مقاله پژوهشی

کاربرد لاکتوباسیلوس کازئی و دما در کنترل سالمونلا تیفی موریوم در in vitro

حسین نقی‌لی[۱]، حسین تاجیک*[۲]، جواد علی اکبرلو[۳]، پیمان زارع[٤]، هادی قاسم مهدی[٥]، مجتبی رئیسی[٦]، مجید امین زارع[۷]

تاریخ دریافت 1392/08/01 تاریخ پذیرش 1392/10/25

چکیده

پیش زمینه و هدف: امروزه گرایش عمومی برای مصرف غذاهای عمل‌گرا به علت اثرات محافظت کنندگی زیستی آن‌ها در پیشگیری از مشکلات مربوط به سلامت انسان‌ها و الهام بخشیدن فواید مفید علاوه بر محتوای تغذیه‌ای مورد توجه واقع شده است.

هدف از این مطالعه ارزیابی توان لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان کشت محافظت کننده زیستی و عامل پروبیوتیکی در مهار سالمونلا تیفی موریوم می‌باشد.

مواد و روش کار: در این مطالعه ارزیابی پتانسیل ضد میکروبی لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان کشت محافظت کننده در محیط نیمه جامد و محیط مایع می‌باشد. به‌طوری‌که ویژگی‌های ضد باکتریایی آن علیه سالمونلا تیفی موریوم با روش آگار اسپات تست و ماکرودایلوشن مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور ابتدا اثر ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم با روش آگار اسپات تست تعیین گردید. سپس با روش ماکرودایلوشن تأثیر دزهای مختلف لاکتوباسیلوس کازئی بر الگوی رشد و بقاء سالمونلا تیفی موریوم تلقیح شده در محیط آبگوشت ترکیبی (لوریا و ام آر اس) در یک دوره ۶ روزه مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در روش آگار اسپات تست قطر هاله عدم رشد لگاریتم ۴/۵ سالمونلا تیفی موریوم در برابر لگاریتم ۶/۶ و ۲/۶ لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب برای روز اول ۲۳/۹۶ و۱۵/۷۴ و و در روز سوم ۲۵/۷۸ و ۱۷/۱۹ میلی‌متر بود.

در دمای ۱۰-۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد مقدار سالمونلا تیفی موریوم ابتدایی با روش ماکرودایلوشن که تحت تأثیر لگاریتم ۸ لاکتوباسیلوس کازئی قرار گرفته بود به ترتیب از حدود لگاریتم ۵ به ۲ و زیر آستانه تشخیص (کمتر از یک لگاریتم) در روز آخر ارزیابی کاهش یافت، و تحت تأثیر لگاریتم ۵ لاکتوباسیلوس کازئی از ۵ به ۵/۵ و زیر آستانه تشخیص رسید.

بحث و نتیجه گیری: لاکتوباسیلوس کازئی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در کاهش سالمونلا تیفی موریوم مؤثرتر از دمای ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد عمل نمود. بعلاوه لگاریتم ۸ لاکتوباسیلوس کازئی کاهش شدیدی را در سالمونلا تیفی موریوم در مقایسه با دزهای پایین اعمال می‌کند. در ضمن محیط‌های براث حاوی دز بالای لاکتوباسیلوس کازئی دارای کمترین مقدار pH هم بودند.

کلید واژه‌ها: سالمونلا تیفی موریوم، شرایط آزمایشگاهی، دما، لاکتوباسیلوس کازئی

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و چهارم، شماره دوازدهم، ص ۱۰۱۵-۱۰۰۵، اسفند ۱۳۹۲

آدرس مکاتبه: ارومیه کیلومتر جاده سرو، پردیس نازلو، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، صندوق پستی: ۱۱۷۷۵۷۱۵۳ تلفن: ۰۴۴۱۲۷۷۰۵۰۸

Email: h.tajik@urmia.ac.ir

[۱] دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[۲] استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[۳] استادیارگروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[٤] استادیارگروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز

[٥] مسئول آزمایشگاه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[٦] دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

[۷] دانشجوی دکتری تخصصی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه

مقدمه

امروزه با ظهور و گسترش مقاومت دارویی در بین میکروب‌ها به ویژه در خانواده سالمونلاها به‌دلیل وسعت سروتایپ‌های آن باعث شده که در انتخاب صحیح عوامل تأثیرگذار در کنترل این عوامل دقت بیشتری صورت پذیرد، بعلاوه فقدان تأییدیه رسمی برای برخی از مواد شیمیایی مؤثر توسط مراجع ذیصلاح هم مسئله‌ای است که استفاده از ترکیبات مطمئن بدون تأثیر منفی ارگانولپتیکی در کیفیت غذا را به عنوان عوامل جایگزین در کنترل میکروبی به چالش می‌کشد. که در این بین استفاده از عوامل بیوکنترلی به خاطر اثرات مفیدی که بر سلامت انسان دارد مورد توجه بسیاری می‌باشد. از طرفی تقاضا برای استفاده از محافظت کننده‌های شیمیایی به‌دلیل ارتقاء بی‌سابقه سطح آگاهی و نگرانی مصرف کنندگان از مخاطرات احتمالی آن‌ها بر سلامتی انسان روز به روز کاهش می‌یابد. دلیل این مدعا به خاطر استقبال و گرایش در استفاده از جایگزین‌های طبیعی[1] است تا علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای اثرات مفیدشان را در سلامت انسان ایفاء کنند (۱).

تا به امروز عوامل مختلفی برای کنترل زیستی مورد استفاده واقع شده است که از آن جمله می‌توان به باکتریوفاژها[2]، باکتریوسین‌ها، سیدروفورها[3]، سیگنال‌های سلولی [4] ، ارگانیسم‌های رقابت کننده و مواد ضد میکروبی مختلف مشتق شده از گیاهان و میکروب‌ها اشاره نمود (۲).

در سه دهه گذشته کاربرد پروبیوتیک‌ها به عنوان یکی از عوامل کنترل زیستی جهت پیشگیری و درمان اختلالات روده‌ای معده‌ای توجه زیادی را به خود جلب نموده است (۳). لاکتوباسیلوس‌ها به‌دلیل ویژگی‌های پروبیوتیکی به شدت مورد توجه واقع شده‌اند(۴). اثرات مفید آن‌ها شامل کاهش آنزیم‌های جهش‌زای مدفوعی (۵) ، اتصال به سلول‌های اپیتلیال(۶, ۷) ، تحریک ماکروفاژها (۸) ، تولید باکتریوسین‌ها (۹, ۱۰) و کاهش عفونت‌های روده‌ای به واسطه پاتوژن‌ها (۱۱) می‌باشد. اثرات مهارکنندگی پروبیوتیک‌هایی مانند سویه‌های لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم در مهار بسیاری از عوامل بیماری‌زای با منشأ غذایی مانند سالمونلا انتریکا سرووار تیفی موریوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلستریدیوم پرفرینجنس، کلستریدیوم دیفیسل و اشریشیا کلی مشخص شده است (۱۲).

باکتری‌های اسید لاکتیکی به عنوان میکروارگانیسم‌های با منشأ غذایی[5] مطرح هستند، سازمان غذا و دارو امریکا مصرف این باکتری‌ها را به عنوان ترکیبات امن[6] شناخته است. با توجه به اهمیت فراوان لاکتوباسیلوس‌ها کاربرد آن‌ها در غذاهایی تحت عنوان غذاهای عمل‌گرا[7] در حال افزایش می‌باشد. البته تا کنون بیشتر از محصولات لبنی به عنوان حامل‌های پروبیوتیک‌ها استفاده شده است، ولی با این حال اقداماتی مبنی بر استفاده از سایر فرآورده‌های غذایی به عنوان حامل‌های پروبیوتیکی هم وجود دارد (۱۳, ۱۴).

به طور کل اثرات پروبیوتیک‌ها در مهار سایر باکتری‌ها به‌دلیل رقابت در جذب مواد غذایی، تولید یک و یا چند متابولیت ضد میکروبی مانند اسیدهای ارگانیک (لاکتیک و استیک)، پر اکسید هیدروژن، آنزیم‌های ضد میکروبی وباکتریوسین‌ها می‌باشد (۱۵).

سوش‌های سالمونلا انگل‌های داخل سلولی اختیاری هستند که به غشاء موکوسی حمله می‌کنند. انسان عمدتاً با منابع آلوده مثل آب، گوشت، تخم مرغ و محصولات طیور آلوده می‌شود. سالمونلاها غالباً سبب ایجاد گاستروانتریت‌هایی با منشأ غذایی می‌شوند که از حیوانات به انسان منتقل می‌گردند. تب تیفوئید هنوز به عنوان یک معضل اندمیک در کشورهای در حال توسعه مطرح است. از سویی دیگر بیماری سالمونلوز غیر تیفوئیدی هم به عنوان یکی از علت‌های اساسی بیماری‌های با منشأ غذایی در سرتاسر جهان شایع می‌باشند.

سالمونلا انتریکا زیر گونه یک بیش از ۲۰۰۰ سروتیپ دارد که توانایی ایجاد طیف وسیعی از عفونت‌های روده‌ای و خارج روده‌ای را در انسان دارند. سروتایپ تیفی به میزبان خاصی سازگاری یافته و یکسری علایم از جمله تب تیفوئید سپتی سمیک خطرناک را در انسان ایجاد می‌کند. در عوض سالمونلا تیفی موریوم متعلق به سروتیپ غیر تیفوئیدی دارای دامنه وسیعی از میزبان‌ها شامل پرندگان، خزندگان و پستانداران هستند که گاستروانتریت‌های ملایم را در انسان ایجاد می‌کند (۱۶).

گزارش‌های زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد باکتری‌های سالمونلای گرم منفی، میله‌ای شکل مسئول بسیاری از بیماری‌هایی با منشأ غذایی می‌باشد. به‌طوری‌که مرکز کنترل و پایش بیماری‌های[8] ایالات متحده امریکا در پایش مراقبتی به عمل آورده در سال ۲۰۰۴ مشخص کرد که سالمونلا مسبب ۴۲ درصد عفونت‌های معمول باکتریایی است. علایم سالمونلوزیس شامل تهوع، استفراغ، دردهای شکمی، اسهال و تب می‌باشد. گوشت خام، گوشت طیور، شیرو محصولات حاصل از تخم مرغ از جمله محصولاتی هستند که می‌توانند ناقل این ارگانیسم‌ها باشند بدون

[1] Green preservatives
[2] Viral predators
[3] Siderophores
[4] Quorum sensing
[5] Food grade

[6] GRAS
[7] Functional food: a food containing health-giving additives.
[8] CDC

اینکه تأثیر سویی در ویژگی‌های حسی آن‌ها بگذارند (۱۷)، سالمونلا در آب‌میوه‌های غیرپاستوریزه (۱۸)، ماهی (۱۹) و همچنین در بادام زمینی (۲۰) به طور گسترده‌ای وجود دارد، بعلاوه گزارشاتی هم مبنی بر آلودگی اسفناج‌ها به سالمونلا در سال‌های اخیر وجود دارد (۲۱) . هدف از این کار در مرحله اول مشخص نمودن اثر ضد سالمونلایی لاکتوباسیلوس کازئی بر الگوی رفتاری باکتری سالمونلا تیفی موریوم در دو درجه حرارت ۳۰ و ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد در محیط مایع بود در مرحله بعد میزان ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط براث در دو درجه حرارت فوق ارزیابی شد.

مواد و روش کار

مواد:

سویه‌های میکروبی سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 700720)و لاکتوباسیلوس کازئی (ATCC 39392) از کلکسیون میکروبی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه تهیه گردیدند. همه سویه‌ها داخل محیط مناسبی که حاوی ۲۵ درصد گلیسرول بود در دمای منهای هشتاد درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. برای بدست آوردن کشت تازه لاکتوباسیلوس، ابتدا آن‌ها را در محیط ام آر اس[1] براث (مرک) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تکثیر داده شد سپس از کشت اول کشت دومی در همان محیط تهیه گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. برای بدست آوردن کشت تازه سالمونلا هم طبق روش فوق در محیط لوریا برتونی براث تکثیر شدند. محیط‌های ام آر اس آگار، بی اچ ای[2] براث، بی اچ آی آگار، لوریا برتونی و بیسموت سولفیت آگار مورد استفاده در این آزمایش از مرک تهیه شدند.

فعالیت آنتاگونیستی لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم در in vitro:

روش آگار اسپات تست:

فعالیت ضد باکتریایی لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم با استفاده از روش آگار اسپات تست انجام گرفت. در این روش از کشت دوم و تازه لاکتوباسیلوس کازئی به اندازه ۲ میکرولیتر که حاوی غلظت نهایی $۱/۵×۱۰^{۶}$ cfu بود را روی سطح ام آر اس آگار لکه‌گذاری شد و درجار بی‌هوازی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید تا کلنی‌ها توسعه یابند. سپس به محیط بی اچ آی آگار تازه تهیه شده که در بن ماری ۴۵ درجه سانتی‌گراد قرار داشت باکتری سالمونلا تلقیح گردید به‌طوری‌که در هر میلی‌لیتر این آگار، $۳×۱۰^{۴}$ cfu ml^{-1} باکتری سالمونلا پخش شده بود. در ادامه روی محیط قبلی که حاوی لاکتوباسیلوس کازئی رشد یافته بود ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید (۱۱).

روش ماکرودایلوشن:

کشت توأم باکتری سالمونلا تیفی موریوم با پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس کازئی) و شرایط رشد در محیط براث:

این آزمایش بر اساس روش کری ۲۰۰۸ با کمی تغییر انجام گرفت. ابتدا کشت تازه و ۲۴ ساعته لاکتوباسیلوس کازئی و سالمونلا تیفی موریوم به ترتیب در محیط‌های آبگوشت ام آر اس در شرایط اتمسفری حاوی ۵ در صد دی اکسید کربن و لوریا برتونی تهیه شد و سپس محیط‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. دوباره لاکتوباسیلوس کازئی وسالمونلا تیفی موریوم را به طور جداگانه در محیط آبگوشت ام آر اس: لوریا برتونی با نسبت مساوی در حضور ۵درصد دی اکسید کربن در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت شد متعاقباً از کشت لاکتوباسیلوس کازئی با غلظت (۰،$۱۰^{۳}$،$۱۰^{۵}$،$۱۰^{۸}$) به همراه کشت سالمونلا تیفی موریوم با غلظت $۱۰^{۴}$ به محیط ترکیبی و تازه لوریا-ام آر اس منتقل گردید. این محیط‌ها به مدت ۱۴۴ ساعت در دمای ۳۰ و ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. لازم به ذکر است سالمونلا تیفی موریوم بدون لاکتوباسیلوس کازئی به عنوان شاهد با همان شرایط گرمخانه‌گذاری گردید. در توالی زمانی۰، ۲۴، ۴۸، ۷۲، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ساعت، نمونه‌هایی از کشت توأم جمع آوری و ضمن تهیه رقت‌های سریالی یک به ده در آب پپتونه، در روی محیط‌های ام آر اس و بیسموت سولفیت آگار کشت و شمارش گردید (۲۲).

اندازه گیری pH:

در فواصل زمانی مشخص جهت اندازه گیری اسیدیته محیط آبگوشت ترکیبی تلقیح شده با دزهای مختلف لاکتوباسیلوس کازئی و سالمونلا تیفی موریوم ضمن رعایت شرایط آسپتیک نمونه‌هایی برداشت گردید و توسط پی اچ متر (Metrohm Herisau E520) اسیدیته محیط اندازه گرفته شد.

روش آماری:

کلیه آزمایش‌ها حداقل در سه تکرار انجام گرفت. تعداد سلول‌های باکتری ضمن تبدیل به لگاریتم cfu ml^{-1} با استفاده از روش آنالیز واریانس توسط نرم افزار GraphPad Prism version 5.04 for Windows تجزیه و تحلیل شدند. برای مقایسه اختلاف بین میانگین‌ها در سطح معنی‌داری ۰/۰۵ از آزمون آماری Newman–Keuls , Bonferroniاستفاده شد.

[1] MRS
2 BHI

یافته‌ها

یکی از روش‌های غربالگری اثرات ضدباکتریایی پروبیوتیک‌ها استفاده از روش آگار اسپات تست می‌باشد. در شکل.۱، اثر ضدباکتریایی دزهای مختلف لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم، طی سه روز متوالی براساس تشکیل هاله عدم رشد[1] بر روی بستر آگار نیمه جامد به نمایش در آمده است. در شکل.۱، تأثیرات سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی و زمان بر هاله عدم رشد معنی‌دار بود . ولی هیچ تداخلی[2] بین تأثیر زمان و میزان سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی دیده نشد. البته تأثیرگذاری سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با فاکتور زمان بر هاله عدم رشد معنی‌دارتر بود.

به‌طوری‌که در شکل.۲، ملاحظه می‌کنید تأثیرگذاری لاکتوباسیلوس کازئی با افزایش زمان، بر قطر هاله عدم رشد معنی‌دار نبود. البته به استثنای لگاریتم گروه‌های ۲.۶ و ۳/۶ ، ۶/۶ لاکتوباسیلوس کازئی ، اختلاف معنی‌داری در بقیه دزهای لاکتوباسیلوس کازئی بین ساعت‌های ۲۴-۴۸ و ۷۲ مشاهده نمی‌شد.

در شکل .۳، مقادیر باکتری زنده سالمونلا تیفی موریوم و لاکتوباسیلوس کازئی در محیط آبگوشت ترکیبی(ام آر اس و لوریا برتونی) طی روزهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶ در مواجهه با سطوح مختلف لاکتوباسیلوس کازئی مورد بررسی قرار گرفت.

در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، لگاریتم ۸ لاکتوباسیلوس کازئی طی ۱۲ و ۲۴ ساعت جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را به نصف و کمتر از حد آستانه تشخیص ($<1.0 \log CFU\ ml^{-1}$) رساند (برخی از داده‌ها به تصویر کشیده نشده است). لگاریتم ۵ لاکتوباسیلوس کازئی طی ۷۲ ساعت جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را به کمتر از حد آستانه تشخیص ($<1.0 \log CFU\ ml^{-1}$) رساند. ولی لگاریتم ۳ لاکتوباسیلوس کازئی تا آخر دوره ۶ روزه الگوی رفتاری مشابه با گروه کنترل که تنها حاوی سالمونلا تیفی موریوم بود (TE) داشت به طوری که نتوانست جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را در مقایسه با گروه کنترل (TE) به طور معنی‌داری کاهش دهد.

در ۱۰- ۸ درجه سانتی‌گراد ، لگاریتم ۸ لاکتوباسیلوس کازئی طی ۶ روز جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را به تدریج و آهستگی از لگاریتم ۵ به حدود ۲ رساند. درحالی‌که لگاریتم ۵ لاکتوباسیلوس کازئی در مقایسه با گروه کنترل (TE) نه تنها نتوانست جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را کاهش دهد بلکه شاهد افزایش ۰/۵ لگاریتم هم در جمعیت سالمونلا تیفی موریوم بودیم. لگاریتم ۳ لاکتوباسیلوس کازئی تا آخر دوره زمانی ۶ روزه نتوانست جمعیت سالمونلا تیفی موریوم را در مقایسه با گروه کنترل (TE) کاهش دهد بلکه در مواردی هم رشد سالمونلا تیفی موریوم را تقویت می‌کرد.

عمل متقابل باکتری‌ها بر هم در محیط براث ترکیبی که حاوی لگاریتم ۸/۲، ۵/۲ و۳/۲ $cfu\ ml^{-1}$ از لاکتوباسیلوس کازئی به انضمام لگاریتم حدود ۵ $cfu\ ml^{-1}$ از سالمونلا تیفی موریوم بود طی مدت ۶ روز در دو درجه حرارت ۳۰ و ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، مقادیر لاکتوباسیلوس کازئی در روزهای آخر اختلاف معنی‌داری از میزان تلقیح شده اولیه نشان می‌داد. در گروه TB، لگاریتم ۸/۲ لاکتوباسیلوس کازئی پس از ۱۴۴ ساعت به لگاریتم ۴/۸ $cfu\ ml^{-1}$ کاهش یافت. در گروه TC و TD، جمعیت اولیه لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب از لگاریتم ۵/۲ و۳/۲ به ۷/۱ و ۶/۲ $cfu\ ml^{-1}$ در پایان مدت ۶ روزه افزایش یافت. در گروه TA، جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی از لگاریتم ۳/۲ به ۵/۱ $cfu\ ml^{-1}$ در روز آخر رسیده بود.

در قسمت c شکل.۳، الگوی رشد لاکتوباسیلوس کازئی (TA) به تنهایی نشان می‌دهد که رفتار باکتری دارای سه مرحله رشد، سکون و مرگ می‌باشد که از الگوی رشد باکتری‌ها تبعیت می‌کند. وقتی تعداد باکتری لاکتوباسیلوس کازئی به ۸/۲ رسید فاز مرگ باکتری شروع می‌شود و طی دوره نگهداری ۶ روزه به حد ۵/۱ $cfu\ ml^{-1}$ می‌رسد. چنین الگوی را هم برای (TB) شاهد هستیم که در حضور ۸/۲ باکتری، سیگنال‌های سلولی دستورالعمل‌های لازم را برای ورود به مرحله مرگ باکتری صادر کرده که این سیر نزولی تا انتهای دوره ادامه پیدا می‌کند. به طوری که در روز ششم به حد ۴/۸ $cfu\ ml^{-1}$ می‌رسد.

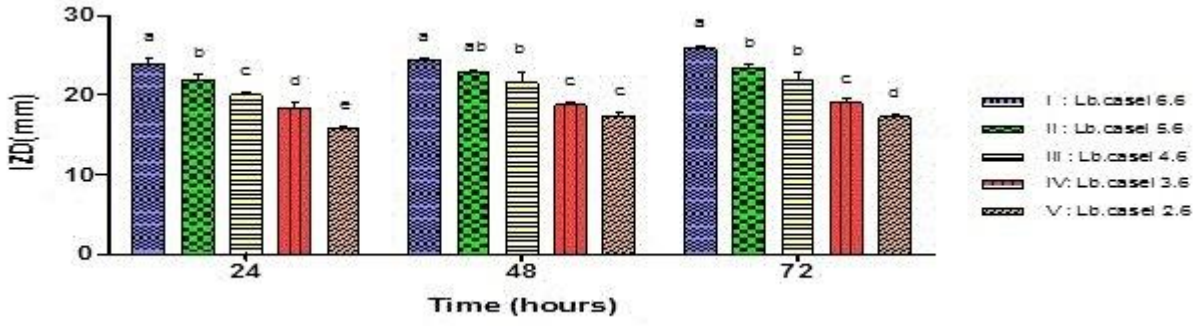
در ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد، میزان لگاریتم ۸/۲ لاکتوباسیلوس کازئی در گروه TB پس از ۱۴۴ ساعت کاهش قابل توجهی به میزان ۲/۹ $cfu\ ml^{-1}$ نشان داد. در گروه TC و TD، لگاریتم ۵/۲ و ۳/۲ لاکتوباسیلوس کازئی به اندازه ۱/۷ و ۲/۷ $cfu\ ml^{-1}$ در پایان ۱۴۴ ساعت افزایش یافت. در گروه کنترل TA طی مدت ۱۴۴ ساعت، جمعیت لاکتوباسیلوس کازئی از ۳/۲ $cfu\ ml^{-1}$ به ۵/۳ $cfu\ ml^{-1}$ رسید.

بررسی الگوی رفتاری گروه TA و TD لاکتوباسیلوس کازئی در ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد بعد ۶ روز نشان دهنده اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها بود. رفتار باکتری لاکتوباسیلوس کازئی در ۸-۱۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد که فاز سکون این باکتری در حدود لگاریتم ۷ می‌باشد، به‌طوری‌که تلقیح دزهای ۸/۲ و ۵/۲ لگاریتم بعد از ۴۸ و ۹۶ ساعت خود را به فاز سکون رساند. لگاریتم

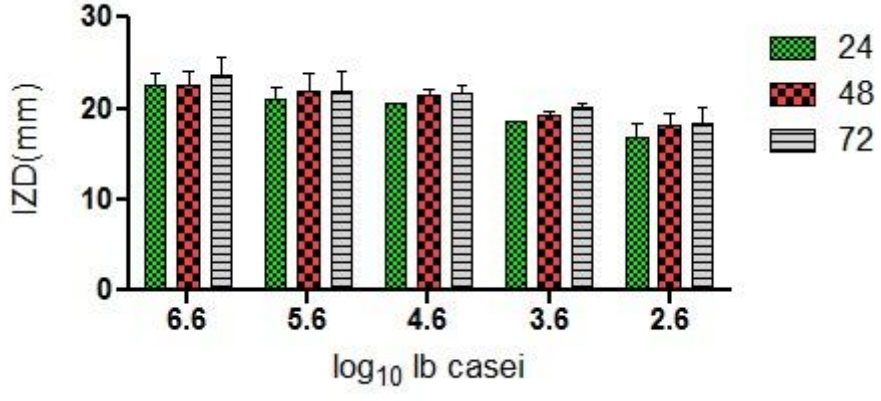
[1] Inhibition zone diameter
[2] Interaction

۳/۲ لاکتوباسیلوس در حضور سالمونلا (TD) تا روز ششم هنوز در فاز رشد واقع شده و سیر صعودی ملایمی را طی می‌کند. این الگوی رشد را کماکان در تلقیح دز منفرد ۳/۲ لگاریتم لاکتوباسیلوس (TA) هم شاهد بودیم.

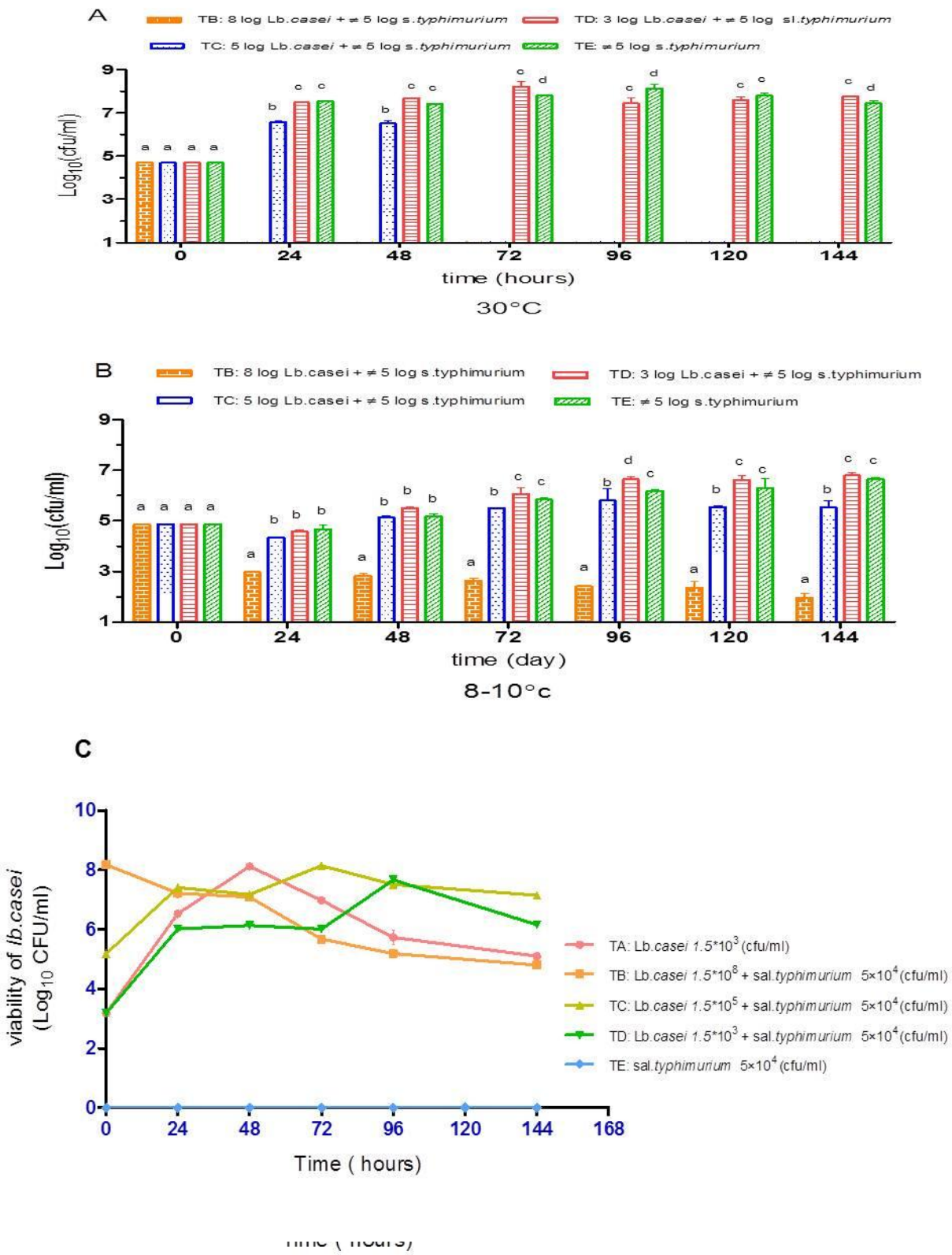
متابولیت اصلی لاکتوباسیلوس کازئی که در گروه هتروفرمانتاتیو اختیاری قرار می‌گیرد، اسید لاکتیک می‌باشد. لذا سنجش اسیدیته محیط آبگوشت ترکیبی(ام آر اس و لوریا برتونی) دارای اهمیت می‌باشد (۲۳).



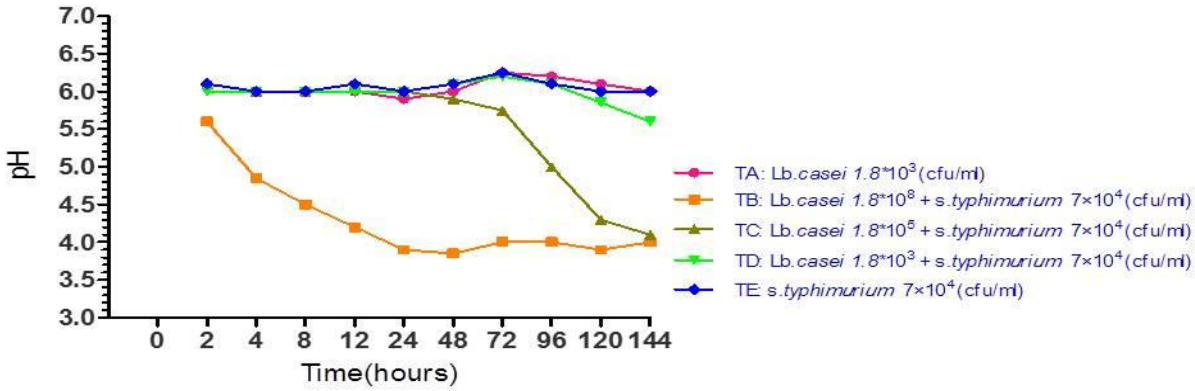
شکل (۱): هاله عدم رشد حاصل از لگاریتم ۶/۶ الی ۲/۶ لاکتوباسیلوس کازئی علیه لگاریتم ۴/۵ سالمونلا تیفی موریومی در یک دوره زمانی سه روزه که با روش Agar spot test بدست آمده است. میله‌های انحراف معیار با حروف مختلف در یک بازه زمانی نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در حد p≤۰/۰۵ است. داده‌ها نشان داده شده حاصل میانگین ± انحراف معیار، سه تکرار است.



شکل (۲): تأثیر دوره زمانی سه روزه را در هاله عدم رشد لگاریتم ۴/۵ سالمونلا تیفی موریوم نشان می‌دهد. داده‌ها نشان داده شده میانگین ± انحراف معیار، سه تکرار، است.



شکل (۳): وضعیت الگوی رفتاری باکتری‌های تلقیح شده در محیط آبگوشت ترکیبی را در دو درجه حرارت ۸-۱۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد. الگوی رفتاری سالمونلا تیفی موریوم در ۳۰ درجه سانتی‌گراد (A)، الگوی رفتاری سالمونلا تیفی موریوم در ۱۰- ۸ درجه سانتی‌گراد (B)، الگوی رفتاری لاکتوباسیلوس کازئی در ۳۰ درجه سانتی‌گراد (C)، الگوی رفتاری لاکتوباسیلوس کازئی در 10-8 درجه سانتی‌گراد (D). حروف مختلف موجود در روی مقادیر واقع دریک بازه زمانی نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p \leq 0.05$ می‌باشد.



شکل (۴): تغییرات pH را در محیط آبگوشت ترکیبی با دزهای مختلف باکتری‌های تلقیح شده نشان می‌دهد.

اسیدیته محیط آبگوشت ترکیبی(MRS و لوریا برتونی) تقریباً در حد ۶/۱ بود. pH محیط آبگوشت ترکیبی که حدوداً ۳ لگاریتم لاکتوباسیلوس کازئی به آن تلقیح شده بود، تقریباً تا سه روز ثابت باقی مانده بود ولی بعداً کاهش یافت و در روز آخر به ۵/۶ رسید. pH محیط آبگوشت ترکیبی که حدوداً ۵ لگاریتم لاکتوباسیلوس کازئی به آن تلقیح شده بود، بعد سه روز به سرعت کاهش یافت و در روز ششم به ۴/۱ رسید. اما pH محیط آبگوشت ترکیبی که حدوداً ۸ لگاریتم لاکتوباسیلوس کازئی به آن تلقیح شده بود، بعد یک روزبه ۴ رسید و تا آخر دوره نگهداری ۶ روزه ثابت باقی ماند.

بحث و نتیجه گیری

از جمله ویژگی‌ها و فواید استثنایی پروبیوتیک‌ها می‌توان به تأثیرگذاری آن‌ها در پیشگیری و تسکین اختلال عدم تحمل لاکتوز اشاره کرد. یکی دیگر از کاربردهای پروبیوتیک‌ها در پیشگیری و مدیریت آلرژی‌ها است به‌طوری‌که در مطالعه‌ای نشان داده شده که مصرف پروبیوتیک حاوی لاکتوباسیلوس جی جی ممکن است بتواند شیوع اگزمای آتوپیک را در مراحل بعدی زندگی کاهش دهد (۲۴) .

از ویژگی‌های مهم و کاربردی دیگر پروبیوتیک‌ها خواص ضد سمیت ژنی[1]، ضد جهش‌زایی[2]، ضدسرطانی و کاهش تولید متابولیت‌های سرطان‌زا[3] یا سمی است، که توجه زیادی را به خود معطوف داشته‌اند. برخی از تحقیقات اپیدمیولوژیک موید این مطلب است که مصرف پروبیوتیک‌ها سبب کاهش بروز سرطان روده بزرگ می‌شود. این عمل را به روش‌های مختلفی مثل کاهش بروز القاء کننده‌های تومور، کاهش فعالیت آنزیم‌های مدفوعی (بتا گلوکورونیداز، ازو- ردوکتاز، نیترو- ردوکتاز و ۷- الفا- دهیدروژناز- که در سرطان قولون‌های انسان و حیوانات نقش دارند)، با دژنره کردن نیتروزآمین‌ها، کاهش فعالیت مواد موتاژنزا، پیشگیری از آسیب به دی ان ای در سطح سلول‌های رده روده بزرگ، با اتصال مواد موتاژنزا به ترکیبات دیواره سلولی باکتری‌های پروبیوتیکی، جلوگیری از اثر سموم با اشغال گیرنده‌های توکسینی و افزایش عملکرد سیستم ایمنی، انجام می‌دهند (۲۵). مطالعات تجربی دیگری نشان داده که لاکتوباسیل‌ها و بیفید و باکتری‌ها فعالیت ژنوتوکسیک برخی از ترکیبات شیمیایی خاص را کاهش می‌دهند (۲۶) و از طرفی فعالیت آنتی موتاژنیک را در طول رشد در محیط انتخابی افزایش می‌دهد (۲۷).

با عنایت به اهمیت پروبیوتیک‌ها، در این مقوله ابتدا به بررسی اثرات مهاری لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا پرداخته شد سپس میزان ماندگاری لاکتوباسیلوس کازئی، به عنوان پروبیوتیک مورد توجه قرار گرفت. در روش آگار اسپات تست قطر هاله عدم رشد لگاریتم ۴/۵ سالمونلا تیفی‌موریوم تحت تأثیر لگاریتم ۶/۶ و ۲/۶ لاکتوباسیلوس کازئی به ترتیب برای روز اول ۲۳/۹۶ و۱۵/۷۴ و در روز سوم ۲۵/۷۸ و ۱۷/۱۹ میلی‌متر بود. در دمای ۱۰-۸ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد مقدار سالمونلا تیفی موریوم ابتدایی با روش ماکرودایلوشن که تحت تأثیر لگاریتم ۸ لاکتوباسیلوس کازئی قرار گرفته بود به ترتیب از حدود لگاریتم ۵ به ۲ و زیر آستانه تشخیص (کمتر از یک لگاریتم) و تحت تأثیر لگاریتم ۵ لاکتوباسیلوس کازئی از ۵ به ۵/۵ و زیر آستانه تشخیص در طی دوره ارزیابی رسید. نتایج حاصل بیانگر این مطلب است که در ۳۰ درجه

1 Antigenotoxicity
2 Antimutagenicity
3 Carcinogen

سانتی‌گراد نسبت به ۱۰- ۸ درجه سانتی‌گراد، اثرات مهاری لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم به شدت رخ می‌دهد. به عبارتی دیگر با توجه به مزوفیل بودن لاکتوباسیلوس کازئی تأثیرگذاری ضد باکتریایی آن در درجه حرارت‌های پایین به شدت کاهش می‌یابد. از طرفی الگوی ماندگاری لاکتوباسیلوس در درجه حرارت پایین بهتر از درجه حرارت‌های بالا بود که نشان‌دهنده توان رقابت و استقامت بالای لاکتوباسیلوس در این طیف درجه حرارتی بود، که از این خصیصه لاکتوباسیلوس کازئی می‌توان در نوشیدنی‌ها و نوش‌داروها خنک به عنوان نوشیدنی‌های عمل‌گرای حاوی پروبیوتیک‌ها بهره گرفت. تا کنون بیشتر از محصولات لبنی به عنوان حامل‌های پروبیوتیک‌ها استفاده شده است، ولی با این حال برخی از تولید کنندگان از محصول گوشتی و نوشیدنی‌ها هم به عنوان حامل‌های پروبیوتیکی جهت بهره‌گیری از ویژگی‌های پروبیوتیکی استفاده نموده‌اند.

آنچه که در مورد الگوی رفتاری سالمونلا تیفی موریوم ملاحظه شد بیانگر تأثیرگذاری لاکتوباسیلوس کازئی در محیط آزمایشگاهی علیه سالمونلا تیفی موریوم در دزهای بالا بود. اما آیا دزهای پایین نیز می‌توانند کماکان مؤثر واقع شوند، به خوبی مشخص نشده است. دزهای پایین لاکتوباسیلوس کازئی با توجه به بررسی به عمل آمده ما در محیط آبگوشت ترکیبی توان مهار باکتری پاتوژن سالمونلا تیفی موریوم را نداشت و حتی به نظر می‌رسد در مواردی فاکتورهای رشد لازم را برای سالمونلا تیفی موریوم فراهم می‌آورد.

آنچه مسلم است این است که مصرف پروبیوتیک‌هایی نظیر لاکتوباسیلوس کازئی در غذاهای عمل‌گرا برای الهام بخشیدن به اثرات مفید علاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای بایستی حداقل 10^{6} cfu در میلی‌لیتر یا گرم غذا باشد. یافته‌های تحت شرایط in vivo بر روی مدل موش نشان داد که برخی از لاکتوباسیل‌ها اگر روزانه در دز 10^{8} cfu برای هر موش خورانده شود توانایی بروز واکنش علیه عفونت‌های سالمونلا تیفی موریوم DT104 و جلوگیری از انتشار سیستمیک آن را دارند (۲۸).

محققین متعددی متفق‌القول بوده و هستند که مصرف روزانه حداقل 10^{6} الی 10^{9} پروبیوتیک‌ها زنده در روز برای اکتساب اثرات مفید ناشی از آن‌ها لازم می‌باشد. سیستم بدن انسان و پروکاریوت‌ها و کنش‌ها و تداخل‌های موجود در بین آن‌ها الگوی پیچیده‌ای دارند که لازم به نظر می‌رسد برای بهره‌گیری از این فواید، تأثیرگذاری پروبیوتیک‌ها را در دزهای پایین در محیط in vivo نیز مورد بررسی بیشتری قرار گیرد (۲۳, ۲۹-۳۲).

واضح است که فعالیت مهارکنندگی لاکتوباسیل‌ها علیه سالمونلا در نگاه اول به علت تولید اسید لاکتیک می‌باشد، اما همیشه نمی‌توان یقین داشت که سایر عوامل ضدباکتریایی تولید شده نقشی در مهار سالمونلا نداشته باشند. بر اساس گزارشاتی، در قولون‌ها میزان اسید لاکتیک، که به عنوان محصول واسطه‌ایی تخمیر قندهاست به مقدار کمی جداسازی شده است. که در ادامه مراحل مقادیری از آن به اسیدهای چرب زنجیر کوتاه تبدیل می‌گردند، که در غلظت‌های بیش از ۱۰۰ میلی‌مول می‌توانند فعالیت‌های ضدباکتریایی را علیه پاتوزن‌های گرم منفی اعمال کنند. لذا متابولیت‌هایی غیر از اسید لاکتیک نظیر عوامل ضدباکتریایی با وزن مولکولی کم می‌توانند روی گستره وسیعی از باکتری‌های گرم منفی تأثیر بگذارند. تنها در چندین گزارش تولید اسیدهای آلی را به عنوان عامل اصلی در فعالیت لاکتوباسیل‌ها علیه باکتری‌های گرم منفی پیشنهاد کرده‌اند. با این حال اسید لاکتیک به دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی نفوذ کرده و ضمن برهم زدن سازمان سلولی باکتری ممکن است فعالیت ضد باکتریایی سایر ترکیبات مهار کننده را بر انگیزد (۳۳).

آساهارا و همکاران در سال ۲۰۱۱ افزایش غلظت اسیدهای ارگانیک و به تبع آن کاهش pH در محیط روده را دلیل اصلی فعالیت ضد عفونت زایی لاکتوباسیل‌ها علیه سالمونلا ذکر نمودند. لیر و جانسون در سال ۱۹۹۳ و آنانگ در سال ۲۰۰۷ نوعی تطابق و سازش اسیدی را در سالمونلاهای موجود در محصولات تخمیری شیر و گوشت مرغ گزارش کردند. با توجه به ویژگی لاکتوباسیلوس کازئی که متابولیت اصلی‌اش اسید لاکتیک است، احتمال رخداد مجدد چنین مقاومت‌های دور از انتظار نیست. لذا بهره گیری از روش‌های هاردل در کنترل باکتری‌های پاتوژن نظیر سالمونلا تیفی موریوم توصیه می‌گردد (۳۴، ۲۸، ۹).

نکته قابل توجه دیگری که می‌توان در آینده مورد بررسی قرار داد این است که اثرات لاکتوباسیلوس کازئی علیه سالمونلا تیفی موریوم در محیط مایع مثل براث آیا الگوی رفتاری مشابهی با محیط‌های نیمه جامد، جامد و شرایط in vivo خواهد داشت زیرا محیط‌های مختلف به ویژه شرایط in vivo به‌دلیل پیچیدگی‌ها و فرایندهای متابولیکی تغییرات ملموسی را با شرایط آزمایشگاهی خواهند داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر کریم مردانی و جناب آقای دکتر حسن ملکی نژاد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References:

1. Silveira AC, Aguayo E, Artés F. Shelf-life and quality attributes in fresh-cut Galia melon combined with fruit juices. LWT - Food Sci Technol 2013; 50:343-8.
2. McIntyre L, Hudson JA, Billington C, Withers H. Biocontrol of Foodborne Bacteria: Past, Present and Future Strategies. Food NZ 2007; 7:25-32.
3. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. A Van Leeuw J Microb 2002; 82:279-89.
4. Xueyan C, Jingjing X, Jiangbing S, Jianshun C, Zhanfeng Z, Weihuan F. The S-layer proteins of Lactobacillus crispatus strain ZJ001is responsible for competitive exclusion against Escherichia coli O157:H7 and Salmonella typhimurium. Int J Food Microbiol 2007; 115(3):307-12.
5. Pedrosa MC, Golner BB, Goldin BR, Barakat S, Dallal GE, Russell RM. Survival of yogurt-containing organisms and Lactobacillus gasseri (ADH) and their effect on bacterial enzyme activity in the gastrointestinal tract of healthy and hypocholorhydric elderly subjects. J Clin Nutr 1995; 61(2):353-9.
6. Reid G, Servin AL, Bruce AW, Busscher HJ. Adhesion of three Lactobacillus strains to human urinary and intestinal epithelial cells. Microbiosience 1993; 75:57-65.
7. Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. Appl Environ Microbiol 1994; 60(12):4487-94.
8. Anang DM, Rusul G, Bakar J, Ling FH. Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of Listeria monocytogenes, Salmonella enteritidis and Escherichia coli O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. Food Control 2007; 18:961-9.
9. De-Vuysta L, Avontsa L, Neysensa P, Hosteb B, Vancanneytb M, Swingsb J, et al. The lactobin A and amylovorin L471 encoding genes are identical, and their distribution seems to be restricted to the species Lactobacillus amylovorus that is of interest for cereal fermentations. Int J Food Microbiol 2004; 90:93-106.
10. Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T, Saito T. Inhibition of foodborne pathogenic bacteria by bacteriocins from Lactobacillus gasseri. Lett Appl Microbiol 1995; 21(3):137-41.
11. Coconnier MH, Liévin V, Lorrot M, Servin AL. Antagonistic activity of Lactobacillus acidophilus LB against intracellular Salmonella enterica serovar typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. Appl Environ Microb 2000; 66:1152-7.
12. Nowroozi J, Mirzaii M, Norouzi M. Study of Lactobacillus as Probiotic Bacteria. Iran J Publ Health 2004; 33:1-7.
13. Arihara K. Strategies for designing novel functional meat products. Meat Sci 2006; 74(1):219–29.
14. Sameshima T, Magome C, Takeshita K, Arihara K, Itoh M, Kondo Y. Effect of intestinal Lactobacillus starter cultures on the behaviour of Staphylococcus aureus in fermented sausage. Int J Food Microbiol 1998; 41:1-7.
15. Holzapfel WH, Geisen R, Schillinger U. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int J Food Microbiol 1995; 24(3):343-62.
16. Janda JM, Sharon LA. The Family Enterobacteriaceae. In: Goldman E, Green LH, Editors. Practical handbook of microbiology. 2nd Ed. CRC Press; 2009. P.220-2.
17. Jorgensen F, Bailey R, Williams S, Henderson P, Wareing DRA, Bolton FJ, Frost JA, Ward L, Humphrey TJ. Prevalence and number of Salmonella and Campylobacter spp. on raw, whole chicken in relation to sampling methods. Int J Food Microbiol 2002; 76(1-2):151-64.

18. Parish ME, Narcisco JA, Friedrich LM. Survival of Salmonella in orange juice. J Food Safety 1997; 61:280-4.
19. Heintz ML, Ruble RD, Wagner DE, Tatini SR. Incidence of Salmonella in fish and seafood. J Food Protect 2000; 63(5):579-92.
20. Park EJ, Oh SW, Kang DH. Fate of Salmonella Tennessee in peanut butter at 4 and 22 °C. J Food Protect 2008; 73(2):M82-M86.
21. Mukhopadhyay S, Ramaswamy R. Application of emerging technologies to control Salmonella in foods: A review. Food Res Int 2012; 45:666-77.
22. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. J Microbiol Meth 2008; 73(2): 125-32.
23. Tamime AY. Microbiology of starter cultures. In: Robinson RK, Editor. Dairy microbiology handbook. 3rd Ed. New York: John Wiley and Sons; 2002. P.266-74.
24. 1. Toh ZQ, Anzela A, Tang MLK, Licciardi PV. Probiotic therapy as a novel approach for allergic disease. Front Pharmacol 2012;3:171.
25. Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. Microbes Infect 2000;2(6):681–6.
26. Tavan E, Cayuela C, Antoine JM, Trugnan G, Chaugier C, Cassand P. Effects of dairy products on heterocyclic aromatic amine-induced rat colon carcinogenesis. Carcinogenesis 2002; 23(3):477-83.
27. Lo, PR, Yu RC, Chou CC,Huang EC. Determinations of the antimutagenic activities of several probiotic bifidobacteria under acidic and bile conditions against benzo[a]pyrene by a modified Ames test. Int J Food Microbiol 2004; 93: 249-57.
28. Asahara T, Shimizu K, Takada T, Kado S, Yuki N, Morotomi M, et al. Protective effect of Lactobacillus casei strain Shirota against lethal infection with multi-drug resistant Salmonella enterica serovar Typhimurium DT104 in mice. J Appl Microbiol 2011;110(1):163–73.
29. Anandh MA, Lakshmanan V, Anjaneluyu ASR. Designer meat foods. Indian Food Indust 2003; 22:40-5.
30. Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. Int Dairy J 2003; 13:3-13.
31. Lücke FK. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Sci 2000;56(2):105–15.
32. Työppönen S, Petäjä E, Mattila-Sandholm T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Int J Food Microbiol 2003;83(3):233–44.
33. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, et al. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards Salmonella enterica serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res Microbiol 2006;157(3):241–7.
34. Leyer GJ, Johnson EA. Acid adaptation induces cross-protection against environmental stresses in Salmonella typhimurium. Appl Environ Microbiol 1993;59(6):1842–7.

Original Article

APPLICATION OF LACTOBACILLUS CASEI AND TEMPERATURE TO CONTROL OF SALMONELLA TYPHIMURIUM UNDER IN VITRO CONDITIONS

Hossein Naghili[1], Hossein Tajik[2]*, Javad Aliakbarlu[3], Peiman Zare [4], Hadi Ghasemmahdi [5], Mojtaba Raiesi[6], Majid Amin Zare [7]

Received: 23 Oct , 2013; Accepted: 15 Jan , 2014

Abstract

Background & Aims: There is a strong inclination and attention toward consumption of functional foods due to their bioprotection in preventing health problems and conferring health benefits beyond their nutritional content. The aim of this study was to evaluate *L. casei* potential as bioprotection and probiotic agent to inhibit *s*. Typhimurium.

Material & Methods: For this purpose, firstly, the antibacterial capacities towards *s*. Typhimurium were determined in an agar spot test. Secondly, in macrodilution method, several dose of *L. casei* was evaluated for its effects on the growth and survival of *s*. Typhimurium inoculated onto mixture broth media (LB+ MRS broth).

***Result*:** In Agar spot test, inhibition zone diameter of *s*. Typhimurium in encounter with 6.6 and 2.6 log of *L.casei* for the first and third day were 23.96, 15.74 , 25.78, and 17.19 (mm) respectively. At 8-10 and 37 ° C, initial counts of *s*. Typhimurium in the mixture broth media treated with 8 log of *L. casei* decreased from ~5 to 2 and undetected level (<1 log CFU/ml) respectively at final day. With 5 log of *L.casei*, it reached from ~5 to 5.5 and below the detection level (<1 log CFU/ml) respectively as well. But 3 log of *L. casei* did not effect on this level of *s*. Typhimurium compared with control in which just s. Typhimurium was available in the mixture broth media.

***Conclusion*:** *L. casei* was more effective in reducing *s*. Typhimurium population at 37 ° C than 8-10 ° C. Besides, Log 8 of *L. casei* caused a higher reduction in initial *s*. Typhimurium counts compared to other low level of them. The mixed broth media with high dose of *L.casei* had also the lowest pH value among the others.

***Keyword*:** In vitro, *Lactobacillus. casei, Salmonella.* typhimurium, Temperature

Address: Department of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, P.O. Box: 1177, Urmia University, Urmia, Iran. Tel: +98441 2770508
Email: h.tajik@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2014: 24(12): 1015 ISSN: 1027-3727

[1] *PhD Candidate, Department of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[2] *Professor of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)*
[3] *Assistant Professor of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[4] *Assistant Professor of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz University, Tabriz, Iran*
[5] *BSc, Food Hygiene & Quality Control Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[6] *PhD Candidate, Department of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*
[7] *PhD Candidate, Department of Food Hygiene & Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran*