم تخریب سلول‌ها). ۸-۶) اثر پیش تیمار پروبیوتیک‌ها روی سلول‌های ورو به ترتیب پس از ۳، ۹ و ۲۴ ساعت قبل از افزودن *اشریشیا کلی* O157:H7.

www.SID.ir

حداقل میزان تخریب سلولی به وسیله *اشریشیا کلی* O157:H7 در زیر میکروسکوپ مشاهده شد.

در غلظت های بیشتر پروبیوتیک، اثر بازدارندگی قوی تری در تخریب سلول توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 وجود داشت. هر چه زمان و مقدار پیش انکوباسیون بیشتر بود اثر تخریب سلولی کمتر مشاهده گردید (شکل ۲). به عنوان نمونه تعداد 10^5 باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 در پیش تیمار پروبیوتیکی با مقادیر 10^5 یا 10^6، 10^7 و بیشتر از آن قادر به تخریب رده سلولی نبود، اما همین تعداد از سوسپانسیون باکتریایی *اشریشیا کلی* O157:H7 به راحتی سلول های ورو را تخریب کرد. مهم ترین عامل در جلوگیری از CPE توسط باکتری پاتوژن مدت زمان پیش انکوباسیون و مقدار مورد استفاده پروبیوتیک‌ها بود. پیش تیمار رده سلولی ورو با محلول روماند حاصل از رشد پروبیوتیک‌ها نیز نتایج مشابهی با اثر پروبیوتیک‌ها داشت. اثر ضدتخریبی محلول روماند با غلظت بیشتر آن و مدت زمان پیش تیمار رابطه مستقیم داشت. با افزایش محلول روماند و مدت زمان پیش انکوباسیون، اثر پروبیوتیک‌ها در مهار تخریب سلولی نیز بیشتر مشاهده شد. همچنین در شرایط کشت هم زمان پروبیوتیک و *اشریشیا کلی* O157:H7 اثر مهاری کمتر از زمانی بود که سلول ها با پروبیوتیک و محلول رویی آن پیش تیمار می شدند. به طور کلی پیش تیمار سلول های ورو با پروبیوتیک‌ها و محلول رویی آن‌ها اثر بهتری در کاهش تخریب رده سلولی توسط باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 داشت.

بحث

اشریشیا کلی تولید کننده وروتوکسین یا انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* از مهم ترین باکتری های بیماری زای انسانی به شمار می آید. *اشریشیا کلی* O157:H7 مهم ترین سروتیپ بیماری زای این پاتوتایپ در انسان محسوب می‌شود (۱۶). در مطالعات مختلف اثر پروبیوتیک ها در ممانعت و درمان طیف وسیعی از بیماری های روده ای مانند اسهال مسافرتی، اسهال ناشی از مصرف آنتی بیوتیک و عفونت های حاد روده ای به اثبات رسیده است (۱۶). هم چنین نشان داده شده که پروبیوتیک‌ها پس از مصرف خوراکی با اتصال به گیرنده‌ها، با باکتری های بیماری زایی مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا*، *شیگلا*، *اشریشیا کلی*، *انتروباکتر*، *ویبرو کلرا* و *هلیکوباکتر پیلوری* رقابت می کنند و مانع از استقرار این باکتری‌ها می شوند (۷). *اشریشیا کلی* O157:H7 پس از اتصال به سلول ها قادر به ایجاد اثرات تخریبی روی سلول های ورو می‌باشد. در مطالعه حاضر بیشترین تخریب توسط مقدار 10^8 ۲ باکتری ایجاد شد، که تفاوت بارزی با کمترین میزان تخریب (10^2) داشت. افزایش مقدار باکتری ها موجب اتصال تعداد باکتری بیشتری به گیرنده‌های سطحی سلول‌های اپی تلیال شد. به دنبال آن با افزایش تولید توکسین، اثر تخریبی بیشتری بر روی سلول های ورو ایجاد گردید. بررسی زمان گرما گذاری سلول‌های ورو با *اشریشیا کلی* O157:H7 نشان داد که افزایش زمان، موجب افزایش اثرات CPE در سلول‌ها می‌شود. بیشترین CPE در مدت زمان ۲۴ ساعت گرما گذاری و پس از آن ایجاد گردید. با افزایش زمان گرما گذاری سلول با *اشریشیا کلی* O157:H7، باکتری‌ها مدت زمان بیشتری را برای رشد و تولید متابولیت‌های سمی مانند stx_1 و stx_2 داشتند.

کونوالچوک (Konwalchuk) و همکاران اثر تخریبی سویه‌های مختلف *اشریشیا کلی* را بر روی رده‌های سلولی مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که با افزایش مقدار مورد استفاده باکتری بیماری‌زا و زمان انکوباسیون، اثر تخریبی بیشتری در سلول ها ایجاد می‌شود. این یافته‌ها با نتایج مطالعه حاضر هم‌خوانی داشت. به طوری که هر چه زمان به ۲۴ ساعت نزدیک تر می گردید تخریب بیشتری مشاهده می شد. همچنین محققین یاد شده دریافتند که حساسیت سلول های ورو در مقایسه با سایر رده‌های سلولی مانند Y-1 و CHO، نسبت به *اشریشیا کلی* بیشتر می باشد (۱۷).

اثرات سلولی ایجاد شده توسط محلول روماند نشان داد که وجود باکتری *اشریشیا کلی* O157:H7 و اتصال آن به سلول تنها عامل موثر در تخریب سلولی نمی باشد و تولید متابولیت‌های سمی مانند توکسین‌ها نیز نقش مهمی در ایجاد CPE می تواند داشته باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

اثر تخریبی محلول رویی وتوکسین های تولید شده توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 روی سلول‌های ورو توسط بسیاری از محققان مانند اسپیرس (Spiras) و همکاران در سال ۱۹۷۷ بررسی شده است (۱۸). نتایج به دست آمده در پژوهش حاضر با یافته های این پژوهشگران مشابه بود. نتایج پژوهش جاری نشان داد که محلول روماند و یا توکسین باکتریایی قادر به تخریب رده سلولی ورومی باشند. باتوجه به تعداد مورد استفاده و زمان گرما گذاری اثر تخریب متفاوت بود. پروبیوتیک ها و محلول روماند حاصل از رشد آن ها با توانایی تغییر در گیرنده های ویژه پاتوژن در سطح سلول های میزبان، موجب مهار اتصال باکتری های پاتوژن به سلول ها می شوند. تخریب گیرنده به معنای عدم اتصال باکتری پاتوژن و یا متابولیت های سمی آن بر روی سلول هدف است. گاگنون (Gagnon) و همکاران نیز اتصال قوی تر پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم* را نسبت به *اشریشیا کلی* O157:H7 روی رده سلولی Caco-2 بررسی کردند. نتایج آن‌ها اتصال قوی‌تر پروبیوتیک‌ها به سلول ها را نشان داد (۱۱). در مطالعه جاری نیز *بیفیدوباکتریوم‌ها* در مقایسه با *اشریشیا کلی* اتصال قوی تری به سلول های ورو داشتند. همچنین نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌ها و محلول روماند حاصل از رشدشان نه تنها باعث تخریب سلول ورو نمی‌شوند، بلکه از تخریب سلولی ایجاد شده توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 نیز جلوگیری می نمایند. پروبیوتیک‌هایی مانند *بیفیدوباکتریوم‌ها* و *لاکتوباسیلوس‌ها* قادر به اتصال قوی به رده سلولی هستند و از طریق مکانیسم های متفاوت اثر رقابتی و ممانعتی علیه رشد و استقرار باکتری های بیماری زا ایفا می کنند. پژوهشگران بسیاری، تولید فاکتورهای دیگری از جمله اسید های آلی مانند اسید لاکتیک و اسید بوتیریک توسط پروبیوتیک ها را از مهم ترین عوامل ممانعت کننده رشد و بیماری‌زایی باکتری‌های پاتوژن و اثر تخریبی آن‌ها روی سلول ها می دانند (۱۹). نتایج حاصل از بررسی بوید (Boyd) و لینگوود (Lingwood) نشان داد که مصرف محلول روماند حاصل از کشت *لاکتوباسیلوس کازئی* و بسیاری دیگر از *لاکتوباسیلوس ها* دارای اثر کشندگی علیه گستره وسیعی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی بیماری زا می باشد (۹). از بین رفتن باکتری‌های بیماری‌زا توسط پروبیوتیک‌ها موجب مهار اتصال باکتری های بیماری زا به سطح سلول و ایجاد CPE می‌گردد (۲۰).

سو (Su) و برنت (Berent) گزارش کردند که پروبیوتیک هایی مانند *لاکتوباسیلوس ها* با اتصال به سلول ها در شرایط آزمایشگاه، چسبندگی و تهاجم باکتری‌های پاتوژن روده‌ای را به سلول ها مهار می کنند (۲۱). مطالعه حاضر نیز اثر ممانعتی پروبیوتیک های *بیفیدوباکتریوم* و محلول رویی حاصل از رشد آن ها را علیه ایجاد CPE توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 روی رده سلولی ورو در شرایط آزمایشگاهی را نشان داد.

در بررسی پیش تیمار پروبیوتیکی سلول ها، پروبیوتیک ها به طور قدرتمندی توانایی شان را در ممانعت از تخریب سلول ها توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 نشان دادند. قبل از افزودن *اشریشیا کلی* O157:H7 به سلول‌ها، افزایش میزان مورد استفاده پروبیوتیک و مدت زمان انکوباسیون، اثر مهاری و ممانعتی قوی‌تر پروبیوتیک ها علیه *اشریشیا کلی* O157:H7 را به دنبال داشت. زمانی که پروبیوتیک ها دو تا سه ساعت زودتر از *اشریشیا کلی* O157:H7 روی سلول ها ریخته شدند (Pre incubation)، به دلیل افزایش چسبدگی به گیرنده های سطحی سلول های اپی تلیال و مهار شدن جایگاه های اتصال باکتری بیماری‌زا ، اثر ممانعت کنندگی شدیدتری در چسبندگی *اشریشیا کلی* O157:H7 می تواند ایجاد شود. افزایش مدت زمان پیش تیمار سلول‌های ورو با پروبیوتیک‌ها می‌تواند موجب افزایش تولید باکتریوسین و اسید های آلی و در نتیجه اثر ضدتخریبی قوی‌تری بر روی سلول‌های ورو گردد (۱۹).

کاهش تخریب سلولی ایجاد شده توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 به کمک محلول روماند پروبیوتیک، اثبات می‌کند که وجود یا اتصال باکتری های پروبیوتیک به سلول تنها عامل اثر مهاری پروبیوتیک‌ها نمی‌باشد. بلکه محلول رویی پروبیوتیک‌ها به دلیل داشتن باکتریوسین، اسیدهای آلی، مواد متوقف کننده رشد باکتری های بیماری‌زا می تواند از اثرات تخریبی *اشریشیا کلی* O157:H7 بر سلول‌های ورو جلوگیری کند (۱۲).

Archive of SID

www.SID.ir

از آن جایی که افزایش تعداد پروبیوتیک ها می تواند موجب اشغال بیشتر گیرنده های سطحی، تولید متابولیت های مفیدی مانند باکتریوسین ها و اسیدهای آلی گردد، بنابراین اثر ضدتخریبی آن‌ها در رقابت با *اشریشیا کلی* O157:H7 بیشتر آشکار می‌گردد (۱۹). به طور کلی اثر پیش تیمار پروبیوتیکی در مهار تخریب سلولی، بسیار بهتر از زمانی بود که به صورت هم زمان پروبیوتیک و باکتری بیماری زا (تیمار) روی سلول ریخته شدند. دلایل متعددی این نتایج را تفسیر می‌کند. از جمله این‌که در پیش تیمار، پروبیوتیک‌ها زودتر به گیرنده‌های سطح سلول متصل می شوند و مکان اتصال *اشریشیا کلی* O157:H7 به سلول را اشغال می‌کنند. همچنین با داشتن زمان کافی برای تولید باکتریوسین می توانند موجب کاهش بهتر تخریب سلول گردند. زمان کافی برای اتصال پروبیوتیک ها و تعداد مناسب آن‌ها برای اشغال گیرنده‌های سطحی سلول‌ها از عوامل کلیدی در ممانعت از تخریب سلول توسط باکتری های بیماری زا می‌باشد (۱۶ و ۲۲).

نتیجه گیری

با توجه به اهمیت *اشریشیا کلی* O157:H7 در ایجاد عفونت های گوارشی و HUS، تنوع در مسیرهای انتقال و نیز نداشتن درمان قطعی، یافتن راهی که بتواند در پیشگیری یا بهبود بیماری موثر باشد حائز اهمیت است. اثرات مفید پروبیوتیک ها در سلامت میزبان و داشتن مکانیسم های متعدد دفاعی در مقابل میکروارگانیسم های بیماری‌زا سبب شده است که امروزه پروبیوتیک ها به عنوان ابزار مفیدی در مقابله با باکتری‌های بیماری‌زا مورد استفاده قرار گیرند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد زمانی که پروبیوتیک‌ها به صورت پیش تیمار بر روی سلول ها ریخته شوند، اثر تخریبی ایجاد شده توسط *اشریشیا کلی* O157:H7 به طور چشمگیری کاهش خواهد یافت. با توجه به این نتایج پیشنهاد می‌گردد که ابتدا از پروبیوتیک ها در پیشگیری و درمان عفونت های ناشی از *اشریشیا کلی* O157:H7 در حیوانات آزمایشگاهی استفاده شود تا بتواند در آینده به عنوان راهی در پیشگیری و کنترل عفونت های ناشی از *اشریشیا کلی* O157:H7 در انسان مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر وقدرانی

نویسندگان این مقاله از موسسه واکسن سازی رازی شیراز و دانشگاه آزاد اسلامی واحد جهرم به دلیل حمایت های اجرایی کمال امتنان را دارند.

References

1. Ochoa TJ and Cleary TG. XVI Infectious disease- *Escherichia coli*. Chapter 83. 2005; 9: 921-924.
2. Wang L, Li Y, Mustaphai A. Rapid and simultaneous quantization of *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. J Food Prot. 2007; 70(6): 1366-1372.
3. Natara JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998; 11(1): 142-201.
4. Boyce T, Swerdlow DL, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic- Uremic Syndrome. N Engl J Med. 1995; 333(6): 364-368.
5. Osek J. Development of a multiplex PCR approach for the identification of shiga-toxin producing *Escherichia coli* strains and their major virulence factor genes. J Appl Microbiol. 2003; 95(6): 1217-1225.

Archive of SID

www.SID.ir

6. Obrig TG. Shiga toxin mode of action in *E. coli* O157:H7 disease. Front Biosci. 1997; 2: 635-642.

7. Mkcp S, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Kinght SC. Mechanism action of probiotics: Recent advances. Inflamm Bowel Dis. 2008; 21: 756-781.

8. Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neat F, Matuchansky C. *Bifidobacteria* as agents-physiological effect and clinical benefits. Aliment Pharmacol Ther. 2005; 22(6): 495-512.

9. Kiaei E, Amir Mozafari N, Samiol Adab H, Jandaghi N, Ghaemi E. Antagonistic effect of lactic bacteria present in yoghurt against pathogenic bacteria. J Gorgan Uni Med Sci. 2006; 8(17): 33-28. [In Persian]

10. Shin IS, Nishikawa K, Maruyama H, Ishii S. Histidine-tagged shiga toxin B subunit binding assay: simple and specific determination of gb3 content in mammalian cells. Chem Pharm Bull. 2006; 54: 522-527.

11. Gagnon M, Kheadr EE, Blay GL, Fliss I. In vitro inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by *Bifidobacterial* strains of human orgin. Food Microbiol. 2004, 92: 69-78.

12. Trejo FM, Minnaard J, Perez FP, De Antoni GL. Inhibition of *Closttridum difficle* growth and adhesion by *Bifidobacterium* supernatants. Anearobe. 2006, 12(4): 186-193.

13. Namdar N, Tahamtan Y, Kargar M, Hoseini MH. Evaluation of antagonistic effect of probiotics *Bifidobacteria* spp. on *E. coli* O157:H7 in vitro. J Microb World. 2009, 2(3): 161-168. [In Persian]

14. Pamela HR, Davis KC, Garstka WR, Bhunia AK. Lactat dehydrogenase realase assay from vero cells to distinguish vero toxin producing *Eschrichia coli* from non vero toxin producing strains. J Microbiol Methods. 2000; 43(3): 171-178.

15. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Asaki T, Kamiya S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O15: H7 infection in mice. FEMS Immun Med Microbiol. 2004; 41: 219-266.

16. Johnson–Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour, MandSherman P M. *Lactobacillus rhamnosus* strain GG prevents Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-induced changes in epithelial barrier function. Infect Immun. 2008; 76(4): 1340-1348.

17. Konwalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. Infect Immun. 1977; 18: 775-779.

18. Sprirs JI, Stavric S, Konowalchuk J. Assay of *Escherichia coli* Heat -Labile Enterotoxin with Vero cells. Infect Immun. 1997; 16(2): 617-622.

19. Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PC, Goulet J. Probiotics reduce enterohemorrhag *Escherichia coli* O157: H7 and enter pathogenic *E. coli* O157: H6 induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and scytoskeletal rearrangements. Infect Immum. 2005; 73(8): 5183-5188.

20. Boyd B, Lingwood C. Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. Nephron .1989; 51

Archive of SID

www.SID.ir

(2): 207-210.

21. Su C, Berent JL. *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Humans. Ann Intern Med. 1995; 123(9): 698-707.

22. Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordanpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-Layer Protein extracts from *Lactobacillus helvicus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells. Cell Microbiol. 2007; 9(2): 356-36.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Microbial World
Volume 5, No. 3 & 4, January 2013

Original Article

Antagonistic effects of bifidobacterium spp. in decrease of cytopathic effects of Verotoxin-producing *Escherichia coli*

Najmeh Namdar[1], Mohammad Kargar[2], Yahya Tahamtan[3], Mohammad Hossein Hosseini[3]

[1]M.Sc., Department of Microbiology, Jahrom Branch, Young Researchers clube, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Jahrom Branch, Islamic Azad University, Jahrom, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Bacteriology, Razi Vaccine and Seum Research Institute, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Most Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strains are able to adhere to Vero cell line tightly and produce shiga toxin. The aim of this study was to develop a probiotic in vitro model for protection against *E. coli* O157:H7.

Materials and Methods: This study was performed experimentally on probiotic *Bifidobacterium* and shigatoxinogen *E.coli* O157:H7 in Vero cell line monolayers. The probiotic bacterium first was grown in MRS media and then was transferred into the Vero cell line-containing wells. After incubation, the cells were first exposed to three different treatments (pure stx_1, stx_2, a mix of $stx_1$and stx_2) and then were treated with *E. coli* O157:H7 bacterial culture. After 24 h incubation at 37° C in CO_2 incubator, the cell changes were observed by invert microscope.

Results: The Vero cell lines pre-treated with probiotic bacterium responded differently to the doses of used Shiga-toxin and *E. coli* O157:H7. When the cells were treated with only toxin or *E. coli* O157:H7, there was a intensive amounts of cell cytotoxicity. However, pre-treatment with prebiotic bacterium decrease significantly the toxicity caused by *E. coli* O157:H7. The survival rates of the Vero cells treated with probiotic ranged between 80% and 100% compared with controls.

Conclusion: Based on the results of this study, the probiotic bacteria and the supernatant prepared from their culture decrease the cell toxicity effects of shiga-toxin and *E. coli* O157:H7. Therefore, the probiotic bacteria can be used as an alive vaccine in food industry in order to prevent and treatment of infections.

Keywords: *E. coli* O157:H7, Shiga toxin, Probiotic, *Bifidobacterium* spp.

Correspondance to: Yahya Tahamtan
Tel: +989177117940
E-mail: yahyatahamtan@yahoo.com
Journal of Microbial World 2013, 5(3&4): 93-104.

Archive of SID
www.SID.ir