

بررسی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی بر رشد هلیکوباکتر پیلوری

ابراهیم رضازاده زرنندی*، دکتر حمید عبداللهی*، محمد کاظمی عرب آبادی*

تاریخ دریافت مقاله: ۸۴/۱۱/۱

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۵/۵/۱۲

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی رفسنجان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی
** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان، دانشکده پزشکی، گروه میکروبیشناسی

چکیده

زمینه و هدف: هلیکوباکتر پیلوری باکتری گرم منفی خمیده ای است که در مخاط معده مستقر و برای سال‌ها در آنجا باقی می‌ماند و بیماریهای مختلفی چون زخم معده و دوازدهه ایجاد می‌کند. امروزه برای درمان عفونت آن از آنتی بیوتیک استفاده می‌گردد ولی روش‌های درمانی دیگری نیز مطرح شده و تحت بررسی است که از آن جمله استفاده از ارگانیسیم های زنده پروبیوتیک چون لاکتوباسیلوس ها (لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی) را می‌توان نام برد. مشخص شده است که عصاره کشت لاکتوباسیلوس رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار می‌کند لذا در این پژوهش اثرات مهاري یک گونه لاکتوباسیلوس بر رشد هلیکوباکتر پیلوری در کشت مختلط و احتمالاً با شرایطی شبیه درون تنی بررسی شد.

مواد و روش کار: این پژوهش در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گردید و برای مطالعه اثرات ضد باکتریایی و آنتاگونیستیکی لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی در برابر هلیکوباکتر پیلوری از سیستم زلی تثبیت شده استفاده شد که این سیستم دارای دو فاز بود یکی فاز جامد حاوی محیط Peptone Yeast extract salt solution، ۱/۵٪ آگار و ۲٪ گلوکز و فاز نیمه جامد حاوی محیط Yeast extract salt solution، ۰/۷۵٪ آگار و $10^7 \times 1/5$ باکتری در ملی لیتر محیط کشت بود. در این سیستم لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی و هلیکوباکتر پیلوری به تنهایی و بطور مختلط کشت داده شدند. از آنها با چوب پنبه سوراخ کن استریل نمونه گرفته شد و جمعیت هر باکتری، جذب نوری، pH و گلوکز محاسبه گردید.

یافته ها: باکتریهای مورد بررسی در این سیستم در طول لایه نیمه جامد در مکان های خاصی رشد متراکم داشتند که بصورت نوار رشد آشکار شد. وضعیت رشد (نوارهای رشد)، شمارش جمعیت باکتریایی، جذب نوری و pH در کشت مختلط هلیکوباکتر پیلوری و لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی با کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری مشابه بود.

نتیجه گیری: با بررسی های بعمل آمده مشخص شد لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی رشد هلیکوباکتر پیلوری در کشت مختلط را مهار نمی‌کند. بنابراین لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی کاندیدای مناسبی جهت اهداف پروبیوتیکی نمی‌تواند باشد. (مجله طبیب شرق، سال نهم، شماره ۲، تابستان ۸۶، ص ۱۱۳ تا ۱۲۲)

کلید واژه ها: اثرات آنتاگونیستیکی، هلیکوباکتر پیلوری، لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی، کشت مختلط

مقدمه

محسوب می‌گردد.^(۱-۳) تخمین زده می‌شود که حدود ۵۰٪ افراد به این باکتری آلوده‌اند^(۴، ۵) و واکنش مناسبی نیز در برابر آن ساخته نشده است.^(۶، ۷) راهکار درمانی کنونی استفاده از آنتی بیوتیکها می‌باشد که آن هم با امکان عود عفونت و ابتلای

هلیکوباکتر پیلوری، باکتری گرم منفی و خمیده و اووره آز مثبتی است که در مخاط معده مستقر و برای سالها در آنجا باقی می‌ماند و با تولید آمونیاک و توکسین ایجاد زخم معده و اثنی عشر می‌کند. این باکتری فاکتور احتمالی ایجاد سرطان معده

مجدد همراه است. (۹-۶)

لايه نيمه جامد كه باكتري در آن پخش شده است نواحی متراکم رشد ایجاد می کنند که نوار رشد نامیده می شود. (۲۰،۲۱)

روش کار

این پژوهش در سال ۱۳۸۱ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان انجام گرفت و به این منظور لاکتوباسیلوس کازئی زیرگونه کازئی (L.casei subsp casei PTCC 1608) از کلکسیون قارچ ها و باکتریهای صنعتی و عفونی ایران تهیه شد. پس از انتقال و رشد در محیط کشت MRS Broth [(Deman,Rogosa,Sharp) ساخت شرکت BBL] از نظر مورفولوژی و خصوصیات آزمایشگاهی مورد بررسی و تأیید مجدد قرار گرفت. این باکتری ماهیانه در محیط فوق پاساژ داده شده و برای انجام آزمایش ها از کشت های تازه استفاده گردید. ضمناً جهت تهیه هلیکوباکتر پیلوری K46 نیز از کلکسیون باکتریهای آزمایشگاه میکروشناسی 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 °C ۷۰- به صورت ماهیانه در محیط بروسلا برات (مرک) حاوی ۷٪ سرم سیراته اسب پاساژ و از کشت تازه آن برای انجام آزمایش ها استفاده شد.

برای انجام آزمایش ها از سیستم ژلی تثبیت شده استفاده گردید. در این سیستم از دو لایه جامد و نیمه جامد با پایه Peptone Yeast extract Salt Broth (PYS Broth) ساخت شرکت مرک استفاده شد که لایه جامد در حجم ۱۰ میلی لیتر و به ابعاد ۵ × ۲ سانتیمتر و اسیدیته ۶/۵ حاوی ۱/۵٪ آگار و ۲٪ گلوکز و لایه نیمه جامد در حجم ۱۵ میلی لیتر و به ابعاد ۷/۵ × ۲ سانتیمتر و اسیدیته ۶/۵ حاوی ۱/۷۵٪ آگار همراه با ۱۰^۷ × ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر از محیط کشت بود. (۲۰،۲۱) ابتدا لایه جامد ساخته و در لوله هایی با حجم ۳۰ میلی لیتر (2×15 سانتی متر) توزیع شد، این لوله ها در دمای °C ۱۱۵ و فشار ۱۰ پوند به مدت ۱۰ دقیقه استریل شدند و در دمای اتاق بحالت عمودی قرار گرفتند تا به شکل جامد درآمدند. همزمان

یکی از روشهایی که امروزه برای جلوگیری از عفونت های میکروبی مورد توجه محققین قرار گرفته استفاده از ارگانسیم های زنده (پروبیوتیک) می باشد «ارگانسیم های پروبیوتیک میکروارگانسیم های زنده ای هستند که وقتی مصرف شوند اثرات سود مندی برای میزبان دارند» (۱۰،۱۲،۱۱) لاکتوباسیلوس ها جزو مهمترین پروبیوتیک ها می باشند. (۱۱،۱۳،۱۴) این میکروارگانسیم های گرم مثبت علاوه بر تولید اسید های آلی مانند اسید لاکتیک، باکتریوسین های متعددی نیز ترشح می کنند که دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند. (۱۵،۷) این باکتریها توانایی استقرار و ماندن در شرایط اسیدی معده را دارند و جزو معدود میکروارگانسیم هایی هستند که از محیط اسیدی معده جدا می شوند. (۹،۱۶،۱۷) بنابراین اثرات آنتاگونیستیکی و پروبیوتیکی آنها در برابر هلیکوباکتر پیلوری مورد توجه محققین قرار گرفته است. (۱۳،۱۶،۱۸،۱۹) در بررسی های بعمل آمده مشخص شده است که عصاره کشت لاکتوباسیلوس ها رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار می نماید و در ادامه در بررسی های درون تنی که در موش صورت گرفته مشخص شده است موش هایی که قبل از آلودگی دهانی بوسیله هلیکوباکتر پیلوری لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دریافت نمودند و این باکتری در معده آنها مستقر شده بود به عفونت هلیکوباکتر پیلوری دچار نمی شدند اما موش هایی که ابتدا توسط هلیکوباکتر پیلوری آلوده شدند و سپس لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دریافت نمودند نتوانستند هلیکوباکتر پیلوری را در معده نابود نمایند هرچند از تعداد هلیکوباکتر پیلوری کاسته شده بود. (۱۶) لذا با توجه به امکانات موجود و برای اولین بار سعی شد اثرات مهاری لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی بر رشد هلیکوباکتر پیلوری در کشت مختلط و در شرایط برون تنی با استفاده از روش ساده سیستم ژلی تثبیت شده بررسی شود این سیستم از دو لایه جامد (۱/۵٪ آگار) و نیمه جامد (۱/۷۵٪ آگار) تشکیل شده است. در این سیستم باکتری ها به دلایل ناشناخته در مکانهای خاصی در

کلنی های موجود در محیط کشت فاقد آنتی بیوتیک مربوط به هر دو باکتری می بودند. با کم کردن تعداد کلنی های شمارش شده روی محیط آنتی بیوتیک دار از محیط فاقد آنتی بیوتیک جمعیت باکتریایی لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی محاسبه شد.

پس از کشت، از لوله های با رقت یک بیستم دو میلی لیتر برداشت و جذب نوری آنها بوسیله اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت شد. در ادامه از لوله های با رقت یک بیستم ۴۰ میکرو لیتر برداشته و به دو میلی لیتر معرف گلوکز اکسیداز (کیت من) اضافه و پس از ۱۵ دقیقه قرار دادن در 37°C جذب نوری آن در طول موج ۵۰۰ نانومتر بوسیله اسپکتروفتومتر قرائت شد و با استفاده از منحنی استاندارد غلظت گلوکز در هر قسمت از طول لایه نیمه جامد بر اساس میلی مولار در لیتر محاسبه و در انتها اسیدیته محیط های کشت سیستم ژلی تثبیت شده به وسیله قرار دادن نوار های pH متر (MACHERY NAGEL) با دقت مثبت ۰/۱ روی قطعات ژل که از محیط کشت مشابه تهیه شده بود، اندازه گیری شد.

یافته ها

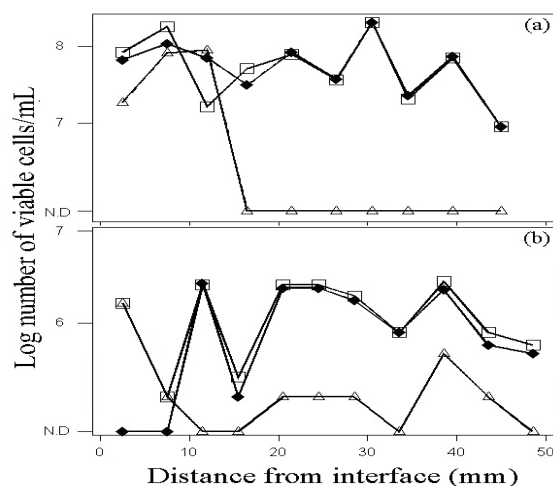
جذب نوری سطوح مختلف لایه نیمه جامد و الگوی کشت مختلط (محل و تعداد نوار) دو باکتری مشابه کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری بود (شکل ۱ و ۴) در شمارش سلول زنده، هر دو باکتری وجود داشتند ولی نوارهای رشد مربوط به هلیکوباکتر پیلوری بیشتر بودند و در کل تعداد سلول زنده هلیکوباکتر پیلوری بیشتر بود (شکل ۲).

اسیدیته محیط در کشت خالص و مختلط هر باکتری نسبت به اسیدیته اولیه محیط کشت ($\text{pH}=6/5$) کاهش یافت اما مقدار و میزان آن با هم فرق می کرد. بترتیب در کشت خالص لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی با ۲ واحد کاهش به حدود $4/5 \pm 0/1$ در روز هفدهم رسید و در مورد کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری با یک واحد کاهش به $5/5 \pm 0/1$ رسید اما در مورد کشت مختلط در اغلب قسمت ها تقریباً مشابه کشت

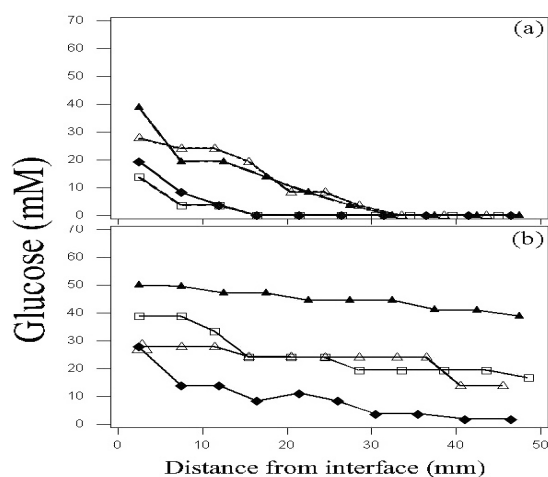
محیطهای نیمه جامد نیز جداگانه استریل شدند و در بن ماری قرار گرفتند تا دمای آنها به 42°C رسید، سپس تعداد مشخصی باکتری ($10^7 \times 1/5$) باکتری به ازای هر میلی لیتر محیط کشت از شیرابه باکتریایی ۰/۵ مک فارلند) که قبلاً سه دفعه با فسفات بافر استریل و با pH برابر ۷ شسته شده بودند اضافه و به مدت ۱۰ ثانیه توسط شیکر تکان داده شدند و در شرایط استریل محتوای این لوله ها به لوله های حاوی لایه نیمه جامد تثبیت شده اضافه گردید. لوله ها به حالت عمودی قرار گرفتند و پس از جامد شدن در شرایط هوایی در گرمخانه با دمای 37°C بمدت ۳ تا ۱۷ روز قرار گرفتند. نمونه برداری از لایه نیمه جامد توسط چوب پنبه سوراخ کن با قطر ۵ میلی متر در زمانهای مختلف (۳، ۱۱، ۷ و ۱۷ روز) انجام و بررسی های زیر صورت گرفت.

نمونه های برداشت شده از کل طول لایه نیمه جامد به آرامی در شرایط استریل داخل پلیت شیشه ای که از پشت خط کشی شده بود تخلیه شد. سپس بوسیله اسکالپل استریل قطعات استوانه ای نمونه در اندازه های مشخص بریده شدند و در لوله هایی با حجم مناسب فسفات بافر قرار گرفتند بطوریکه همواره رقت برابر یک بیستم بود. در ادامه قطعات ژل با بکارگیری دستگاه هموژنایزر شیشه ای با پیستون تفلون خرد و هموژنیزه شدند و از آنها رقت های متوالی تهیه و از رقت های مناسب برداشته شد و روی دو سری محیط کشت با پایه مولر هینتون آگار حاوی ۰/۷٪ سرم سیتراته اسب برای تقویت رشد و شمارش سلول زنده به صورت دوپل کشت گردید. یک سری از این پلیت ها حاوی آنتی بیوتیک کوتریموکسازول (حاوی ۸ میلی گرم سولفامتاکسازول و ۱/۶ میلی گرم تری متوپریم در لیتر) که منحصراً "هلیکوباکتر پیلوری در آن رشد می کرد و محیط بدون آنتی بیوتیک که هر دو باکتری قادر به رشد بودند، استفاده گردید. پس از چهار روز انکوباسیون در شرایط میکروآتروفیلیک کلنی های ظاهر شده در پلیت های حاوی آنتی بیوتیک منحصراً متعلق به هلیکوباکتر پیلوری بودند اما

هلیکوباکتر پیلوری K46 (۳- هلیکوباکتر پیلوری) GB K46
: Growth Band; نوار رشد (DFI (Distance from interface)
مد فاصل لایه جامد و نیمه جامد



شکل ۲: تعداد سلول زنده (CFU) لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی
کد ۱۶۰۸ (Δ)، هلیکوباکتر پیلوری K46 (◆) و کشت مختلط (□)
در سیستم ژلی تثبیت شده، انکوبه شده در ۳۷ ° C برای ۳ روز
(a) و (b) روز ۱۷ : N.D. (Not Detected) (تشخیص داده نشد)

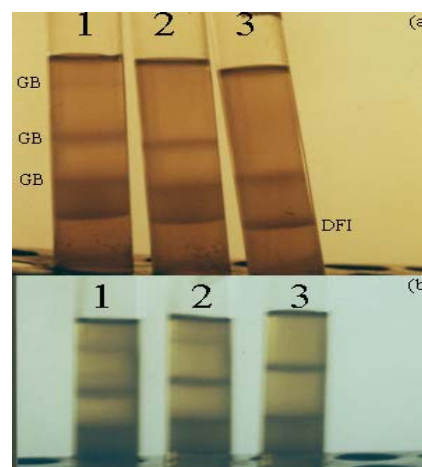


شکل ۳: پروفیل غلظت گلوکز در سطوح مختلف لایه نیمه جامد
سیستم ژلی تثبیت شده و تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی -
کازئی کد ۱۶۰۸ (◆)، هلیکوباکتر پیلوری K46 (Δ) و کشت
مختلط (□) و کنترل (بدون تلقیح باکتری) (▲) انکوبه شده در ۳۷ °
C برای ۳ روز (a) و (b) روز ۱۷.

خالص هلیکوباکتر پیلوری بود با این تفاوت در نزدیک سطح
جامد دو واحد افت داشت و به $0.1 \pm 4/5$ رسید. تغییرات
همگام با نفوذ گلوکز در لایه نیمه جامد بود

الگوی مصرف گلوکز کشت مختلط لاکتوباسیلوس
کازئی- کازئی و هلیکوباکتر پیلوری تا حدودی مشابه کشت
خالص لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی و از کشت خالص
هلیکوباکتر پیلوری کمتر بود (شکل ۳). مصرف گلوکز در
کشت خالص لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی و مختلط بیشتر از
کشت خالص هلیکوباکتر پیلوری بود.

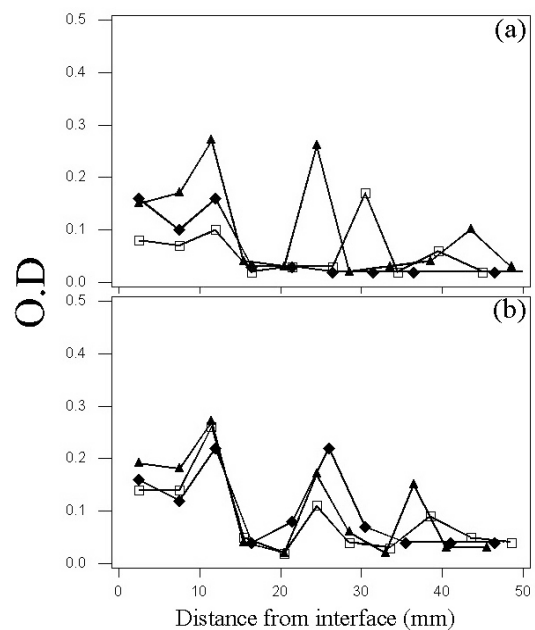
نوارهای رشد همگام با نفوذ گلوکز به لایه نیمه جامد
تشکیل شدند (شکل ۱) نوار رشد اول و دوم در مورد هر دو
باکتری همزمان با رسیدن گلوکز به آن ناحیه بوجود آمدند بویژه
در مورد لاکتوباسیلوس کازئی همگام با نفوذ گلوکز تا روز
سوم نوار رشد اول و در ادامه با نفوذ گلوکز نوار رشد دوم در
روز هفتم تشکیل شد. با ادامه 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.



شکل ۴: تشکیل نوار رشد در سیستم ژلی تثبیت شده در غلظت
% گلوکز و انکوبه شده در ۳۷ °C [برای ۳ روز (a) و (b) روز ۱۷]
شرایط هوای: ۱- لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی با کد ۱۶۰۸-
کشت مختلط (لاکتوباسیلوس کازئی- کازئی با کد ۱۶۰۸ و

مطالعات اغلب مایع رویی حاصل از کشت باکتری در مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفته است^(۱۸) و مشخص شده عصاره کشت آنها رشد هلیکوباکتر پیلوری را مهار می‌نماید، البته در شرایط درون تنی نیز مطالعاتی انجام شده است^(۱۸،۱۹) و مشخص شده پروبیوتیک‌ها و از جمله لاکتوباسیلوس‌ها سطح سرمی آنتی‌بادیهای ضد هلیکوباکتر پیلوری را کاهش می‌دهند و حتی سبب کاهش تعداد هلیکوباکتر پیلوری در معده می‌شوند اما قادر به ریشه کنی و دفع کامل باکتری نمی‌باشند.^(۲۷)

در پژوهش‌های قبلی اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس‌ها بر رشد هلیکوباکتر پیلوری بصورت کشت مختلط مورد بررسی قرار نگرفته است لذا در این پژوهش برای اولین مرتبه اثرات بازدارندگی لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی بر هلیکوباکتر پیلوری در محیط برون تنی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری نمی‌باشد. از این یافته می‌توان چنین نتیجه گرفت که لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی قادر به رقابت با هلیکوباکتر پیلوری در محیط درون تنی نیست و شاید علت اینکه مایع رویی حاصل از کشت پروبیوتیک‌ها (از جمله لاکتوباسیلوس کازئی) در محیط برون تنی قادر به مهار هلیکوباکتر پیلوری است ولی در شرایط درون تنی موفقیت چندانی ندارد^(۲۸،۲۹) این باشد که قادر به رقابت با هلیکوباکتر پیلوری نیست. برای مثال کاتز و همکاران اثر پروبیوتیکی عصاره کشت لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا را بر هلیکوباکتر پیلوری بررسی نمودند. لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا رشد هلیکوباکتر پیلوری را در شرایط برون تنی مهار می‌نماید و حتی فعالیت اوهر آزی باکتری (فاکتور مهم در ایجاد زخم معده) را نیز کاهش می‌دهد. در بررسی کاتز و همکاران نشان داده شد که وجود سلول‌های زنده لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا جهت مهار رشد هلیکوباکتر



شکل ۴: پروپیل جذب نوری سطوح مختلف لایه نیمه جامد سیستم ژلی تثبیت شده در ۵۵۰ نانومتر و تلقیح شده با لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی ۱۶۰۸ (◆)، هلیکوباکتر پیلوری K46 (▲) و کشت مختلط (□)، انکوبه شده در ۳۷ °C برای ۳ روز (a) و ۱۷ روز (b).

بحث

یافته‌های این پژوهش نشان دادند که لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط برون تنی و در کشت مختلط نمی‌باشد بنابراین لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی نمی‌تواند کاندیدای مناسبی برای اهداف پروبیوتیکی بر علیه هلیکوباکتر پیلوری باشد.

پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که اغلب جزو فلور طبیعی اعضا مختلف بدن می‌باشند و بعلاوه اثرات سودمندی برای میزبان دارند مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند.^(۲۴-۲۶، ۱۳، ۱۴، ۱۵، ۱۶) در این راستا اثر آنتاگونیستیکی و پروبیوتیکی چندین جنس باکتری بر علیه هلیکوباکتر پیلوری مورد بررسی قرار گرفته است که از آن جمله می‌توان به گونه‌های مختلف لاکتوباسیلوس^(۱۳، ۱۶، ۱۸، ۱۹)، کلاستریدیوم بوتیریکوم^(۲۵) و باسیلوس سابیلیس^(۲۶) اشاره کرد که در این

پیلوری لازم است. برای اینکه عصاره فیلتر شده کشت لاکتوباسیلوس کازئی سویه شیروتا (فاقد سلول) نتواسته است به اندازه عصاره کشت حاوی سلول، رشد هلیکوباکتر پیلوری مهار نماید^(۲۹). بنا براین مشاهده می شود که این مطالعه از این جنبه با پژوهش حاضر همخوانی ندارد. علت را می توان در این نکته جستجو کرد که گونه های مختلف لاکتوباسیلوس دارای توانایی یکسانی در مهار هلیکوباکتر پیلوری نیستند.^(۱۶،۱۹،۲۶)

در پژوهش دیگر Sykora و همکاران اثر پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی سویه DN-114001 را بر هلیکوباکتر پیلوری بررسی نموده و نتایج کار آنها نشان می دهد که این سویه لاکتوباسیلوس کازئی قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری می باشد و در صورتیکه با رژیم درمانی آنتی بیوتیکی ویژه هلیکوباکتر پیلوری (امپرازول، آموکسی سیلین و کلاریترومایسین) مصرف شود احتمال درمان را افزایش می دهد. اما این احتمال معنی دار نیست^(۲۸) و از این جهت با پژوهش حاضر می تواند هم خوانی داشته باشد لذا پیشنهاد می گردد برای انتخاب گونه مناسب جهت اهداف پروبیوتیک در برابر هلیکوباکتر پیلوری و یا هر پاتوژن دیگر علاوه بر توجه به شرایطی چون تولید باکتریوسین و اسید های آلی به اثرات آن دو باکتری در کشت مختلط به روش سیستم ژلی تثبیت شده و یا هر روش مناسب دیگر نیز توجه گردد و بهتر است گونه هایی جهت اعمال پروبیوتیک استفاده شوند که قادر به رقابت و حذف پاتوژن در محیط برون تنی و در کشت مختلط باشند.

لازم است به این نکته توجه شود که این سیستم نمی تواند شرایطی مانند معده که عوامل گوناگون همزمان بر هلیکوباکتر پیلوری و بر لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی موثرند را باز سازی نماید اما حداقل شرایط مناسب را برای دو باکتری فراهم می نماید، تا در رقابت با یکدیگر برای اکتساب منبع کربن

هلیکوز) با هم رقابت نمایند. و بر این اساس مشاهده می شود که علیرغم اینکه لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی تولید اسید های آلی (کاهش اسیدیته) و احتمالاً مواد ضد میکروبی را مهار می نماید اما موفق به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری نمی شود و حتی مغلوب نیز می گردد. شاید یک علت آن این باشد که هلیکوباکتر پیلوری نیاز به گلوکز جهت رشد ندارد هرچند که گلوکز را متابولیزه و اسید لاکتیک تولید می نماید^(۳۰،۳۱) و می تواند جمعیت خود را بیش از لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی افزایش دهد (رشد هلیکوباکتر پیلوری در مناطقی که هنوز گلوکز نرسیده است).

همچنین یاد آوری می شود که حتی ممکن است توانایی سویه های مختلف یک گونه نیز در مهار رشد عامل زخم معده متفاوت باشد.^(۲۶،۱۹،۱۶) لذا بررسی های بیشتر در مورد اثر پروبیوتیکی لاکتوباسیلوس کازئی و سویه های مختلف آن و دیگر گونه های لاکتوباسیلوس بر علیه هلیکوباکتر پیلوری ضروری است.

بنابراین بر اساس نتایج این پژوهش می توان نتیجه گرفت که لاکتوباسیلوس کازئی - کازئی قادر به مهار رشد هلیکوباکتر پیلوری در شرایط برون تنی و احتمالاً در شرایط درون تنی نمی باشد.

سپاسگزاری

در پایان از پرسنل و اعضاء محترم علمی گروه میکروشناسی دانشگاه علوم پزشکی کرمان، رفسنجان و کلینیک دامپزشکی دانشگاه شهید باهنر کرمان تقدیر و تشکر می نمایم.

References

1. Chowders MY, Keller N, Tol R, et al. Human gastrin: A Helicobacter pylori-specific growth factor. Gastroenterology 1999; 117:1113-1118.

منابع

2. Cover TL, Berg DE, Blaser MJ, et al. H.pylori pathogenesis. In: Groisma Eduardo A (Ed). Principles of bacterial pathogenesis. San Diego, Academic Press. 2001; 506-558.
3. Dixon MF. Pathology of Gastritis and Peptic ulceration. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Eds). Helicobacter.pylori (physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press. 2001; 459-469.
4. Anderssen EL, Bao Diep D, Nes IF, et al. Antagonistic activity of Lactobacillus.plantarum C11:Two new two-peptide bacteriocins,plantaricin EF and JK,and induction factor plataricin A. Appl Environ Microbiol 1998; 64(6): 2269-2272.
5. Borody TJ. Flora power-fecal bacteria cure chronic C.difficile diarrhea. Am J gastroenterol 2000; 95(11): 3028-3029.
6. Axon ATR. Treatment of Helicobacter.pylori: future therapeutic and prophylactic perspectives. Gut 1998; 43(suppl 1): S70- S77.
7. Rodrigouez JJ, Cintas LM Casaus, Suarez A , et al. PCR detection of the lactocin S structural gene in bacteriocin- producing Lactobacilli from meat. Appl Environ Microbiol 1995; 61(7): 2802-2805.
8. Calam J. Clinician's Guide to Helicobacter pylori. London. Chapmon and Hall. 1996;23-38 & 93 - 116
9. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS and Pfaller MA: Medical Microbiology. Third ed. St Louis, Musby, Inc, 1998; 70-73,251-257.
10. Crittenden R, Laitila A, Forssell P, et al. Adhesion of bifidobacteria to granular starch and its implications in probiotic technologies. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(8):3469-3475.
11. Gibson GR, Collins MD. Concept of balanced colonic microbiota, prebiotics, and synbiotics. In: Hanson LA ,Yolken RH (1Eds). Probiotic, other nutritional factors, and intestinal microflora.Philadelphia, Lippincott-Ravin, 1999;42: 139-157.
12. Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Isolauri EJ, et al. The ability of probiotic bacteria band to the human intestinal mucus. FEMS Microbiol Lett 1998; 167: 185-189.
13. Naidu AS, Clements RA. Probiotic.In; Naidu AS (Ed). Natural food antimicrobial systems. Boca Rayon, Press,2000; 431-462.
14. Ray B. Fundamental Food Microbiology. Second ed. Boka Raton, CRC Press LLC, 2001; 201 - 224.

15. Williams MP, Pounder RE. *Helicobacter pylori*: from benign to the malignant. *Am J Gastroenterol* 1999; 64(Suppl 11):11-16.
16. Coconnier M-H, Lievin V, Hemery E, et al. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(11): 4573 – 4580.
17. Drasar BS. Bacterial flora of the stomach and small intestine. *Gastroenterol.Clin.Biol* 1989; 13: 18B-20B.
18. Kabir AMA, Aiba Y, Takagi A, et al. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murin model. *Gut* 1997; 41: 49-55.
19. Testerman TL, McGee DJ, Mobly HLT. Adherence and colonization. In: Mobley HLT, Mendz GL, Hazell SL (Eds). *Helicobacter pylori* (physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press, 2001;381-417.
20. Wimpenny JW. Response of micro organisms to physical and chemical gradients. *Phil.Trans.R.Soc.Lond* 1982; B297: 497-515.
21. Lovitt RW, Wimpenny JW. Physiological behaviour of *Escherichia coli* grown in opposing gradients of oxidant and reductant in the gradostat. *J Gen Microbiol.* 1981;127(2):269-76.
22. Coconnier MH, Liévin V, Lorrot M, et al. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(3):1152-7
23. Stein M, Rappuoli R, Covacci A. The *cag* Pathogenicity Island. In: Mobley HLT, Mendz GL and Hazell SL(1Eds). *Helicobacter Pylori* (physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press, 2001; 345-353
24. Solnick JV and Vandamme P. Taxonomy of *Helicobacter* Genus. In: Mobley HLT, Mendz GL and Hazell SL(Eds). *Helicobacter pylori* (physiology and genetics). Washington D.C, ASM Press, 2001; 39-51
25. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, et al. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice ,*J Med Microbiol.* 2000;49(7):635-642
26. Pinchuk IV, Bressollier P, Verneuil B, et al. In vitro anti- *Helicobacter pylori* activity of the probiotic strain *Bacillus subtilis* 3 is due to secretion of antibiotics.*Antimicrob Agent Chemother* 2001; 45(11): 3156-3161.

27. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, et al. In vitro and In vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain shirota. *Appl & Environ Microbiol* 2004; 70(1): 518-526
28. Sýkora J, Valecková K, Amlerová J , et al. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 and the eradication of *H. pylori* in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroenterol*. 2005; 39(8):692-698.
29. Cats A, Kuipers EJ, Bosschaert MA, et al. Effect of frequent consumption of a *Lactobacillus casei*-containing milk drink in *Helicobacter pylori* - colonized subjects. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17(3); 429-435.
30. Mendz GL, Hazell SL. Glucose phosphorylation in *Helicobacter pylori*. *Arch Biochim Biophys* 1993; 300(1): 522-525.
31. Mendz GL, Hazell SL, Burns BP. Glucose utilization and lactate production by *Helicobacter pylori*. *J Gen Microbiol* 1993; 139: 3023-3028.

Antagonistic effects of Lactobacillus casei subspecies casei on Helicobacter pylori

Rezazadeh Zarandi E, MSc* ; Abdollahi H, PhD** ; Kazemi Arababadi M, MSc*

Background: *Helicobacter pylori* is a gram negative curved bacterium, inhabited in gastric mucosa where it remains for years. It causes several diseases such as gastritis and peptic ulcer. Its conventional treatment is antibiotics therapy; however there are other methods under investigation by probiotic micro organisms like Lactobacilli. It is reported that Lactobacilli supernatant inhibits *H. pylori* growth. In the present study, inhibitory effects of a subspecies of Lactobacillus genus, *L. casei casei*, on *H. pylori* growth in a mix culture was investigated.

Materials & Methods: The study was performed in 2002, using a gel stabilized system. This system consisted of two layers including a solid PYS (peptone yeast extract salt solution) medium containing 1.5% agar plus 2% glucose at the bottom and a semi-solid PYS medium (0.75% agar without glucose but certain number of washed bacterial cells) on the top, all in a 30 ml tubes. In this system, *L. casei casei* and *H. pylori* were cultivated alone and in mix cultures. Samples from cultures were taken by sterile cork borers, each core was sectioned into smaller size, on which viable counts, pH, glucose concentration and optical density were determined and compared to each other.

Results: The investigating organism in this system produced growth band in the semi-solid layer. The growth position (growth bands), number of viable cells, optical density and pH in the mix culture of *H. pylori* plus *L. casei casei* were similar to those in the culture of *H. Pylori* alone.

Conclusions: The results indicated that, *L. casei casei* can not prevent *H. pylori* growth in the mix culture and is not a good candidate as a probiotic against *H. Pylori*.

KEY WORDS: Antagonistic effects, *Helicobacter pylori*, *L. casei casei*, mix culture

* Microbiology Dept. Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran.

** Microbiology Dept. Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, Kerman, Iran.