



## Effect of Supernatant and Cell Lysate Extracts of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biofilm and Alginate Production by *Pseudomonas Aeruginosa*

Zahra Ghorbani, Parviz Owlia, Mahmoud Amin Marashi, Horieh Sadari

Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

### Article Information

#### Article history:

Received: 2017/10/07

Accepted: 2018/08/01

Available online: 2018/10/11

#### Article Subject:

Antimicrobial Substances

IJMM 2018; 12(3): 189-198

#### Corresponding author:

Parviz Oliya  
Molecular Microbiology  
Research Center (MMRC),  
Faculty of Medicine, Shahed  
University, Tehran, Iran

#### Email:

Powlia @ gmail.com

Use your device to scan  
and read the article online



### Abstract

**Background and Aims:** *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen for humans with multiple virulence factors. The aim of this study was to investigate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* lysates and supernatants on biofilm alginate factors.

**Materials and Methods:** The supernatant and lysate were extracted from the native strain of *Saccharomyces cerevisiae* and turned into dry powder. *P. aeruginosa* PAO1 and M 8821 strains were treated by supernatant and lysate extracts, and then production of biofilm and alginate by PAO1 and M 8821 strains, respectively, were evaluated. Supernatant with 1/2 MIC concentration in both experiments and all concentrations of lysates in biofilm test and the highest concentration of lysates in alginate test were used.

**Results:** Supernatant of *S. cerevisiae* at concentration of 1/2 MIC (0.512 mg / ml) significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the production of alginate by *P. aeruginosa* 8821 M strain, but did not affect on biofilm production by *P. aeruginosa* PAO1 strain. All concentrations and the highest concentration of lysate extract (8.192 mg / ml), respectively, significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the production of biofilms by PAO1 strain and alginate by 8821 M strain.

**Conclusions:** This study showed that *S. cerevisiae* has a good potential for inhibiting bacterial pathogenicity, but more studies are needed.

**Keywords:** *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginate, Biofilm, Inhibition

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

### How to cite this article:

Ghorbani Z, Owlia P, Marashi M A, Sadari H. Effect of Supernatant Extract and Cell Lysate of Probiotic Yeast of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biofilm and Alginate Production in *Pseudomonas Aeruginosa*. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :189-198



## اثر عصاره مایع روی کشت و لیز سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تولید بیوفیلیم و آلژینات توسط باکتری سودوموناس آئروژینوزا

زهرا قربانی، پرویز اولیاء، محمود امین مرعشی، حوریه صادری

مرکز تحقیقات میکروبی شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

### چکیده

### اطلاعات مقاله

**زمینه و هدف:** سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از عوامل بیماری‌زای متعدد، یک پاتوژن فرصت‌طلب برای انسان است. سودوموناس آئروژینوزا ظرفیت‌های چشمگیری به‌منظور مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد. در این مطالعه به بررسی اثر لیزات و مایع روی کشت ساکارومایسس سرویزیه بر تولید بیوفیلیم و آلژینات پرداخته شده است.

**مواد و روش کار:** ابتدا عصاره مایع رویی کشت و نیز محلول لیز سلولی از سویه بومی ساکارومایسس سرویزیه تهیه و با دستگاه روتاری به پودر خشک تبدیل شد. سپس عصاره به کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 و سویه M 8821 اضافه شد و به ترتیب میزان تولید بیوفیلیم با سویه PAO1 و آلژینات از طریق سویه M8821 با روش رنگ‌سنجی و از طریق خواندن OD اندازه‌گیری شد. برای این منظور از مایع رویی کشت با غلظت MIC ۱/۲ در هر دو آزمایش و از تمامی غلظت‌های تهیه‌شده از لیز سلولی در آزمایش تشکیل بیوفیلیم و از بالاترین غلظت آن در آزمایش آلژینات استفاده شد.

**یافته‌ها:** مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه در غلظت MIC ۱/۲ (۵۱۲ mg/ml) به‌صورت معناداری ( $P < 0.05$ ) منجر به کاهش تولید آلژینات سودوموناس آئروژینوزا سویه M 8821 شد؛ اما بر بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 اثری نداشت. همچنین محلول حاصل از لیز سلولی این مخمر در تمامی غلظت‌های تهیه‌شده به‌صورت معناداری ( $P < 0.05$ ) منجر به کاهش میزان تولید بیوفیلیم در سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 شد. از سوی دیگر بالاترین غلظت (۸/۱۹۲۰ mg/ml) آن منجر به کاهش تولید آلژینات از طریق سویه سودوموناس آئروژینوزا M8821 شد.

**نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که ساکارومایسس سرویزیه از پتانسیل مناسبی برای مهار فاکتورهای بیماری‌زای باکتریایی برخوردار است؛ اما به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

**کلمات کلیدی:** سودوموناس آئروژینوزا، ساکارومایسس سرویزیه، آلژینات، بیوفیلیم، مهار

### تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۵

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹

### موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(3): 189-198

### نویسنده مسئول:

### پرویز اولیاء

مرکز تحقیقات میکروبی شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

### پست الکترونیک:

Powlia @ gmail.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

### مقدمه

در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد که این مقاومت ممکن است به‌صورت ذاتی باشد؛ مثل وجود Efflux pump ها و یا به‌صورت اکتسابی مثل کسب ژن بتالاکتاماز یا کسب ژن آنزیم غیرفعال‌کننده آمینوگلیکوزیدازها (۳).

بیوفیلیم یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی است که یک مجموعه از سلول‌های میکروبی ترشح‌کننده آن را در خود محصور کرده است. این ماتریکس عمدتاً از مولکول‌های زیستی، اگزوپلی ساکاریدها، DNA های خارج سلولی و پلی‌پتییدها تشکیل شده

سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی و هوازی است؛ اگرچه این باکتری از طریق جایگزین کردن پذیرنده‌های الکترونی مثل نیترات نیز می‌تواند تنفس کند (۱). از باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مطالعات به‌عنوان میکروارگانیزم مدل استفاده می‌شود. از این جهت که عوامل بیماری‌زای متعدد و همچنین طیف میزبانی وسیعی دارد و با استفاده از یک زیرمجموعه مشترک از فاکتورهای بیماری‌زا یک پاتوژن فرصت‌طلب برای انسان است (۲). سودوموناس آئروژینوزا ظرفیت‌های جالب‌توجهی به مقاومت

سایر گونه‌های مخمري از جمله ساکارومایسس سرویزیه را نیز پیشنهاد داده‌اند (۱۰).

با توجه به این موضوع در این مطالعه پتانسیل مایع رویی کشت و همچنین لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه در کاهش تولید بیوفیلیم و آلزینات از طریق باکتری سودوموناس آئروژینوزا ارزیابی می‌شود.

### مواد و روش‌ها

#### میکروارگانیسیم‌ها و شرایط رشد

از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا M8821 برای تولید آلزینات و از سویه استاندارد سودوموناس آئروژینوزا PAO1 برای تولید بیوفیلیم استفاده شد. این سویه‌ها در محیط BHA Agar (Brain Heart (Merck - Germany) و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شدند.

همچنین در این مطالعه از سویه بومی مخمر ساکارومایسس سرویزیه تأییدشده مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران نیز استفاده شد. ساکارومایسس سرویزیه در محیط PDA (Potato Dextrose Agar (Merck - Germany) و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس کشت داده شد.

#### تهیه مایع رویی کشت

به‌منظور تهیه مایع رویی کشت از روش Krasowska و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۱۱). ابتدا مخمر ساکارومایسس سرویزیه در محیط PDA در شرایط ۳۰ درجه سلسیوس به مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. سپس تک‌کلنی مخمر در ۵ سی سی محیط PDB (Potato Dextrose broth) (ibresco - Iran) تلقیح شد و به مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. در ادامه سوسپانسیون مخمري آماده‌شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB تلقیح و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با چرخش rpm ۱۲۰ انکوبه شد.

سپس به‌منظور جداسازی محلول کشت سلولی از سلول‌های مخمر، سوسپانسیون آماده‌شده به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی، مایع رویی کشت با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. استخراج عصاره کشت با استفاده از اتیل استات (Merck - Germany) به حجم یک‌پنجم مایع رویی کشت جداشده، به مدت سه ساعت انجام گرفت (با تغییر اتیل استات در هر نیم‌ساعت). اتیل استات با دستگاه Rotary evaporator (Hydolph - Germany) جدا شد (۱۱).

است که به‌صورت یک مخلوط قطبی بسیار هیدراته هستند. بیوفیلیم ممکن است در طیف گسترده‌ای از سطوح تشکیل شود و یکی از عوامل مهم مقاوم‌سازی باکتری‌ها به ترکیبات ضد میکروبی و ضد عفونی‌کننده است؛ لذا امروزه بیوفیلیم‌ها به‌عنوان یک موضوع مهم در مدیریت بیماری‌های انسانی شناخته شده‌اند (۵، ۴).

سودوموناس آئروژینوزا حداقل تولید سه پلی‌ساکارید می‌کند که این پلی‌ساکاریدها برای ثبات ساختار بیوفیلیم است. آلزینات یکی از این پلی‌ساکاریدها و یک پلیمر خطی است که متشکل از دی مانورونیک اسید و ال گلوکورونیک اسید است. این پلیمر در ثبات ساختاری و حفاظت از بیوفیلیم و همچنین حفظ آب و مواد غذایی نقش دارد (۶).

در حال حاضر روش‌های گوناگونی برای مقابله با باکتری‌های تولیدکننده بیوفیلیم بررسی و مطالعه شده که یکی از آنها استفاده از عوامل پروبیوتیک است. طبق تعریف بین‌المللی، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسیم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی و مناسب تجویز شوند به نفع سلامت میزبان خود عمل می‌کنند. برای ارزیابی پروبیوتیک‌ها، یک سری عملکردهای آنها باید بررسی شود که می‌توان به توانایی تولید ترکیبات ضد میکروبی، مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی، توانایی تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی، توانایی اتصال به بافت روده و همچنین خواص ایمنی‌بخش آن از قبیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید آمین‌های زیستی اشاره کرد. همچنین داشتن یک سری فعالیت‌های دیگر و نیز نبود فعالیت همولیتیک در مدل‌های حیوانی می‌بایست اثبات شود (۷). مخمر ساکارومایسس از جمله عوامل پروبیوتیک است که متعلق به گروه سلول‌های یوکاریوتی است و از پروبیوتیک‌های باکتریایی که منشأ پروکاریوتی دارند متفاوت است (۸). تفاوت‌هایی که این مخمر با پروبیوتیک‌های باکتریایی دارد شامل ساختارهای فیزیولوژیک متفاوت، اندازه متفاوت (بزرگ بودن مخمرها)، کسب‌نکردن ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. همچنین این مخمر تحت تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم باکتریایی قرار نمی‌گیرد (۹). مخمرهای پروبیوتیک از طریق مکانیسم‌های مختلفی در برابر عفونت‌های باکتریایی از میزبان حفاظت می‌کنند که از آن جمله می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی بدن، حفاظت از مخاط کلون از طریق رسپتورهای حفاظت‌کننده اشاره کرد. تاکنون ساکارومایسس بولاردی تنها مخمري است که در سرتاسر جهان به‌عنوان یک پروبیوتیک برای انسان تأیید شده است و در صنایع به‌صورت تجاری استفاده می‌شود؛ اما برخی از محققین استفاده از

رقیق شده لیز سلولی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و چاهک‌های دیگر حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط BHB بود. سپس برای رقیق‌سازی ۵۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم، به همین ترتیب از چاهک دوم به سوم تا چاهک دهم انجام شد و از چاهک ۱۱ و ۱۲ به‌عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده شد.

برای تلقیح باکتری، از کشت ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHA، تعدادی کلنی در سرم فیزیولوژی حل شد تا سوسپانسیون معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شود. طبق دستورالعمل CLSI سوسپانسیون باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و به هریک از چاهک‌ها به‌جز شاهد منفی از این سوسپانسیون میکروبی ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. در نتیجه حجم نهایی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر شد. سپس برای ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. آزمون تعیین MIC سه بار تکرار شد. در ادامه برای تعیین MBC از هریک از چاهک‌هایی که کدورتی در آن مشاهده نشده، مقداری نمونه از طریق لوب در محیط BHA تلقیح شد و نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. اولین غلظتی که هیچ کلنی باکتریایی در آن مشاهده نشود معادل MBC است.

#### بررسی تأثیر مایع رویی ساکاروماایسس سرویزیه بر

#### تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا سوبه PAO1

ابتدا باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 در محیط کشت BHB به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. برای آزمون در پلیت ۹۶ خانه، ۶ چاهک به‌عنوان شاهد مثبت، ۶ چاهک به‌عنوان آزمایش و ۶ چاهک به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. چاهک‌های شاهد مثبت، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر کشت باکتری PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳، چاهک‌های شاهد منفی، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHB و مایع رویی کشت با غلظت ۱/۲ MIC و چاهک‌های آزمایش حاوی کشت باکتری PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳ و مایع رویی کشت با غلظت ۱/۲ MIC هستند. در ادامه پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۳۷ درجه سلسیوس در داخل انکوبه شد. برای بررسی تولید بیوفیلم، بعد از ۲۴ ساعت محتویات داخل چاهک پلیت خالی شد و چاهک‌ها با آب‌مقطر سه دفعه شست‌وشو داده شدند و به هر چاهک رنگ کریستال ویوله ۰/۲۵٪ (Merck - Germany) اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه چاهک‌ها با آب به‌خوبی شست‌وشو و پس از خشک‌شدن به هریک استیک اسید ۰/۳٪ (Merck - Germany) اضافه شد. سپس جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۲). تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

به عصاره خشک به‌دست‌آمده حجم مناسبی از متانول اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۳۲۷/۶۸ mg/ml شود. از این غلظت به‌عنوان غلظت استاندارد اولیه و ذخیره استفاده شد.

#### تهیه عصاره لیز سلولی

ابتدا تک‌کلنی از مخمر ساکاروماایسس سرویزیه سویه در ۵ میکرولیتر محیط (PDB (Potato Dextrose broth -Ibresco) تلقیح شد و به‌مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس سوسپانسیون مخمری آماده شده در ۲۵۰ میکرولیتر محیط PDB تلقیح و یک شبانه‌روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس با چرخش ۱۲۰ rpm انکوبه شد. در ادامه سوسپانسیون آماده‌شده برای ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی، رسوب به‌دست‌آمده با آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شد و بار دیگر سانتریفیوژ شد. به رسوب باقی‌مانده آب‌مقطر استریل اضافه گشت و لیز سلولی با استفاده از دستگاه سونیکاتور (Qsonica Q125-USA) انجام گرفت (۱۰ puls off/۳۰ puls on). مایع به‌دست‌آمده در دمای ۴ درجه سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی به‌وسیله فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد.

عصاره خشک‌شده با اضافه‌کردن حجم مناسب از آب‌مقطر استریل برای رسیدن به حجم ۱۶۳/۸۴ mg/ml در نمونه نهایی استانداردسازی شد. در ادامه کار از این غلظت تهیه‌شده به‌عنوان ذخیره استفاده شد.

#### تعیین کمترین غلظت ممانعت‌کننده رشد (Minimum

Inhibitory Concentration:MIC) و کمترین غلظت کشنده

(Minimal Bactericidal Concentration:MBC) مایع رویی

و لیز سلولی ساکاروماایسس سرویزیه بر سوبه‌های

#### سودوموناس آئروژینوزا

ابتدا به روش میکرودایلوشن، MIC مایع رویی کشت و لیز سلولی ساکاروماایسس سرویزیه علیه سویه‌ها M8821 و PAO1 در محیط BHB (Brain Heart Broth) (Merck - Germany) تعیین شد.

برای این منظور محلول اولیه عصاره مایع رویی کشت با غلظت ۳۲۷/۶۸ mg/ml به‌میزان ۲۰ برابر با متانول رقیق شد. همچنین محلول اولیه عصاره لیز سلولی با غلظت ۱۶۳/۸۴ mg/ml به میزان ۱۰ برابر با آب رقیق شد و در دو میکروپلیت جداگانه در چاهک اول از نمونه ذخیره ۲۰ برابر رقیق‌شده مایع رویی کشت و در میکروپلیت دیگر در چاهک اول نمونه ذخیره ۱۰ برابر

میکرولیتر از محلول کاربازول (Merck - Germany) به آن اضافه شد و بعد از ورتکس کردن دوباره به مدت ۴ ثانیه، لوله آزمایش به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس میزان جذب نوری اندازه گیری شد (۱۳).

#### بررسی اثر مهارى لیز سلولى مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تولید آلزینات سودوموناس آئروژینوزا سویه M8821

تمامی مراحل دقیقاً مشابه بررسی مربوط به اثرات مایع رویی کشت مایع ساکارومایسس سرویزیه بر تولید آلزینات است؛ اما چاهک‌های شاهد و آزمون بدین شکل تعریف می‌شود: شاهد مثبت حاوی کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا M 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند، شاهد منفی حاوی محیط کشت BHB و آزمون اصلی حاوی کشت باکتری M 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند و محلول عصاره لیز سلولی با غلظت 8821 mg/ml. تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

#### جامعه پژوهش

جامعه آماری بررسی شده، سوسپانسیون باکتری‌های مطالعه شده بود که طی سه بار بررسی جداگانه، با مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه یا عصاره لیز سلولی مجاور شده است؛ بنابراین حجم نمونه برای بررسی هر یک از سؤالات تحقیق، نتیجه سه بار آزمایش دوتایی خواهد بود (۱۴).

#### یافته‌ها

در این پژوهش میزان کمترین غلظت ممانعت‌کننده رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. MIC مایع رویی کشت، برای سویه PAO1 برابر است با ۲/۰۴۸ mg/ml و برای سویه M8821 برابر است با ۱/۰۲۴ mg/ml.

MBC مایع رویی کشت برای هر دو سویه برابر با میزان MIC بود. لازم به توضیح است برای هر دو سویه در چاهک‌های شاهد مثبت کدورت مشاهده شد؛ اما در چاهک‌های شاهد منفی، هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد که این موضوع نشان‌دهنده استریل بودن و عاری بودن عصاره مایع رویی کشت از هرگونه آلودگی است.

در بررسی MIC و در عصاره لیز سلولی برای هر دو سویه سودوموناس آئروژینوزا PAO1 و M8821 در تمامی غلظت‌ها کدورت مشاهده شد. با توجه به این نتایج و افزایش احتمال بروز اثر مهارکنندگی شاید باید میزان بیشتری از عصاره لیز سلولی استفاده شود. در چاهک شاهد مثبت، کدورت مشاهده شد و در

بررسی تأثیر لیزات ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا سویه PAO1 فرایند انجام این آزمایش نیز مانند مراحل توضیح داده شده در بالا است؛ اما چاهک‌های شاهد و آزمایش به این صورت در نظر گرفته شد:

چاهک‌های شاهد مثبت، حاوی کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳؛ چاهک‌های شاهد منفی، حاوی محیط کشت BHB و لیز سلولی با بالاترین غلظت؛ چاهک‌های آزمایش شامل کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳؛ اما غلظت عصاره لیز سلولی در آنها تفاوت دارد که شامل غلظت‌های ۸/۱۹۲ mg/ml و ۴/۰۹۶ mg/ml و ۲/۰۴۸ mg/ml و ۱/۰۲۴ mg/ml و ۰/۵۱۲ mg/ml است. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

#### بررسی اثر مهارى مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل آلزینات سودوموناس آئروژینوزا

برای بررسی اثر مهارى مایع رویی کشت بر تولید آلزینات از غلظت ۱/۲ MIC مایع رویی استفاده شد و برای بررسی اثر مهارى لیز سلولی از بالاترین غلظت آن (۸/۱۹۲ mg/ml) استفاده شد. بدین منظور ۳ ارلن که حاوی ۴ میلی‌لیتر از محیط BHB استریل هستند، به‌عنوان شاهد مثبت، شاهد منفی و آزمایش در نظر گرفته شدند. محتویات ارلن‌ها به شرح زیر است:

شاهد مثبت حاوی باکتری سودوموناس آئروژینوزا M 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند، شاهد منفی حاوی محیط کشت BHB و مایع رویی کشت با غلظت ۰/۵۱۲ mg/ml و آزمایش حاوی کشت سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M با غلظت ۰/۵ مک فارلند و مایع رویی کشت با غلظت ۰/۵۱۲ mg/ml. ابتدا باکتری سودوموناس آئروژینوزا ۸۸۲۱M در محیط BHA کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت از این کشت سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و سوسپانسیون به ارلن‌های تست و شاهد مثبت اضافه شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۰ ساعت (۳۷ درجه سلسیوس) قرار گرفتند. بعد از ۲۰ ساعت میزان آلزینات تولید شده با بررسی جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر و به روش توضیح داده شده در ادامه اندازه گرفته شد. برای سنجش میزان آلزینات مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بورات - اسید سولفوریک در لوله آزمایش ریخته شد و سپس در حالی که در حمام یخ قرار داشت، به‌آرامی مقدار ۷۰ میکرولیتر از نمونه بررسی شده به آن افزوده و به مدت ۴ ثانیه ورتکس شد و بار دیگر در حمام یخ قرار گرفت. در حالی که لوله در حمام یخ قرار داشت، مقدار ۲۰

چاهک شاهد منفی، هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد که این مسئله نشان‌دهنده استریل بودن محلول لیز سلولی است. نتایج حاصل از بررسی تأثیر مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلیم توسط سودوموناس آئروژینوزا سوئیۀ PAO1 در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تشکیل بیوفیلیم از طریق سودوموناس آئروژینوزا PAO1 تیمار شده با مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه

میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر		
شاهد مثبت	آزمایش مایع رویی کشت (غلظت ۱/۲ MIC)	شاهد منفی
۰/۱۶۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۶۵ ± ۰/۰۲۱	۰/۰۶۷۵ ± ۰/۰۰۷

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، در مقایسه چاهک‌های آزمایش با شاهد مثبت، مایع رویی کشت تأثیری بر میزان تولید بیوفیلیم از طریق باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 ندارد و از میزان تولید آن کاسته نشده است و حتی به نظر می‌رسد تا حدودی تشکیل بیوفیلیم تحریک شده است. بررسی آماری نیز نشان داد که بین نتایج این دو گروه تفاوت معناداری وجود ندارد ( $P = ۰/۴۲۲$ ).

نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلیم از طریق سودوموناس آئروژینوزا سوئیۀ PAO1 در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده شد برخلاف مایع رویی کشت، عصاره لیز سلولی بر میزان تشکیل بیوفیلیم از طریق باکتری سودوموناس

نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلیم از طریق سودوموناس آئروژینوزا سوئیۀ PAO1 در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده شد برخلاف مایع رویی کشت، عصاره لیز سلولی بر میزان تشکیل بیوفیلیم از طریق باکتری سودوموناس

نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلیم از طریق سودوموناس آئروژینوزا سوئیۀ PAO1 در جدول شماره ۲ نشان داده شده است. همان‌گونه که مشاهده شد برخلاف مایع رویی کشت، عصاره لیز سلولی بر میزان تشکیل بیوفیلیم از طریق باکتری سودوموناس

جدول ۲. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تشکیل بیوفیلیم از طریق سودوموناس آئروژینوزا PAO1 تیمار شده با عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه

میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر						
شاهد مثبت	۰/۵۱۲ mg/ml	۱/۰۲۴ mg/ml	۲/۰۴۸ mg/ml	۴/۰۹۶ mg/ml	۸/۱۹۲ mg/ml	شاهد منفی
۰/۱۵۳ ± ۰/۰۰۷	۰/۱۲۹ ± ۰/۰۱	۰/۱۲۰ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۰۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۳

جدول ۳. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون میزان تولید آلزینات از طریق سودوموناس آئروژینوزا M8821 تیمار شده با مایع رویی کشت ساکارومایسس سرویزیه

ردیف	نمونه	میانگین جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر
۱	شاهد مثبت	۱/۱۱۸ ± ۰/۰۳
۲	شاهد منفی	۱/۰۰۴ ± ۰/۰۰۰۷
۳	آزمایش	۰/۱۹۲ ± ۰/۰۱
۴	آزمایش پس از صفر کردن با شاهد منفی	۰/۱۸۹ ± ۰/۰۱

عصاره لیز سلولی مخمر ساکارومایسس سرویزیه در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که در مقایسه با نمونه شاهد مثبت، میزان تولید آلزینات از سوی باکتری تحت عصاره لیز سلولی مخمر کاهش یافته است. بررسی آماری نیز نشان داد که اختلاف در میزان تولید آلزینات در نمونه‌های شاهد مثبت و آزمایش از نظر آماری معنادار است ( $P < 0/05$ ).

نتایج نشان داد که در مقایسه با نمونه شاهد مثبت، میزان تولید آلزینات از طریق باکتری تحت تأثیر مایع رویی کشت مخمر کاهش یافته است. بررسی آماری نیز نشان داد که اختلاف در میزان تولید آلزینات در نمونه‌های شاهد مثبت و آزمایش از نظر آماری معنادار است ( $P < 0/05$ ).

نتایج حاصل از بررسی جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تولید آلزینات از طریق سودوموناس آئروژینوزا M8821 تیمار شده با

جدول ۴. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون میزان تولید آلزینات از طریق سودوموناس آئروژینوزا M8821 تیمار شده با عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه

ردیف	نمونه	میانگین جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر
۱	شاهد مثبت	$1/118 \pm 0/03$
۲	شاهد منفی	$1/244 \pm 0/007$
۳	آزمایش	$1/738 \pm 0/006$
۴	آزمایش پس از صفر کردن با شاهد منفی	$0/4930 \pm 0/006$

سرویزیه هستند (۱۷). عملکرد عوامل ضد میکروبی برای درمان عفونت‌ها، فقط به اثرات باکتری‌سیدال و باکتریواستاتیک آنها وابسته نیست؛ بلکه به توانایی آنها در مهار تولید فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری‌ها نیز بستگی دارد (۱۸). در این مطالعه، اثر عصاره‌های مایع رویی کشت و لیفات مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تولید بیوفیلیم و آلزینات در سودوموناس آئروژینوزا بررسی شد. پژوهش در زمینه تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای ویروانس، به‌تازگی شروع شده و فقط چند مقاله در این زمینه از سوی محققان خارج از کشور منتشر شده که در بیشتر آنها نیز اثر لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک بررسی شده است. به‌عنوان مثال Alexandre و همکاران (۲۰۱۴)، در یک مطالعه پژوهشی از ۸۷ سویه لاکتوباسیل، برای کنترل فاکتورهای ویروانس سودوموناس آئروژینوزا PAOI به روش رنگ‌سنجی استفاده کردند. نتایج نشان داد که از میان سویه‌های بررسی شده ۵ سویه به‌طور چشمگیری باعث کاهش تولید بیوفیلیم شده‌اند (۱۲). نتایج حاصل از این مطالعه، نشان‌دهنده تأثیر مطلوب پروبیوتیک‌ها بر مهار بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا PAOI است که این موضوع با نتایج حاصل از تأثیر عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه بر تولید بیوفیلیم در مطالعه حاضر مطابقت دارد. Valdéz و همکاران (۲۰۰۵)، در یک مطالعه پژوهشی تداخل لاکتوباسیلوس پلانتروم را با سودوموناس آئروژینوزا در شرایط *In vitro* و *In vivo* بررسی کردند. آنها در این مطالعه اثر این پروبیوتیک بر میزان تولید بیوفیلیم از طریق سودوموناس را به روش رنگ‌سنجی بررسی کردند

#### بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های بیمارستانی از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشورهای توسعه‌یافته و در حال توسعه محسوب می‌شود. سودوموناس آئروژینوزا سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی است. با مصرف گسترده آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های سودوموناس آئروژینوزای مقاوم به چند دارو در سراسر جهان به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است. بالارفتن روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشکلات زیادی برای بیماران ایجاد کرده که سبب دشواری‌های زیادی در درمان و افزایش مرگ‌ومیر شده است (۱۵).

استفاده از ترکیبات طبیعی تولید شده از طریق سایر میکروارگانیسم‌ها مثل پروبیوتیک‌ها برای پیشگیری و مهار عفونت‌ها، می‌تواند به‌عنوان راه‌حلی برای این مشکل باشد (۱۱). مخمرهای پروبیوتیک از طریق مکانیسم‌های مختلفی در برابر عفونت‌های باکتریایی از میزبان حفاظت می‌کنند (۱۰). یکی از نقش‌های مهم مخمرهای پروبیوتیک، خواص آنتاگونیستی آنها در برابر سایر میکروارگانیسم‌ها است. ساکارومایسس سرویزیه از جمله مخمرهایی است که خواص پروبیوتیکی دارد (۱۶). قابلیت ضدباکتریایی ساکارومایسس سرویزیه ممکن است به‌علت تولید پروتئاز خارج سلولی، ترشح پروتئین‌های مهارکننده، تحریک ایمنوگلوبولین A، جذب و حذف سموم ترش‌حی، سموم قارچی، سولفور دی‌اکسید و غیره باشد. مواد غذایی مانند شیر، غذاهای غنی شده، میوه‌ها و غیره منبع مهمی از پروبیوتیک ساکارومایسس

دریافت‌کننده پروبیوتیک داده شد. نتایج نشان داد که وقوع کلونیزاسیون تنفسی یا عفونت با سودوموناس آئروژینوزا به‌طور معناداری در گروه پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل به تأخیر افتاده است. وقوع پنومونی در بیماران دریافت‌کننده پروبیوتیک ۹/۲٪ کمتر از گروه کنترل بود. هرچند میزان عفونت به‌طور قابل توجهی کاهش نیافته اما نتایج نشان داد که نبود پروبیوتیک باعث افزایش خطر کلونیزاسیون سودوموناس آئروژینوزا در دستگاه تنفسی می‌شود (۲۴). همچنین Sharma و همکاران (۲۰۱۴) از سوسپانسیون‌های پروبیوتیک محصولات تجاری شده استفاده کردند و فعالیت مهاری آنها را علیه باکتری سودوموناس آئروژینوزا با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که در ۷۱/۸۷٪ از موارد میزان قطر هاله عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌ها با سویه‌های پروبیوتیک افزایش یافته است. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌های پروبیوتیک می‌توانند علی‌رغم افزایش مقاومت دارویی سودوموناس آئروژینوزا بر آن غلبه داشته باشند (۲۵). هرچند روش‌های به‌کاررفته در مطالعه حاضر و این مطالعات متفاوت بودند، ولی در زمینه فعالیت ضد میکروبی مواد ترشح‌شده از طریق سویه‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا، نتایج این مطالعات با بخش مهارکنندگی رشد مایع رویی کشت مطالعه حاضر مطابقت دارند. در مطالعه حاضر، عصاره لیز سلولی مخمر محروم از اثر کشندگی و مهارکنندگی رشد بر سودوموناس آئروژینوزا بود که شاید این امر به دلیل تخریب احتمالی برخی متابولیت‌های موجود در لیز سلولی طی فرایند خشک‌کردن بوده باشد؛ اما اثر بیشتری در ممانعت از تولید بیوفیلیم نسبت به مایع رویی کشت نشان داد.

اگرچه تا به حال مطالعه‌ای درباره اثر مخمرهای پروبیوتیک بر بیان عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا انجام نشده است اما مطالعات انجام‌شده همگی تأثیر مثبت کشت هم‌زمان و مایع رویی کشت پروبیوتیک‌ها را بر کاهش بیان عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا نشان می‌دهند که با نتایج حاصل از تأثیر عصاره لیز سلولی مطالعه حاضر مطابقت دارد.

مطالعه حاضر، نخستین مطالعه‌ای است که تأثیر مایع رویی کشت و عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه را بر تشکیل بیوفیلیم و آلزینات سویه‌های PAO1 و M8821 سودوموناس آئروژینوزا بررسی کرده است. همچنین لازم به توضیح است که در هیچ مطالعه‌ای روی آلزینات به‌صورت فنوتیپی کار نشده و روش رنگ‌سنجی استفاده‌شده در این مطالعه، نخستین بار از سوی دکتر اولیاء ابداع شده است.

که نشان‌دهنده مهار تولید بیوفیلیم بود. این نتایج با گزارش ما درباره تأثیرگذاری عصاره لیز سلولی ساکارومایسس سرویزیه مشابه است (۱۹).

Joshi و همکاران (۲۰۱۴) در یک مطالعه پژوهشی اثر لاکتوز سویه وحشی و سویه نوترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم NC8 را بر عوامل بیماری‌زای ۴ سویه سودوموناس آئروژینوزا، به‌صورت کشت هم‌زمان بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که لاکتوباسیلوس پلانتروم نوترکیب و تولیدات آن به‌صورت چشمگیری باعث کاهش تولید فاکتورهای بیماری‌زای باکتری می‌شود (۲۰). هرچند روش به‌کاررفته در مطالعه حاضر با روش آنها متفاوت است، ولی در زمینه کاهش فاکتورهای بیماری‌زا از طریق سویه‌های پروبیوتیک در برابر باکتری پاتوژن نتایجی به دست آمده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های ما در زمینه تأثیر عصاره لیز سلولی بر کاهش تولید بیوفیلیم و تأثیر مایع رویی کشت و لیز سلولی بر تولید آلزینات مشابهت دارد. Rybalchenko و همکاران (۲۰۱۵) در یک مطالعه پژوهشی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تأثیر کشت هم‌زمان لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر تشکیل بیوفیلیم تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا را مطالعه کردند. نتایج حاکی از تخریب و کاهش تراکم سلول‌ها در بیوفیلیم بود (۲۱). تنها مطالعه یافت‌شده در زمینه تأثیر ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلیم، مطالعه‌ای بود که Walencka و همکاران (۲۰۰۸) انجام دادند. در این تحقیق از مانوپورتین استخراج‌شده از دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه برای مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس استفاده شده است. نتایج آنها نشان‌دهنده کاهش تولید بیوفیلیم و همچنین تسهیل جداشدن سلول‌ها از بیوفیلیم بالغ بود (۲۲). این نتایج با مطالعه ما در بخش اثرگذاری عصاره لیز سلولی مخمر در کاهش تولید بیوفیلیم مطابقت دارد. Srinivas و همکاران (۲۰۱۷)، فعالیت آنتاگونیستی مخمر ساکارومایسس سرویزیه OBS2 را در برابر چند باکتری بیماری‌زا با آزمون انتشار با چاهک، بررسی کردند. در این مطالعه هاله رشدنیافتگی ناشی از مایع رویی کشت مخمر اندازه‌گیری شد که نتایج، نشان‌دهنده اثر ضد میکروبی این سویه علیه عوامل باکتریایی بود (۲۳). Christiane و همکاران (۲۰۰۸)، مطالعه‌ای را در یک واحد مراقبت‌های ویژه در فرانسه انجام دادند. در تحقیق آنها دو گروه از بیماران در نظر گرفته شدند که یک گروه از پروبیوتیک‌ها و گروه دوم از دارونما استفاده می‌کردند. سه روز پس از بستری‌شدن، با یک لوله انتقال موادغذایی از طریق بینی، ۱۰۹ واحد کلنی لاکتوباسیلوس کازئی به گروه



باکتریایی بیماری‌زا برخوردار هستند؛ اما برای تأیید نهایی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم نیاز به آزمایش‌هایی متعدد در شرایط *In vivo* و *In vitro* است.

### سیاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که آنها را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند، تشکر می‌کنند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، عصاره مایع رویی کشت به‌صورت معناداری باعث مهار تولید آلزینات در باکتری *Sudomonas aeruginosa* M8821 شده اما تولید بیوفیلم در باکتری *Sudomonas aeruginosa* سویه PAO1 نه‌تنها کاهش نیافته، بلکه تا حدودی افزایش نیز داشته است؛ درحالی‌که عصاره لیز سلولی این مخمر بر هر دو فاکتور، اثر کاهنده مطلوبی داشته است. با تکیه بر اطلاعاتی که از این تحقیق به دست آمده است، می‌توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک‌هایی مثل مخمر ساکارومایسس سرویزیه از پتانسیل لازم برای استفاده علیه عوامل

## References

1. Michalska M, Wolf P. Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol.* 2015;6:963. <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963> PMID:26441897 PMCID:PMC4584936
2. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model. *Cell.* 1999;96(1):47-56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80958-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7) PMID:9989496
3. Mesaros N, Nordmann P, Plešiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(6):560-78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x> PMID:17266725
4. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):881-90. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063> PMID:12194761 PMCID:PMC2732559
5. Sousa AM, Pereira MO. Pseudomonas aeruginosa Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. *Pathogens.* 2014;3(3):680-703. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030680> PMID:25438018 PMCID:PMC4243435
6. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P and El Jaziri M. The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015;2015:759348. <https://doi.org/10.1155/2015/759348> PMID:25866808 PMCID:PMC4383298
7. Belicová A, Mikulášová M, Dušínský R. Probiotic Potential and Safety Properties of Lactobacillus plantarum from Slovak Bryndza Cheese. *Biomed Res Int.* 2013;2013:760298. <https://doi.org/10.1155/2013/760298> PMID:24093103 PMCID:PMC3777194
8. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics – Saccharomyces boulardii. *Aliment Pharmacol.* 2007;26(6):767-78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x> PMID:17767461
9. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients. *World J Gastroenterol.* 2010;16(18):2202-22. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202> PMID:20458757 PMCID:PMC2868213
10. Tiago FD, Martins FD, Souza EL, Pimenta PF, Araújo HR, Castro ID, et al. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics. *J Med Microbiol.* 2012;61(9):1194-207. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.042283-0> PMID:22580913
11. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Lukaszewicz M & Dziadkowiec D. The antagonistic effect of saccharomyces boulardii on Candida albicans filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Res.* 2009;9(8):1312-21. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00559.x> PMID:19732158
12. Alexandre Y, Le Berre R, Barbier G, Le Blay G. Screening of Lactobacillus spp. for the prevention of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. *BMC Microbiol.* 2014;14(107):1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-107>
13. Owlia P, Rasooli I, Saderi H, Aliahmadi M. Retardation of biofilm formation with reduced productivity of alginate as a result of Pseudomonas aeruginosa exposure to Matricaria chamomilla essential oil. *Phcog Mag.* 2007;3(10):83-9.
14. 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.

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.014>  
PMID: [18328583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18328583/)

15. Rajabpour M, Arabestani M R, Yousefi mashof R, Alikhani M Y. MIC determination of *Pseudomonas aeruginosa* strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). *Iran J Med Microbiol.* 2013;7(3):18-25. <http://ijmm.ir/article-1-212-en.html>

16. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. *Front Microbiol.* 2012;3:421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421>  
PMID: [23267352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23267352/) PMCID: [PMC3525881](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC3525881/)

17. Fakruddin Md, Nur Hossain Md, Morshed Ahmed M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST210260, a potential probiotic. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17:64. <https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12906-017-1591-9>  
PMID: [28109187](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28109187/) PMCID: [PMC5251302](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5251302/)

18. Rohinishree YS, Negi PS. Effect of licorice extract on cell viability, biofilm formation and exotoxin production by *Staphylococcus aureus*. *J Food Sci Technol.* 2016;53(2):1092-100. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-2131-6> PMID: [27162389](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27162389/) PMCID: [PMC4837708](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4837708/)

19. Valdéz JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdígón G: Interference of *Lactobacillus plantarum* with *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(6):472-9. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01142.x>  
PMID: [15882197](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15882197/)

20. Joshi S, Kaur A, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Lactonase-expressing *Lactobacillus plantarum* NC8 attenuates the virulence factors of multiple drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in co-culturing environment. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014;30(8):2241-9. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1645-9>  
PMID: [24671300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24671300/)

21. Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, Markov AG, Amasheh S. Inhibitory effects of *Lactobacillus fermentum* on microbial growth and biofilm formation. *Arch Microbiol.* 2015;197(8):1027-32. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1140-1>  
PMID: [26267163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26267163/)

22. Walencka E, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. *Folia Microbiol (Praha).* 2008;53(1):61-6. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0009-y>  
PMID: [18481220](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18481220/)

23. Srinivas B, Rani GS, Kumar BK, Chandrasekhar B, Krishna KV, Devi TA, et al. Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of *Saccharomyces cerevisiae* strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm.

AMB Express. 2017;7(1):2. <https://doi.org/10.1186/s13568-016-0301-1>  
PMID: [28050843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28050843/) PMCID: [PMC5209330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC5209330/)

24. Forestier C, Dominique C, Guelon D, Cluytens V, T Gillart, Sirot J, De Champs C. Oral probiotic and prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. *Critical Care.* 2008;12(3):1-10. <https://doi.org/10.1186/cc6907>  
PMID: [18489775](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18489775/) PMCID: [PMC2481460](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC2481460/)

25. Sharma J, Chauhan DS. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by antibiotics and probiotics combinations- In vitro study. *Euro J Exp Bio.* 2014;4(6):10-4.