بسمه تعالی

بدینوسیله گواهی می شود سرکار خانم یگانه فرخی مقاله ای با عنوان

"کاهش تشکیل بیوفیلم Helicobacter pylori توسط باکتری پروبیوتیک Bifidobacterium bifidum"

را در سومین همایش بین المللی و یازدهمین همایش ملی بیوتکنولوژی جمهوری اسلامی ایران

که از تاریخ ۱۰ تا ۱۲ شهریور ماه ۱۳۹۸ در تهران - مرکز بین المللی همایش های رازی برگزار شد،

بصورت پوستر ارائه نمودند.

نویسندگان همکار:

یگانه فرخی، علی مخدومی، زینب نشاطی، پرستو صنیعی

Iranian Biotechnology Society

دکتر سیروس زینلی

رئیس و دبیر علمی همایش

کاهش تشکیل بیوفیلم *Helicobacter pylori* توسط باکتری پروبیوتیک *Bifidobacterium bifidum*

یگانه فرخی[۱]،علی مخدومی[۱]،زینب نشاطی[۱]،پرستو صنیعی[۲]

۱- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

۲- گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران

Yeganehfarrokhi13@gmail.com

چکیده

Helicobacter pylori عامل یکی از شایع‌ترین عفونت‌ها در جهان است و حدود نیمی از جمعیت جهان را آلوده می‌کند.این میکروارگانیسم ارتباط مستقیمی با بیماری‌های گاستریت ،زخم معده ،سرطان معده و لنفومای MALT دارد.باکتری‌های پروبیوتیک میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که عوارض بیماری‌های گوارشی ازجمله عفونت ناشی از *H. pylori* را تعدیل می‌کنند.جلوگیری از تشکیل بیوفیلم توسط عوامل بیماری زا یک روش اعمال اثرات مفید پروبیوتیک ها است. در این پژوهش توانمندی تشکیل بیوفیلم توسط یک باکتری پروبیوتیک شناخته شده یعنی *Bifidobacterium bifidum* در مقایسه با باکتری *H. pylori* با روش کریستال ویوله اندازع گیری شد. همچنین توانمندی این باکتری در مهار تشکیل بیوفیلم *H. pylori* با سه روش رقابتی،جایگزینی و ممانعت ارزیابی گردید. نتایج حاصله نشان می‌دهد که میزان تشکیل بیوفیلم *B. bifidum* در روش کریستال ویوله حدود چهار برابر بیشتر از باکتری پاتوژن است. باکتری پروبیوتیک *B. bifidum* باعث کاهش تشکیل بیوفیلم *H. pylori* به میزان ۴۷.۶% ،۳۱.۷% و ۱۸.۰% در سه روش رقابتی،جایگزینی و ممانعت گردید.

کلمات کلیدی:*H. pylori*، *B. bifidum*، پروبیوتیک، بیوفیلم

مقدمه

H. pylori باکتری مارپیچی، غیر مهاجم و گرم منفی است که در دستگاه گوارشی انسان کلونیزه می‌شود و به‌طور عمومی میکروآئروفیل است (7).از زمان شناسایی جنس *Helicobacter* بیش از ۲۰ گونه از آن شناسایی‌شده است (4). آلودگی که معمولاً در اوایل زندگی به این باکتری رخ می‌دهد، برای کل زندگی باقی می‌ماند. *H. pylori* یکی از موفق‌ترین انگل‌های باکتریایی انسان است که در بیش‌تر از نیمی از جمعیت انسان کلونیزه می‌شود.در ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد علائم حاد شامل گاستریک مزمن و زخم معده گاستریک، آدنوکارسینوما،MALT لنفوما را ایجاد می‌کند (6). در تعداد کمی از افراد آلوده با درمان مناسب شیمیایی ریشه‌کن می‌شود.اگرچه پاتوژن مرتبط با معده انسان است، شواهد نشان داده قادر به زنده ماندن در محیط خارج از معده است. اطلاعاتی که نیچ اکولوژی *H .pylori* را خارج از بدن میزبان تائید کند بسیار محدود است(7).

شواهد قابل‌توجهی از کسب *H. pylori* در افرادی که آب چاه یا آب رودخانه را نوشیدن و یا در آب استخر و آبشار و رودخانه شنا کرده‌اند،رو به افزایش است. درنتیجه آب‌های محیطی ریسک دریافت *H. pylori* دارد. بر اساس منطق علمی اگر *H. pylori* قادر به زنده ماندن و مقاومت بیرون از بدن میزبان باشد ،توانایی ایجاد بیوفیلم و زنده ماندن در آن می‌تواند سؤالات بنیادی در مورد اکتساب و ریشه‌کن شدن آن را پاسخ دهد(2).

طبق تعریف FAO/WHO ،پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که مصرف آن‌ها در مقدار مناسب موجب مزایای سلامتی در میزبان می‌شود. باکتری‌های پروبیوتیک دارای چندین ویژگی ازجمله ترجیحاً با منشأ انسانی ، فاقد ویژگی‌های پاتوژنی ،تولید مواد ضد میکروبی ،مقاومت به pH اسیدی معده و نمک صفراوی، توانایی اتصال به غشای موکوس و یا سلول‌های گوارشی ،مقاومت در سد گوارشی و توانایی القای سیستم ایمنی هستند (9). معمول‌ترین پروبیوتیک‌هایی که در انسان استفاده می‌شوند میکروارگانیسم‌های متعلق به جنس‌های بیفیدوباکتریوم ،لاکتوباسیلوس ،ساکارومایسز و باسیلوس است (4). بیفیدوباکترها باکتری‌های گرم مثبت، بی‌هوازی، غیر متحرک، فاقد قدرت اسپور زایی، کاتالاز منفی هستند که محیط زندگی عادی آن‌ها ناحیه کولون لوله گوارش انسان و حیوان است و تعداد آن‌ها به‌جز هنگام کهولت سن که کاهش می‌یابد، ثابت است. ولی عواملی مثل رژیم غذایی، آنتی‌بیوتیک‌ها و استرس هم می‌تواند باعث تغییر در تعداد آن‌ها شود.پروبیوتیک‌ها مواد مختلفی تولید می‌کنند که هم بر روی گرم مثبت‌ها وهم روی گرم منفی‌ها اثر می‌گذارند و شامل اسید چرب با زنجیره کوتاه مثل استات، لاکتات، سوکسینات، بوتیرات، H_2O_2و ترکیبات باکتریوسین است. پروبیوتیک‌ها با اتصال به جایگاه‌های اتصال موجود در سلول‌های پوششی، رقابت با باکتری‌های پاتوژن برای دریافت مواد مغذی، کاهش pH ، تولید باکتریوسین وH_2O_2 از حضور این باکتری‌های مضر در روده جلوگیری می‌کنند (5).

مصرف بعضی از پروبیوتیک‌ها با فعالیت ضد *H. pylori* و امکان ریشه‌کن کردن آن در ارتباط است. مکانیسم‌های مختلفی برای اثر باکتری‌های پروبیوتیک بر *H. pylori* در in vitro در نظر گرفته می‌شود. برای مثال در جنس لاکتوباسیلوس .اولین مکانیسم تولید لاکتیک اسید است که سبب مهار اوره آز با کاهش pH معده است.دومین مکانیسم تولید باکتریوسین لاکتوباسیلوس است که منجر به مرگ *H. pylori* می‌شود.مکانیسم بعدی مهار اتصال به سلول اپیتلیال و مکانیسم آخر پایداری سد گاستریک با تولید موسین ، پاسخ ایمنی و مهار ژن‌های جزایر پاتوژنسیته cag است(9). در این پژوهش اثرات ضد بیوفیلمی باکتری پروبیوتیک *B. bifidum* بر باکتری *H. pylori* در محیط In Vitro ارزیابی گردیده است.

مواد و روش‌ها

کشت باکتری : باکتری *H. pylori* در محیط بروسلا آگار غنی‌شده با ۷٪ خون دفیبرینه گوسفند ، ونکومایسین (5mg/L)، تری متوپریم (5mg/L)، پلی میکسین B(50µg/L) و آمفوتریسین B (4mg/L) در شرایط میکروآئروفیل (5% H2 ،10% CO2و 85% N2) در ۳۷ °C برای ۴۸ ساعت کشت داده شد(8).

باکتری *B. Bifidum* در MRS[1] آگار در شرایط میکروآئروفیل (5% H2، 10% CO2 و 85% N2) و دمای ۳۷ °C برای ۴۸ ساعت کشت گردید(9).

تشکیل بیوفیلم : برای بررسی تشکیل بیوفیلم ، *H. pylori* در بروسلا براث غنی‌شده با ۷٪ سرم جنین گاوی و *B. Bifidum* در MRS براث در دمای ۳۷ °C تلقیح شد.کشت میکروبی برای ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ و رو شناور دور ریخته شد، و رسوب با محیط کشت جدید سوسپانسیون می‌گردد تا به جذب نوری[2] (OD) 0.2 در 600 نانومتر که برابر با $5\text{-}8 \times 10^3$ CFU/mL است، رسبد. سپس 2 mL از این سوسپانسیون به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه تلقیح گردید و در دمای ۳۷ °C در شرایطی میکروآئروفیل برای دو روز گرما گذاری شد.چاهک‌ها سه بار با محلول نمک فسفات با خاصیت بافری[3] (PBS) شستشو شد.باکتری‌های متصل شده با 2 mL اتانول ۹۹٪ برای ۲۰ دقیقه در محیط اتاق تثبیت و سپس چاهک‌ها با 2 mL کریستال ویوله ۱% برای ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد.رنگ اضافی با شستشو حذف شد. چاهک‌های خشک‌شده با 2 mL اسید استیک ۳۳% تیمار می‌شوند و جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. محیط کشت بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید.(1)

مهار تشکیل بیوفیلم *H. pylori* توسط پروبیوتیک : توانایی پروبیوتیک در مهار تشکیل بیوفیلم *H. pylori* با سه روش اندازه‌گیری شد.

۱-آماده‌سازی سلول‌های بیوفیلم

باکتری‌های پاتوژن و پروبیوتیک ، به ترتیب در بروسلا براث و MRS براث در دمای ۳۷ °C کشت شد. سوسپانسیون برای ۵ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد .رو شناور دور ریخته شد و رسوب با محیط کشت جدید سوسپانسیون گردید تا به چگالی نوری[4] (OD) 0.2 در 600 نانومتر که برابر با $5\text{-}8 \times 10^3$ CFU/mL است،برسد.

۱-۲روش رقابتی[5]

برای کشت هم‌زمان، ۱ mL از سوسپانسیون پاتوژن و پروبیوتیک به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C در شرایطی میکروآئروفیل برای ۲۴ ساعت گرما گذاری شد. نمونه کنترل حاوی محیط کشت به‌جای پروبیوتیک است.

۲-۲روش ممانعت[6]

۲mL از سوسپانسیون پروبیوتیک به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C برای ۲۴ ساعت گرما گذاری گردید.سپس چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو شد.۲ mL از سوسپانسیون پاتوژن به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای

[1] De Man Rogosa Sharpe
[2] optical density
[3] phosphate buffered saline
[4] optical density
[5] competition
[6] exclusion

تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C در شرایطی میکروآئروفیل برای ۲۴ ساعت دیگر گرما گذاری شد.چاهک بدون تیمار پروبیوتیک ،نمونه کنترل است.

۳-۲روش جایگزینی[7]

۲mL از سوسپانسیون پاتوژن به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C در شرایط میکروآئروفیل برای ۲۴ ساعت گرما گذاری شد.سپس چاهک‌ها سه بار با PBS شستشو گردبد.۲mL از سوسپانسیون پروبیوتیک به هر چاهک از پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C برای ۲۴ ساعت دیگر گرما گذاری گردید. چاهک بدون تیمار پروبیوتیک ،نمونه کنترل است.

۳-شمارش باکتری‌های بیوفیلم

علاوه بر ارزیابی تشکیل بیوفیلم را روش کریستال ویوله شمارش سلولی نیز انحام گردید.

چاهک‌ها با PBS سه بار شستشو می‌شود.باکتری‌های متصل شده از سطح تراشیده می‌شود و با PBS رقیق می‌گردد. رقت مناسب برای شمارش تعداد باکتری‌های پاتوژن بر محیط‌های بروسلا آگار غنی‌شده تلقیح شد .پلیت‌ها برای ۴۸-۲۴ ساعت در شرایط میکروآئروفیل و ۳۷ °C گرما گذاری شد(9).

نتایج و بحث

توانایی تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *H.pylori* و *B.Bifidum* بر روی سطح پلی استر بررسی شد و نتایج به‌دست‌آمده در جدول زیر آورده شده است.

جدول ۱- نتایج میزان تشکیل بیوفیلم

	$OD_{595\ nm}$
H.pylori	۰/۱۵۷
B.Bifidum	۰/۷۵۴

با توجه به نتایج ،باکتری پروبیوتیک *B.Bifidum* قادر به تشکیل بیوفیلم چهار برابری نسبت به سویه پاتوژن است.

پتانسیل *B.Bifidum* در مهار تشکیل بیوفیلم *H.pylori* با سه روش رقابت ، جایگزینی و ممانعت بررسی گردید و تعداد باکتری‌های *H.pylori* به‌تنهایی و یا در حضور *B.Bifidum* در سه حالت مختلف طبق جدول زیر به‌دست‌آمده است.

[7] displacement

		تشکیل بیوفیلم *H.pylori* ($\times 10^2$cfu/ml)	% مهار تشکیل بیوفیلم *H.pylori*
	H .pylori	۷۸	–
Competition	*H. pylori + B. bifidum*	۹/۹	۴۷/۶
Displacement	*H. pylori + B. bifidum*	۱۹/۷	۳۱/۷
Exclusion	*H. pylori + B. bifidum*	۳۵/۶	۱۸/۰

جدول ۲- نتایج مهار تشکیل بیوفیلم H.pylori

با توجه به جدول بالا،روش رقابتی که در آن هر دو باکتری هم‌زمان فرصت رشد و ایجاد بیوفیلم را دارند،درصد بالاتری از مهار تشکیل بیوفیلم *H.pylori* را دارد.در ادامه به ترتیب روش جایگزینی و سپس ممانعت درصد کمتری از مهار را نشان می‌دهند.

منابع

1. **Attaran, B., Falsafi, T., & Ghorbanmehr, N.** (2017). Effect of biofilm formation by clinical isolates of Helicobacter pylori on the efflux-mediated resistance to commonly used antibiotics. *World journal of gastroenterology*, *23*(7), 1163.
2. **Brown, L. M.** (2000). Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. Epidemiologic reviews, 22(2), 283-297.
3. **Gómez, N. C., Ramiro, J. M., Quecan, B. X., & de Melo Franco, B. D.** (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of Listeria monocytogenes, Salmonella Typhimurium, and Escherichia coli O157: H7 biofilms formation. *Frontiers in microbiology, 7*, 863.
4. **Homan, M., & Orel, R.** (2015). Are probiotics useful in Helicobacter pylori eradication? *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *21*(37), 10644.
5. **Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J. R., & Servin, A. L.** (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, *47*(5), 646-652.
6. **Montecucco, C., & Rappuoli, R.** (2001). Living dangerously: how Helicobacter pylori survives in the human stomach. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(6), 457.
7. **Percival, S. L., & Suleman, L.** (2014). Biofilms and Helicobacter pylori: dissemination and persistence within the environment and host. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*, *5*(3), 122.
8. **Percival, S. L., & Thomas, J. G.** (2009). Transmission of Helicobacter pylori and the role of water and biofilms. *Journal of water and health*, *7*(3), 469-477.
9. **Salas-Jara, M., Sanhueza, E., Retamal-Díaz, A., González, C., Urrutia, H., & García, A.** (2016). Probiotic Lactobacillus fermentum UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and Helicobacter pylori inhibition. *Biofouling, 32*(10), 1245-1257.
10. **Siavoshi, F., Saniee, P., Latifi-Navid, S., Massarrat, S., & Sheykholeslami, A.** (2010). Increase in resistance rates of H. pylori isolates to metronidazole and tetracycline--comparison of three 3-year studies. Arch Iran Med, 13(3), 177-87.
11. **Woo, J., & Ahn, J.** (2013). Probiotic-mediated competition, exclusion and displacement in biofilm formation by food-borne pathogens. *Letters in applied microbiology*, *56*(4), 307-313.

Abstract

Reduction of *Helicobacter pylori* biofilm formation by the probiotic bacterium *Bifidobacterium bifidum*

Yeganeh Farrokhi[1] , Ali Makhdoumi[1], Zeinab Neshati[1], Prastoo Saniee[2]

1- Department of biology, Faculty of science, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran

2- Department of biology, Faculty of science, Shaid Beheshti University, Tehran, Iran

***Helicobacter pylori* is cause of one of the most common infection in the earth where infected almost half of the human population in the world. The bacterium relates with some disease like gastritis, stomach ulcer, gastric cancer, and mucosa-associated lymphoid tissue (malt) lymphoma. Probiotics are live microorganisms that confer health benefit like modulate the effects of digestive diseases when administrated in adequate amounts. Inhibition of the biofilm formation by pathogenic bacteria is one of common mechanism of the probiotics action. In this study the potentials of the common probiotic bacterium i.e. *Bifidobacterium bifidum* for the biofilm formation in comparison to the *H. pylori* were determined by the crystal violet assay. The modulation of the biofilm formation by *H. pylori* in the presence of *Bifidobacterium bifidum* by the three competition, exclusion and displacement mechanisms were also evaluated. The probiotic strain could form biofilm 4 times higher than that of *H. pylori*. The probiotic strain could modulate 47.6%, 31.7% and 18.0% of the biofilm formation by the H. pylori in the competition, displacement and exclusion methods respectively.**

Keywords: *Helicobacter pylori* , *Bifidobacterium bifidum*, Biofilm, Probiotic