مقاله پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

جلد پنجم، شماره دوم، تابستان ۱۳۸۵، ۱۰۲-۹۷

بررسی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکوباکتر پیلوری در شرایط گرادیان گلوکز و اکسیژن در سیستم ژلی تثبیت شده

دکتر حمید عبداللهی[۱]، ابراهیم رضازاده زرندی[۲]

دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۱۰ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۸۵/۳/۲۱ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۸۵/۴/۶ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۲۵

چکیده

زمینه و هدف : هلیکوباکتر پیلوری باکتری خمیده‌ای است که می‌تواند در مخاط معده مستقر و برای سال‌ها در آن جا باقی بماند و عفونت‌های مختلفی چون زخم معده و اثنی‌عشر ایجاد کند. امروزه برای درمان عفونت‌های آن از آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌گردد ولی راه‌کارهای درمانی دیگری نیز مطرح شده که از آن جمله استفاده از ارگانیسم‌های زنده پروبیوتیک چون لاکتوباسیلوس‌ها می‌باشد. بنابراین در این پژوهش، اثرات بازدارندگی دو گونه از جنس لاکتوباسیلوس بر روی رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط برون‌تنی و در کشت مختلط مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از سیستم تثبیت ژلی دارای دو فاز: جامد [۱۰ میلی‌لیتر محیط Peptone Yeast extract Salt solution همراه با ۱/۵٪ آگار و ۲٪ گلوکز] در زیر و دیگری نیمه جامد (۱۰ میلی‌لیتر محیط فوق همراه با ۰/۷۵٪ آگار و $1/5\times10^{7}$ باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت) در رو، داخل لوله‌های ۳۰ میلی‌لیتری در پیچ‌دار استفاده شد. هر یک از لاکتوباسیلوس‌ها و هلیکوباکتر پیلوری به تنهایی و هم‌چنین مختلط در محیط نیمه جامد کشت شدند و پس از انکوباسیون در ۳۷°C در زمان‌های مختلف از لایه نیمه جامد با چوب پنبه سوراخ‌کن نمونه تهیه و جمعیت هر باکتری، جذب نوری، pH و غلظت گلوکز محیط در سطوح مختلف اندازه‌گیری گردید.

یافته‌ها: باکتری‌های مورد بررسی در این سیستم در طول لایه نیمه جامد در مکان‌های خاصی رشد متراکم داشتند که به صورت نوار رشد آشکار شد. وضعیت ظاهری رشد (نوارهای رشد)، شمارش جمعیت باکتریایی، جذب نوری و pH در کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری با لاکتوباسیلوس پلنتاروم با کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم مطابقت داشت ولی در مورد کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس کازئی این گونه نبود بلکه شبیه کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری بود.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصله، مشخص شد لاکتوباسیلوس پلنتاروم رشد هلیکوباکتر پیلوری را در کشت مختلط مهار می‌کند که احتمالاً به علت تولید اسیدهای آلی چون اسید لاکتیک و باکتریوسین‌ها می‌باشد ولی لاکتوباسیلوس کازئی قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری نمی‌باشد. بنابراین لاکتوباسیلوس پلنتاروم در شرایط برون‌تنی (محیط کشت مختلط) اثر بازدارندگی بر رشد هلیکوباکتر پیلوری دارد و می‌تواند کاندیدای مناسبی جهت اهداف پروبیوتیکی در بررسی‌های درون‌تنی بر علیه هلیکوباکتر پیلوری باشد.

واژه‌های کلیدی: هلیکوباکتر پیلوری، لاکتوباسیلوس، پروبیوتیک، زخم معده، زخم اثنی‌عشر

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار گروه آموزشی میکروب‌شناسی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان

تلفن: ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۶۵ ، فاکس: ۰۳۴۱-۳۲۲۱۶۷۱، پست الکترونیکی: hamid-abdollahi@yahoo.com

۲- کارشناس ارشد گروه آموزشی میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]

مقدمه

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری گرم منفی و خمیده‌ای است که در مخاط معده (جایی که بسیاری از باکتری‌ها قادر به استقرار نمی‌باشند) مستقر و برای سال‌ها در آن جا باقی می‌ماند و با تولید آنزیم‌ها و فاکتورهای گوناگونی، ایجاد بیماری‌هایی چون گاستریت، زخم معده و اثنی‌عشر می‌کند. در ضمن این باکتری عامل احتمالی ایجاد سرطان معده محسوب می‌گردد [۲-۱]. از طرفی بسیاری از مردم تا سنین بزرگسالی به این باکتری آلوده می‌شوند و امکان پیشگیری از آلودگی آن حتی با مراقبت‌های بهداشتی دشوار است و تخمین زده می‌شود که حدود ۴۰٪ مردم کشورهای توسعه یافته و تا ۹۰٪ جمعیت کشورهای در حال توسعه به این باکتری آلوده‌اند [۳]. تاکنون واکسن قابل استفاده‌ای در برابر آن برای استفاده انسانی ساخته نشده است [۴]. راه‌کار درمانی کنونی، استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌باشد که آن هم با امکان عود عفونت و ابتلای مجدد همراه است [۴-۳]. یکی از روش‌هایی که امروزه برای جلوگیری از عفونت‌های میکروبی مورد توجه محققین قرار گرفته، استفاده از ارگانیسم‌های زنده (پروبیوتیک) می‌باشد « میکروارگانیسم‌های زنده‌ای که وقتی مصرف شوند اثرات سودمندی برای میزبان دارند» [۶-۵]. لاکتوباسیلوس‌ها جزو مهم‌ترین پروبیوتیک‌ها می‌باشند [۷، ۵]. این میکروارگانیسم‌های گرم مثبت علاوه بر تولید اسیدهای آلی، باکتریوسین‌های متعددی ترشح می‌کنند که دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشند [۸]. لاکتوباسیلوس‌ها توانایی استقرار و ماندن در شرایط اسیدی معده را دارند و جزو معدود میکروارگانیسم‌هایی هستند که از محیط اسیدی معده جدا می‌شوند [۹]. بنابراین اثرات بازدارندگی و پروبیوتیکی آن‌ها در برابر هلیکوباکتر پیلوری مورد توجه محققین قرار گرفته است [۱۱-۱۰، ۷].

در تحقیق حاضر سعی شد اثرات بازدارندگی دو گونه لاکتوباسیلوس در برابر هلیکوباکتر پیلوری در کشت مختلط و در شرایط متنوع آزمایشگاهی با استفاده از روش ساده و جالب گرادیان در سیستم ژلی تثبیت شده مورد ارزیابی قرار گیرد که در صورت مشاهده اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس بر رشد هلیکوباکتر پیلوری می‌توان فرض نمود که احتمالاً در وضعیت درون‌تنی نیز چنین اثراتی اعمال می‌شود که طبیعتاً نیاز به مطالعه بالینی جداگانه‌ای می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دو گونه لاکتوباسیلوس (*L.plantarum* PTCC 1058 و *L.casei* subsp *casei* PTCC 1608) از کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران تهیه شدند و پس از انتقال به محیط کشت MRS Broth (Deman,Rogosa,Sharp) و رشد، از نظر مورفولوژی و خصوصیات آزمایشگاهی مورد بررسی و تأیید مجدد قرار گرفتند. این دو گونه ماهیانه در محیط فوق پاساژ داده شده و برای انجام تست‌ها از کشت‌های تازه استفاده گردید. ضمناً هلیکوباکتر پیلوری K_{46} نیز از کلکسیون باکتری‌های آزمایشگاه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان که قبلاً از بیوپسی فرد مبتلا به گاستریت جدا شده بود، استفاده گردید. این باکتری ضمن نگهداری در دمای ۷۰ºC- به صورت ماهیانه در محیط بروسلا براث حاوی ۷٪ سرم سیتراته اسب پاساژ و از کشت تازه آن برای انجام تست‌ها استفاده شد.

تهیه سیستم ژلی تثبیت شده: در این سیستم از دو لایه جامد و نیمه جامد با پایه Peptone Yeast extract Salt Broth (PYS Broth) استفاده شد که لایه جامد در حجم ۱۰ میلی‌لیتر حاوی ۱/۵٪ آگار و ۲٪ گلوکز و لایه نیمه جامد در حجم ۱۵ میلی‌لیتر حاوی ۷۵/.٪ آگار همراه با $۱/۵×۱۰^{۷}$ باکتری در میلی‌لیتر محیط کشت بود [۱۳-۱۲]. ابتدا لایه جامد ساخته و در لوله‌های مربوطه توزیع شد، این لوله‌ها در دمای ۱۱۵ºC و فشار ۱۰ پوند به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند و در دمای اتاق به حالت عمودی قرار گرفتند تا ست شدند. همزمان محیط نیمه جامد نیز جداگانه استریل شد و در بن ماری قرار گرفت تا دمای آن به ۴۲ ºC رسید، سپس تعداد مشخصی باکتری ($۱/۵×۱۰^{۷}$ باکتری به ازا هر میلی‌لیتر محیط کشت) که قبلاً سه دفعه با فسفات بافر استریل(pH:۷ و ۲۰mM) شسته شده بودند اضافه و به مدت۱۰ ثانیه توسط شیکر تکان داده شدند و در شرایط آسپتیک محتوای این لوله‌ها به لوله‌های حاوی لایه جامد ست شده اضافه شد. لوله‌ها به حالت عمودی قرار گرفتند و پس از ست شدن در شرایط هوازی در گرمخانه با دمای ۳۷ºC قرار گرفتند. نمونه‌برداری از لایه نیمه جامد توسط چوب پنبه سوراخ‌کن با قطر ۵ میلی‌متر در زمان‌های مختلف (۳، ۷، ۱۱ و ۱۷ روز) از آن‌ها انجام و بررسی‌های مورد نظر بر طبق روش‌های زیر و سه مرتبه تکرار و لحاظ میانگین و انحراف معیار صورت گرفت.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]

شمارش سلول زنده: نمونه‌های برداشت شده از کل طول لایه نیمه جامد به آرامی در شرایط آسپتیک، داخل پلیت شیشه‌ای که از پشت خط کشی شده بود تخلیه شد. سپس به وسیله اسکالپل استریل قطعات استوانه‌ای نمونه در اندازه‌های مشخص بریده و در لوله‌هایی با حجم مناسب فسفات بافر قرار گرفتند به طوری که همواره رقت یک بیستم حاصل شد. در ادامه، قطعات ژل با بکارگیری دستگاه هموژنایزر شیشه‌ای با پیستون تفلون خرد و هموژنیزه شدند و از آن‌ها رقت‌های مختلف تهیه و روی پلیت حاوی محیط کشت مناسب به صورت سه پلیت کشت گردید و میانگین کلنی‌های شمارش شده روی سه پلیت به عنوان شمارش کلنی برای هر قطعه از ژل و بر اساس میلی‌لیتر محیط کشت محاسبه گردید. لازم به ذکر است که برای شمارش سلول‌های زنده هر یک از گونه‌های باکتریایی در کشت‌های مختلط از محیط مولر هینتون آگار حاوی آنتی‌بیوتیک کوتریموکسازول (۸ میلی‌گرم سولفامتاکسازول و ۱/۶ میلی‌گرم تریمتوپریم در لیتر) که منحصراً هلیکوباکتر پیلوری روی آن رشد می‌کرد و دو محیط بدون آنتی‌بیوتیک که هر دو جنس باکتریایی قادر به رشد بودند، استفاده گردید. پس از چهار روز انکوباسیون در شرایط میکروآئروفیلیک کلنی‌های ظاهر شده در هر پلیت شمارش و جمعیت میکروبی هر یک محاسبه شد.

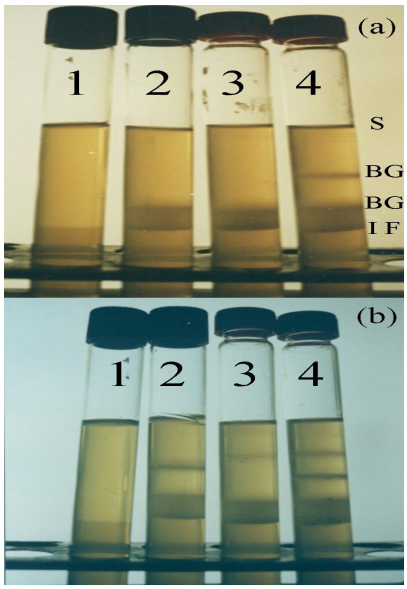
جذب نوری: از لوله‌های با رقت یک بیستم فوق دو میلی‌لیتر برداشت و جذب نوری آن‌ها به وسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد.

اندازه‌گیری گلوکز: از لوله‌های با رقت یک بیستم ۴۰ میکرولیتر برداشته و به ۲ میلی‌لیتر معرف گلوکز اکسیداز (کیت من) اضافه و پس از ۱۵ دقیقه قرار دادن در ۳۷°C جذب نوری آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد، که با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت گلوکز در هر قسمت در طول لایه نیمه جامد بر اساس میلی‌مولار محاسبه شد.

اندازه‌گیری pH: اسیدیته محیط کشت‌های سیستم ژلی تثبیت شده با روش قرار دادن نوارهای pH (MACHERY NAGEL) با دقت ۰/۱± روی قطعات ژل اندازه‌گیری شد

نتایج

لاکتوباسیلوس پلنتاروم، لاکتوباسیلوس کازئی و هلیکوباکتر پیلوری در لایه نیمه جامد از سیستم ژلی تثبیت شده در شرایط مناسب، قادر به تشکیل تراکم سلولی بالا در مکان‌های خاصی به صورت نوار رشد بودند (شکل ۱). در طی آزمایشات مقدماتی مشخص شدکه عواملی چون تعداد باکتری (۳×۱۰^{۶} در هر میلی‌لیتر محیط کشت و بیشتر)، غلظت گلوکز (۱٪ و بالاتر)، شرایط انکوباسیون (هوازی، میکروآئروفیلیک و بی‌هوازی) و طول لایه نیمه جامد در ایجاد و تعداد نوار رشد مؤثر می‌باشند. بر عکس غلظت (درصد) آگار لایه نیمه جامد (۱/۵، ۱/۲۵، ۱، ۰/۷۵، ۰/۵ و ۰/۲۵) اثر محسوسی ندارد. بنابراین با بررسی به عمل آمده، به کارگیری سیستمی با مشخصات خاص [افزودن $۱/۵ \times ۱۰^{۷}$ باکتری در هر میلی‌لیتر لایه نیمه جامد (در مورد کشت مختلط این تعداد به نصف برای هر یک از باکتری‌ها تقلیل یافت)، بکارگیری لایه نیمه جامد با ارتفاع ۵۰ میلی‌متر، افزودن ۲ ٪ گلوکز برای لایه جامد] برای انجام بررسی‌های مورد نظر مناسب تشخیص داده شد.

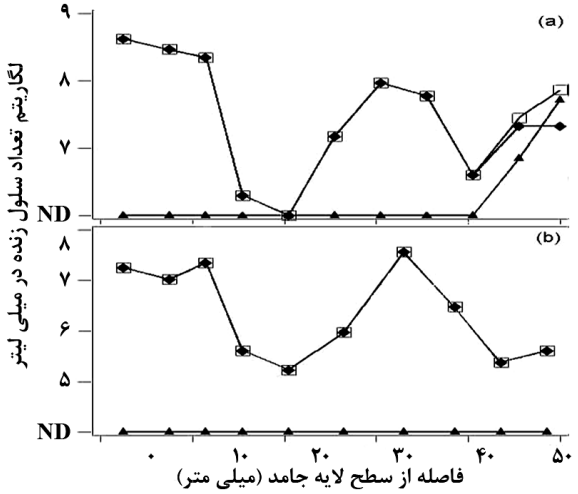


شکل ۱- تشکیل نوار رشد در سیستم ژلی تثبیت شده در ۲٪ گلوکز، انکوبه شده در ۳۷ °C برای [۳ روز (a) و ۱۷ روز (b)] تحت شرایط هوازی: کنترل، بدون تلقیح باکتری (۱)، لاکتوباسیلوس پلنتاروم (۲)، کشت مختلط (۳) و هلیکوباکتر پیلوری (۴).IF : حدفاصل لایه جامد و نیمه جامد، BG : نوار رشد، S: سطح نیمه جامد

شمارش سلول زنده و جذب نوری سطوح مختلف لایه نیمه جامد: هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس پلنتاروم در کشت مختلط الگوی رشد و نوارهای رشد مشابه کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم داشتند. به طوری که وضعیت (محل و تعداد) نوارهای رشد در کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم و مختلط آن دو با شمارش سلول زنده (شکل ۱ و نمودار ۱) و

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]

جذب نوری سطوح مختلف لایه نیمه جامد نیز قرابت داشت. به طوری که جذب نوری کشت مختلط (۰/۰۱±۰/۰۹) مشابه جذب نوری کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم (۰/۰۱±۰/۱) بود اما در شمارش سلول‌های زنده در سطوح مختلف لایه نیمه جامد در روز سوم، هلیکوباکتر پیلوری به همراه لاکتوباسیلوس پلنتاروم تواماً در نزدیکی‌های سطح و به طور کلی ناحیه سطحی وجود داشتند (نمودار ۱)، در صورتی که در کشت مختلط لاکتوباسیلوس کازئی با هلیکوباکتر پیلوری چنین نبود و نه تنها شکل ظاهری کشت مختلط با کشت خالص لاکتوباسیلوس کازئی متفاوت بود، بلکه جذب نوری سطوح مختلف کشت مختلط (۰/۰۱±۰/۰۸) با جذب نوری کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری (۰/۰۱±۰/۰۸) مطابقت کرد. البته در طول لایه نیمه جامد هر دو باکتری وجود داشتند اما نوارهای رشد تشکیل شده مربوط به هلیکوباکتر پیلوری بودند و به طور کلی تعداد سلول‌های زنده هلیکوباکتر پیلوری بیشتر بود: هلیکوباکتر پیلوری [$۱۰^{۵}$ × (۴۱ ± ۴۶۴)]، لاکتوباسیلوس کازئی [$۱۰^{۵}$ × (۱۰ ± ۱۱۲)].



نمودار ۱- تعداد سلول زنده (CFU) لاکتوباسیلوس پلنتاروم (♦)، هلیکوباکتر پیلوری (▲) و مختلط آن دو (□) در سیستم ژلی تثبیت شده در کشت مختلط لاکتوباسیلوس پلنتاروم و هلیکوباکتر پیلوری ، انکوبه شده در ۳۷°C برای ۳ روز (a) و ۱۷ روز (b).
ND: تشخیص داده نشد

اسیدیته: وضعیت pH در کشت خالص و مختلط برای هر سه باکتری کاهش یافت، این وضعیت در مورد کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس پلنتاروم مشابه کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم (۰/۱±۴/۵) و در مورد کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس کازئی مشابه کشت خالص هلیکوباکترپیلوری (۰/۱±۵/۵) بود. میزان کاهش pH در نمونه‌های حاوی کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس پلنتاروم و کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم حدود ۲ واحد بود و در انتهای دوره انکوباسیون (روز ۱۷) در تمام سطوح به حدود ۰/۱±۴/۵ رسید ولی در مورد کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری حدود یک واحد کاهش داشت و به ۰/۱±۵/۵ رسید. وضعیت pH در کشت مختلط لاکتوباسیلوس کازئی و هلیکوباکتر پیلوری مشابه کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری بود و در انتهای دوره انکوباسیون (۱۷ روز) به حدود ۰/۱±۵/۵ رسید اما در مورد کشت خالص لاکتوباسیلوس کازئی ۰/۱±۴/۵ بود، البته تغییرات pH و اسیدی شدن محیط همگام با نفوذ گلوکز به لایه نیمه جامد بود.

گلوکز: الگوی نفوذ گلوکز در کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس پلنتاروم (۰/۱±۷/۲) مشابه کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم (۰/۱±۸/۲) بود اما نفوذ گلوکز در کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری به داخل فاز نیمه جامد بیشتر (۰/۱±۱۶/۸) و تا حدودی مشابه کنترل یا بدون تلقیح باکتری (۰/۱±۲۰) بود، اما در کشت مختلط لاکتوباسیلوس کازئی و هلیکوباکتر الگوی نفوذ گلوکز (۰/۱±۱۳/۶) تا حدودی مشابه کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری (۰/۱±۱۶/۸) و از کشت خالص لاکتوباسیلوس کازئی کمتر بود (۰/۱±۶/۳). ظاهراً نوارهای رشد همگام با نفوذ گلوکز به لایه نیمه جامد تشکیل شدند. نوار رشد اول و دوم در مورد هر سه باکتری همزمان با رسیدن گلوکز به آن ناحیه به وجود آمدند به ویژه در مورد دو گونه لاکتوباسیلوس همگام با نفوذ گلوکز تا روز سوم نوار رشد اول و در ادامه با نفوذ گلوکز نوار رشد دوم در روز هفتم تشکیل شد، و با ادامه انکوباسیون بر تعداد آن‌ها افزوده نگشت ولی در مورد هلیکوباکتر پیلوری، نوار رشد اول، دوم و سوم همزمان با نفوذ گلوکز تا روز سوم ایجاد شدند با این تفاوت که نوار رشد سوم ظاهراً در مکانی شکل گرفت که هنوز گلوکز به آن نقطه نرسیده بود (۰±۰/۱).

بحث

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اغلب جزو فلور طبیعی اعضا مختلف بدن می‌باشند و به علت اثرات سودمندی که برای میزبان دارند مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند [۱۴، ۷-۶]. در این راستا اثر بازدارندگی و پروبیوتیکی چندین جنس باکتریایی بر علیه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]
[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]

به گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس [۱۱-۱۰، ۷]، کلستریدیوم بوتیریکوم [۱۵] و باسیلوس سابتیلیس [۱۶] اشاره کرد که اغلب اثر سوپرناتنت (شیرابه) کشت باکتری در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفته است [۱۰]، البته در شرایط درون‌تنی نیز مطالعاتی انجام شده است [۱۱-۱۰].

در مطالعه حاضر از اثر بازدارندگی دو گونه لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکوباکتر پیلوری در شرایط برون‌تنی و با استفاده از سیستم ژلی تثبیت شده که برای بررسی چگونگی رشد میکروارگانیسم‌ها در اکوسیستم‌های طبیعی در مدل‌های آزمایشگاهی کاربرد دارد، استفاده شد. در این سیستم باکتری‌ها به دلایل ناشناخته در مکان‌های خاصی از لایه نیمه جامد رشدی متراکم دارند که به صورت نوار رشد متجلی می‌شود. دو گونه لاکتوباسیلوس و هلیکوباکتر پیلوری در این سیستم نوار رشد ایجاد کردند و مشخص شد که تشکیل این نوارهای رشد تحت تأثیر فاکتورهایی چون غلظت گلوکز، تعداد باکتری‌های تلقیح شده اولیه، طول لایه نیمه جامد و شرایط انکوباسیون قرار می‌گیرد. بر عکس غلظت آگار (متحرک بودن میکروارگانیسم) در ایجاد نوار رشد تأثیر محسوسی ندارد که این مورد اخیر در مطالعات دیگران نیز قید شده است [۱۳-۱۲].

در مطالعه حاضر مشخص شد که لاکتوباسیلوس پلنتاروم قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد. در سیستم مورد استفاده، جهت نفوذ گلوکز از پایین به بالا و اکسیژن از بالا به پایین است، که علی‌الاصول گرادیان غلظتی را خلاف جهت یکدیگر در طول لایه نیمه جامد ایجاد می‌کنند و لذا رشد و فعالیت هر یک از باکتری‌های تلقیح شده در جایگاه‌های خاص تابع خصوصیات اکولوژیکی موجود و وضعیت فیزیولوژیک آن‌ها می‌باشد. با بررسی وضعیت رشد و محل نوارهای رشد می‌توان پی برد که لاکتوباسیلوس پلنتاروم رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار کرده است، زیرا الگوی ایجاد نوار رشد کشت مختلط با کشت خالص لاکتوباسیلوس پلنتاروم مشابه است که با تعداد سلول‌های زنده و جذب نوری سطوح مختلف نیز هم‌خوانی دارد.

کاهش pH درطول لایه نیمه جامد در مورد لاکتوباسیلوس به دلیل تخمیر کربوهیدرات‌ها (گلوکز) و تولید اسید لاکتیک است، اما در مورد هلیکوباکتر پیلوری اغلب مراجع آن را باکتری غیرتخمیری می‌دانند [۱۸-۱۷]، هرچند که قادر به متابولیزه کردن گلوکز می‌باشد [۱۹، ۱۷] و محصول نهایی متابولیسم، اسید لاکتیک است [۱۹]. به احتمال زیاد لاکتوباسیلوس‌ها با تولید اسیدهای آلی مثل اسید لاکتیک و باکتریوسین باعث مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری می‌شوند. در برخی از مطالعات بر این نکته تأکید شده که علت مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری اسیدهای آلی ناشی از متابولیسم باکتری هستند [۷،۲۰]، اما در تعدادی از مطالعات اخیر نشان داده شده که در غلظت‌هایی که لاکتوباسیلوس‌ها تولید اسید لاکتیک می‌کنند، نمی‌توانند رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار نمایند، چون سوش‌های مختلف یک گونه که توانایی تولید اسید یکسانی داشتند در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری توانایی متفاوتی داشتند، حتی بعضی از سوش‌ها قادر به مهار هلیکوباکتر پیلوری نبودند لذا علت مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری را باکتریوسین‌ها می‌دانند [۱۶، ۱۱].

در این تحقیق نیز علت مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری به وسیله لاکتوباسیلوس پلنتاروم احتمالاً بیشتر ناشی از اثر باکتریوسین‌ها است چون در مکان‌هایی که هنوز گلوکز نرسیده و به طبع pH اسیدی نشده است لاکتوباسیلوس پلنتاروم رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار نموده است. ترشح باکتریوسین‌های مختلف توسط لاکتوباسیلوس پلنتاروم توسط محققین متعددی گزارش گردیده است [۲۲-۲۱].

در مطالعه حاضر گونه لاکتوباسیلوس کازئی به کار گرفته شده ظاهراً قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری نبوده و الگوی رشد کشت مختلط از کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری پیروی می‌کند و این عدم مهار چه در شکل ظاهری و چه در شمارش سلول زنده و جذب نوری سطوح مختلف لایه نیمه جامد مشهود است. لازم به ذکر است با افزایش زمان انکوباسیون تعداد سلول‌های زنده کاهش می‌یابد و به طور نسبی تعداد لاکتوباسیلوس کازئی شمارش شده بیشتر از هلیکوباکتر پیلوری می‌باشد ولی نوارهای رشد تشکیل شده مربوط به هلیکوباکتر پیلوری بودند.

نتیجه‌گیری

تا آن جا که اطلاع داریم این سیستم برای اولین مرتبه جهت اهداف پروبیوتیکی مورد استفاده قرار گرفت، و با توجه

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]

به یافته‌های این پـژوهش لاکتوباسـیلوس پلنتـاروم کاندیـدای مناسبی جهت اهداف پروبیوتیک در برابر هلیکوبـاکتر پیلـوری می‌باشـد امـا لاکتوباسـیلوس کـازئی (سـویه کـازئی) کـارآیی چنـدانی نـدارد. لـذا پیـشنهاد مـی‌شـود کـه کـاربرد عملـی (درون‌تنی) لاکتوباسیلوس پلنتاروم مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

در پایان از پرسنل و اعضاء محترم علمی گـروه میکـروب‌شناسـی دانشگاه علـوم پزشـکی کرمـان و رفـسنجان و کلینیـک دام‌پزشـکی دانشگاه شهید باهنر کرمان تقدیر و تشکر می‌نماییم.

References

[1] Ernest p. The disease spectrum of Helicobacter pylori: the immunopathogenesis of gastrodudenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, 2000; 45: 615-40.

[2] Graham DY. Therapy of Helicobacter pylori: current status and Issues. *Gastroenterology*, 2000; 118(2 suppl1): S2-8.

[3] Calam J. Clinicians' Guide to Helicobacter pylori. London. Chapmon and Hall. 1996; pp: 23-38, 93-116.

[4] Axon AT. Treatment of Helicobacter pylori: future therapeutic and prophylactic perspectives. *Gut*, 1998; 43(suppl 1): S70-3.

[5] Gibson GR and Collins MD. Concept of balanced colonic micro- biota, prebiotics, and synbiotics. In: Hanson LA and Yolken RH (Eds). Probiotic, other nutritional factors, and intestinal microflora. Philadelphia. *Lippincott-Ravin*, 1999; 42: 139-57.

[6] Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri E, Salminen SJ. The ability of probiotic bacteria to bind to human intestinal mucus. *FEMS Microbiol Lett*, 1998; 167(2): 185-9.

[7] Naidu AS and Clements RA. Probiotic.In Naidu AS (Ed). Natural food antimicrobial systems. Boca Rayon, Press. 2000; pp: 431-62.

[8] Williams MP, Pounder RE. Helicobacter pylori: from the benign to the malignant. *Am J Gastroenterol*, 1999; 94 (11Suppl): S11-16.

[9] Drasar BS. The bacterial flora of the stomach and small intestine. *Gastroenterol Clin Biol*, 1989; 13(1 pt1): 18B-20B.

[10] Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of Helicibacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murin model. *Gut*, 1997;41(1): 49-55.

[11] Testerman TL, McGee DJ, Mobly HL. Adherence and colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Eds). Helicobacter pylori (physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press. 2001; pp: 381-417.

[12] Wimpenny JW. Response of microorganisms to physical and chemical gradients. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* 1982; 297(1088): 497-515.

[13] Wimpenny JWT, Coombs JP, Lovitt RW and whittaker SG. A gel-stabilized model ecosystem for investigating microbial growth in spatially ordered solute gradient. J *Gen Microbiol*, 1981; 127: 227-87.

[14] Gibson GR. Human gut microbiology: The end of the food chain or the start of good health? *Microbiology Today*, 2002; 29: 4-6.

[15] Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Kamiya S. Studies of the effect of Clostridium butyricum on Helicobacter pylori in several test models including gnotobiotic mice. *J Med Microbiol,* 2000; 49(7): 635-42.

[16] Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, Fenet B, Sorokulova IB, Me graud F, et al. In vitro anti- Helicobacter pylori activity of the probiotic strain Bacillus subtilis 3 is due to secretion of antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother,* 2001; 45(11): 3156-61.

[17] Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. Glucose utilization and lactate prodution by Helicobacter pylori. *J Gen Microbiol*, 1993; 139(12): 3023-8.

[18] Nachamkin I and Skirrow MB. Campylobacter, Arcobacter and Helicobacter. In: Collier Lesli, Balows Albert and Sussman Max (Eds).Toply and Wilson's Microbiology and Microbial Infection. 9 ed., London, Arnold. 1998; pp: 1237-56.

[19] Mendz GL, Hazell SL. Glucose phosphorilation in Helicobacter pylori. *Arch Biochim Biophys*, 1993; 300(1): 522-5.

[20] Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of Helicobacter pylori to the glicolipid reseptors by probiotic Lactobacilus reuteri. *FEMS Immiunol Med Microbiol*, 2002 ; 32(2): 105-10.

[21] Ennahar S, Aoude-Werner D, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Bringel F, Hubert JC, et al. Production of pediocin AcH by Lactobasillus plantarum WHE92 isolated from cheese. *Appl Environ Microbiol*, 1996; 62(12): 4381-7.

[22] Jimenez – Diaz R, Ruiz – Barba JL, Cathcart D, Holo H, Nes IF, Sletten KH, et al. Purification and partial amino acid sequence of plantaricin S, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum LPCO 10, the activity of which depend on the complementary action of two peptides. *Appl Environ Microbiol*, 1995; 61(12): 4459-63.

[Downloaded from journal.rums.ac.ir on 2025-07-14]

[DOR: 20.1001.1.17353165.1385.5.2.7.4]