Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

دانشور
پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم–شماره ۱۳۳
اسفند ۱۳۹۶

بررسی اثر *ساکارومایسس سرویزیه* بر حرکت، الاستاز و آلکالین پروتئاز در *سودوموناس آئروجینوزا*

نویسندگان: زهرا دهقان‌زاده[۱]، پرویز اولیاء[۲*]، سید محمود امین مرعشی[۳]، حوریه صادری[۲]، مریم مکاری[۱]

۱. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲. مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۳. گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران.

*نویسنده مسئول: پرویز اولیا **E-mail: powlia@gmail.com**

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱

چکیده

مقدمه و هدف: براساس تعریف ارائه شده توسط WHO/FAO:"پروبیوتیک ها میکروارگانیسم‌های زنده ایی هستند که استفاده از میزان کافی آن اثرات سودمندی برای میزبان به ارمغان می‌آورد. *ساکارومایسس سرویزیه* اولین مخمر غیرپاتوژنی است که به عنوان پروبیوتیک برای انسان شناخته شد. *سودوموناس آئروجینوزا* یکی از پاتوژنهای مهم فرصت‌طلب است که مقاومت قابل توجهی به طیف وسیعی از مواد آنتی باکتریال دارد. این مطالعه اثر *ساکارومایسس سرویزیه* را بر تولید فاکتورهای بیماری‌زای *سودوموناس آئروجینوزا* (الاستاز، آلکالین پروتئاز و حرکت) ارزیابی می‌کند.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از سویه‌ی بومی *ساکارومایسس سرویزیه* S_3 که خاصیت پروبیوتیکی آن در مطالعات قبلی به اثبات رسیده و از باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* سویه‌ی PAO1 استفاده گردید. به منظور بررسی اثر (سوپرناتانت و لیزات) مخمر بر*سودوموناس آئروجینوزا* از آزمایش‌های فنوتیپی (آزمایش تست الاستاز-آلکالین پروتئاز-حرکت) مناسب استفاده گردید.

نتایج: عصاره *ساکارومایسس سرویزیه* (سوپرناتانت-لیزات) تخلیص شده از سویه بومی، دارای اثرات مهارکنندگی علیه *سودوموناس آئروژینوزا* است. سه فاکتور دخیل در بیماری‌زایی *سودوموناس آئروجینوزا* که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت (الاستاز- حرکت-آلکالین پروتئاز) همگی در بررسی‌های فنوتیپی تا حد قابل قبولی کنترل و مهار گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، *ساکارومایسس سرویزیه* دارای اثرات کاهنده علیه فاکتورهای بیماری‌زای *سودوموناس آئروجینوزا* است که با تحقیقات گسترده‌تر در این زمینه می‌توان به عنوان یک روش نوین و امیدبخش در درمان عفونت‌های حاصل از این باکتری مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروجینوزا، ساکارومایسس سرویزیه، الاستاز، حرکت، آلکالین پروتئاز.*

Archive of SID
www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

مقدمه

مطالعه پیرامون پروبیوتیکها و پره بیوتیکها در دنیای امروز افزایش و در حال رشد است. پرداختن به این زمینه به دلیل افزایش مطالعات در علم میکروبیوم انسانی مهم است. پروبیوتیکها و پره بیوتیک‌ها چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته است؛ اما امروزه استفاده از آن‌ها به سمت اهداف و دست آوردهای خاص و منحصربه‌فرد در حال ظهور است(۱). در شرایط کنونی که بیماری‌های عفونی ناشی از باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به صورت غیرقابل‌کنترلی در حال تهدید سلامت بشراست. این بیماری‌ها به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشد (۲). از زمانی که افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها درمان با این مواد را با مشکل مواجه کرده است، نیاز به ابزارها و مواد نوین به منظور مبارزه با این عوامل بیش از پیش احساس شد (۳). در این بین سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا است (٤). استفاده از پروبیوتیک‌ها یکی از راه‌های نویدبخش است که به‌تازگی کشف و مورد استفاده قرار گرفته است (۳). براساس تعریف ارائه شده توسط سازمان غذا و دارو و سازمان بهداشت جهانی (WHO/FAO);"پروبیوتیک‌ها: میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که استفاده کافی از آن‌ها اثرات سودمندی را برای میزبان دارد"(۵). پروبیوتیکها با مکانیسم‌های متفاوتی عمل می‌کنند ازجمله:۱-اتصال به موکوز سلول‌های روده و اپیتلیوم توسط پروبیوتیک‌ها که مهم‌ترین معیار انتخاب پروبیوتیک‌ها است. ۲- پروبیوتیک‌های ترکیبی و اتصال به پاتوژن‌ها و تجمعات آن‌ها.۳-تولید مواد و فرآوردهای ضدمیکروبی (اسیدهای ارگانیک، باکتریوسین، هیدروژن پراکسید، کربن دی اکسید، موادی با وزن مولکولی پایین و...) .٤-تأثیرات ایمونولوژیکی باکتری‌های پروبیوتیک (میکروبیوم روده-مقابله باپاتوژن به وسیله سیستم ایمنی- تأثیرات مثبت بر پاسخ‌های ایمنی- سلول‌های اپیتلیال- سلولهای دندرتیک - سلولهای T و...) و ۵- تغییرات میکرواکولوژی در روده انسان بر میزبان، تأثیر می‌گذارند(٦).

ساکارومایسس سرویزیه مخمر غیرپاتوژنی است که اولین بار در هند و چین جدا شد و در درمان اسهال (اسهال ناشی از انتی بیوتیک و...) مورد استفاده قرار گرفت (۷). مکانیسمهای فراوانی برای اثر حفاظتی آن ارائه شده است که نشان‌دهنده‌ی تنظیم سیستم ایمنی توسط این مخمر است (۷). استفاده از ساکارومایسس سرویزیه تاکنون اثرات قابل توجهی در کاهش توکسین A و B کلستریدیوم دیفیسیل- ممانعت از عملکرد توکسین ویبریوکلرا-تنظیم مسیرهای القاشده توسط انتروپاتوژنیک و انتروهموراژیک اشریشای کلی و تحریک فعالیت آنزیماتیک را نشان داده است (۷).

سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی و فرصت‌طلبی است که به خصوص در افراد با نقص در سیستم ایمنی ایجاد عفونت می‌کند (۸). بیماری‌زایی در این باکتری با تکیه بر تولید شمار متعددی از فاکتورهای ویرولانس (خارج سلولی و دورن سلولی) و مقاومت ذاتی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکهاست (۳). سودوموناس آئروجینوزا توانایی ترشح دست‌کم ۷ نوع پروتئاز خارج سلولی را دارد که شامل: سودولیزین (LAS B –الاستاز)، آئروژینولیزین (آلکالین پروتئاز)، استافیلولیزین (*استافیلوکوکوس اندوپپتیداز*–Las A پروتئاز)، لیزیل اندوپپتیداز (پروتئاز چهار–Prpl)، PASP (پروتئاز کوچک)، LEP A(پروتئاز بزرگ) و آمینوپپتیداز است (۹).

الاستاز توانایی تخریب طیف وسیعی از پروتئین‌های میزبان را دارد. این پروتئین‌ها می‌توانند در دیواره رگ‌ها- ریه و... وجود داشته باشد که شامل: الاستین- کلاژن-پروتئوگلیکان- ایمونوگلوبین و... می‌باشند.(۹)

آئروژینولیزین یا آلکالین پروتئاز یک متالوپروتئاز وابسته به روی است. در طول عفونت‌های حاد توسط *سودوموناس آئروجینوزا* در تهاجمات بافتی و عفونت‌های سیستمیک و هم‌چنین در عفونت زخم نقش مؤثری دارد(۱۰). آلکالین پروتئاز فعالیت سیستم

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

کمپلمان را از مسیر لکتین و هم‌چنین کلاسیک، مهار و بلاک می‌کند. این امر از طریق شکستن مولکول C2 در این مسیرها است که در نهایت مانع از بین بردن این باکتری به طریق فاگوسیتوز می‌گردد (۱۱).

الکالین پروتئاز و الاستاز مانع از عملکرد طبیعی نوتروفیل ها می‌شود. به دنبال آن به باکتری اجازه‌ی فرار از سیستم دفاعی میزبان و فاگوسیتوز داده نمی‌شود. البته یک قاعده کلی نشان‌دهنده‌ی تأثیر این آنزیم‌ها بر عملکرد کلیه‌ی گلبول‌های سفید است که فعالیت فاگوسیتوزی را علیه *سودوموناس آئروجینوزا* را کاهش می‌دهد(۱۲).

حرکت باکتری‌ها نقش به سزایی در کلونیزه شدن باکتری در سطوح مختلف و متعاقب آن تشکیل جوامع مقاوم باکتریایی موسوم به بیوفیلم را دارد (۱۳). مشابه با سایر باکتری‌های متحرک، تحرک در *سودوموناس آئروجینوزا* به عنوان فاکتور مهمی در جنبش و حرکت در سطوح ویسکوز (مانند اپیتلیال) و سایر سطوح میزبان است (۱٤). یکی از اصلی‌ترین توانمندی‌های *سودوموناس آئروجینوزا* قابلیت انتشار سریع از محل آلودگی و در نهایت تهاجم و انتشار سیستماتیک است (۱۵). ازآنجایی‌که *سودوموناس آئروجینوزا* مهم‌ترین عامل عفونت بیمارستانی در کشور است و این باکتری نسبت به طیف وسیعی از مواد آنتی میکروبیال مقاوم است؛ لذا بر آن شدیم که پژوهشی در رابطه با اثر سویه پروبیوتیک بومی بر تولید فاکتورهای مذکور این باکتری انجام گیرد، امیداست نتایج مطلوبی حاصل آید که منجر به افزایش تحقیقات در این زمینه گردد.

مواد و روش‌ها

الف-سویه های میکروبی

۱-سویه‌ی باکتریایی استفاده شده در این مطالعه، سویه‌ی استاندارد باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* PAO1 است. این باکتری در محیط BHI medium (Merck, KGaA, Germany) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد کشت داده شد.

۲-سویه‌ی پروبیوتیکی دخیل در این مطالعه، سویه بومی جداسازی شده توسط مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی دانشگاه شاهد بود. خاصیت پروبیوتیکی توسط تستهای بیوشیمیایی مورد تأیید قرار گرفته است. این مخمر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در محیط PDB medium (Ibresco,iran) کشت داده شد. در این مطالعه، از سوپرناتانت و لیزات این مخمر به منظور ارزیابی استفاده گردید.

ب-آماده سازی عصاره لیزات و سوپرناتانت *ساکارومایسس سرویزیه*

به منظور تهیه‌ی عصاره لیزات و سوپرناتانت *ساکارومایسس سرویزیه*، در گام اول مخمر در محیط کشت PDA آگار کشت یافت (18h/300c).

پس از آن کلنی های رشد یافته در محیط فوق را به حجمی معادل با 20cc منتقل و انکوبه کردیم (30^0C/16h/170g). در ادامه، به منظور آغاز فرآیند عصاره گیری، این حجم را به حجم یک لیتری از این محیط تلقیح و تحت شرایط مذکور قراردادیم (30^0C/16-18h/120g). سپس، جذب نوری در طول‌موج ٦٢٠ نانومتر قرائت شد (که معادل با ۱۰.۵ بود). با توجه به منحنی رشد رسم شده ساکارومایسس سرویزیه، مخمر وارد فاز لگاریتمی خود گشته و برای آغاز فرایند مناسب بود.

حجم یک لیتری از مخمر را برای جمع‌آوری لیزات و سوپرناتانت سانتریفوژ نمودیم (3000g/10min/270g).

به منظور تهیه سوپرناتانت، مایع رویی حاصل در این مرحله را از فیلترهای 0.22µ عبور داده و با نسبت ۱ به ۵ اتیل استات وارد دکانتور شد. در این مرحله، عصاره مخمر به دلیل وجود ترکیبات اسید چرب در اتیل استات (فاز آلی) حل گشته و در بازه‌های زمانی ۳۰ دقیقه ایی به مدت سه ساعت سوپرناتانت را جمع‌آوری گردید. برای دست‌یابی به عصاره‌ی خشک سوپرناتانت، مایع حاصل را وارد روتاری شد. در نهایت برای تهیه‌ی استوکی با غلظت 327.84 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر میزان کافی (برحسب گرم ماده خشک) متانول را به عنوان حلال اضافه نمودیم (١٦).

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

هم‌چنین برای فراهم آوری عصاره لیزات، پس از سانتریفوژ اولیه رسوب های موجود را جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. در ادامه، مجدداً حجم کافی آب مقطر را اضافه کرده و به منظور لیز سلولی محتویات را در سونیکاتور (۹۰٪–18min) قرار گرفت. مجدداً محتویات سانتریفوژ شده (40^0C/15000g/15min) و از فیلترهای 0.45µ عبور یافت. برای دست‌یابی به عصاره خشک حجم فیلتر شده به روتاری انتقال یافت. در پایان، برای تهیه استوکی با غلظت ۱۶۳.۲٤ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متناسب با گرم خشک عصاره، آب مقطر استریل را به عنوان حلال اضافه کردیم.

ج- بررسی خواص آنتی باکتریال عصاره لیزات و سوپرناتانت مخمر

به منظور بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های مخمر از روش میکرو دایلوشن و مطابق با دستورالعمل CLSI استفاده شد. با استناد بر این روش، کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره لیزات و سوپرناتانت تعیین شد. برای تهیه سوپانسیون باکتریایی از کلنی ۲٤ ساعته باکتری در محیط BHI agar برداشته و غلظتی معادل نیم مک فارلند تنظیم گردید. محیط استفاده شده در این روش BHI agar بوده، هم‌چنین مقادیر رقیق شده باکتری به نسبت ۱ به ۲۰ به همراه استوکهای تهیه شده لیزات و سوپرناتانت (به طور جداگانه) به چاهک‌ها تلقیح شد و تا چاهک ۱۰ این عمل ادامه یافت. شایان ذکر است، چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیتها در ($20h/37^0$C) انکوبه گردید و روز بعد نتایج قرائت شد. کلیه آزمایش‌های برای اطمینان از صحت سه بار تکرار گردید (۱۷).

د- بررسی اثر عصاره لیزات و سوپرناتانت *ساکارومایسس سرویزیه بر سودوموناس آئروجینوزا*

به منظور بررسی تأثیر عصاره لیزات و سوپرناتانت مخمر بر باکتری مورد مطالعه از روش‌های فنوتیپی مناسب بهره بردیم که در ادامه بیان شده است.

روش بررسی حرکت

برای ارزیابی اثر عصاره لیزات و سوپرناتانت بر حرکت باکتری، از کشت 24h باکتری در محیط BHI agar استفاده گردید. هم‌چنین، به منظور تهیه‌ی محیط کشت مناسب برای حرکت Swimming باکتری از ترکیب (۱٪ معادل ۱ گرم تریپتون ((sigma,Aldrich))،۰.۵٪ معادل ۰.۵ گرم NACL) (Merck,Germany)،۰.۳٪ معادل ۰.۳ گرم پودر آگار ((BacteriologicalAgar,Ibresco,iran)) استفاده شد. پس از استریل کردن، متناسب با حجم محیط از استوک لیزات و سوپرناتانت به صورت مجزا به محیط مذکور اضافه گردید. عمق محیط کشت 0.5cm در نظر گرفته شد. سوپانسیون معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. با استفاده از خلال‌دندان استریل که به اندازه‌ی ۱ سانتی‌متر در سوسپانسیون فرو برده شد و در مرکز پلیت تلقیح می گردید. پلیت‌ها ($16h/37^0$C) انکوبه گردید. پس از آن قطر کدورت حاصل از حرکت باکتری اندازه‌گیری شد(۱۸).

روش بررسی آلکالین پروتئاز

برای سنجش میزان تأثیر سوپرناتانت و لیزات مخمر بر این آنزیم، از کشت18-24h باکتری در محیط BHI agar استفاده شد. همچنین، محیط کشت مناسب برای فعالیت آنزیم آلکالین پروتئاز متشکل از:

15ml Skim milk(Merck,Germany) و 85ml NutrientAgar (Merck, Germany) بود. پس از رسیدن به دمای 42^0C و افزودن مقادیر مناسب، متناسب با حجم محیط، استوک لیزات و سوپرناتانت (مجزا) در پتری دیش ها پخش گردید. برای تلقیح باکتری در محیط، سوپانسیونی معادل نیم مک فارلند تهیه گردید. سوآپ آغشته شده به سوسپانسیون که مقادیر اضافی آن خارج شده بود، در مرکز پلیت تماس داده شد. پس از گذشت 24-48h در دمای 37^0C انکوباسیون، قطر هاله ی شفاف ناشی از فعالیت پروتئازی باکتری اندازه‌گیری شد (۱۹).

روش بررسی الاستاز

محیط کشت مورد استفاده به منظور سنجش فنوتیپی الاستاز، شامل: 5٪ پپتون (Sigma-Aldrich) و ۰.۲۵٪ TSB (Merck, Germany) بود. باکتری در این محیط، کشت داده شد. زمانی که جذب نوری در طول‌موج 540nm به

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

عدد ۰.۵ رسید مقدار 2ml از باکتری به 18ml محیط اولیه (حاوی مقادیر مناسب لیزات و سوپرناتانت به صورت مجزا) اضافه و انکوبه شد ($16h/37^0C$). محتویات پس از سانتریفوژ، از فیلترهای 0.45µ عبور داده شد. میزان 10mg الاستین کنگو رد (Sigma-Alderich) و 2ml ریکشن بافر (1mM cacl2,Tris Maleate Buffer (Trizma,Sigma)),pH=7) به 1ml از سوپرناتانت فیلتر شده افزودیم. لوله ها به صورت افقی به مدت 2h در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید. سپس 2ml بافر سدیم فسفات ۰.۷ مولار با pH=6 اضافه کرده و در حمام یخ قرار داده شد. مجدداً از فیلتر 0.45µ عبور داده و در طول‌موج 495nm نتایج قرائت گردید (۲۰).

آنالیز آماری

نتایج تست فنوتیپی، توسط تست ANOVA توسط برنامه Sigma Plot آنالیز شد. در آزمون‌های آماری مذکور، مقادیرX کمتر از۰.۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج آنتی بیوگرام *سودوموناس آئروجینوزا* در حضور لیزات و سوپرناتانت

نتایج به‌دست‌آمده از تست حساسیت میکروبی حاکی از آن است که رشد باکتری در حضور سوپرناتانت در چاهک سوم و رقت ۲۰۴۸ میلی‌گرم در میلی‌لیتر متوقف گردید. بر این اساس، رقت مورد استفاده در تمامی واکنش‌ها برای سوپرناتانت، رقت ۱۰۲٤ میلی‌گرم در میلی‌لیتر که معادل 1/2Mic بود، در نظر گرفته شد.

از آنجاکه هیچ‌گونه مهاری توسط لیزات مشاهده نشد، بالاترین رقت تست حساسیت میکروبی معادل ۸۱۹۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تست حرکت

پس از انجام تست حرکت برای باکتری در محیط‌های حاوی یا فاقد لیزات و سوپرناتانت نتایج ذیل به دست آمد:

حرکت باکتری در حضور لیزات در مقایسه با سویه کنترل مطابق با جدول ۱ مهار گردید. هم‌چنین، حرکت باکتری در حضور سوپرناتانت به میزان چشم‌گیری کاهش یافت. نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری قطر هاله‌ی رشد در شرایط متفاوت در جدول زیر ذکرشده است و در تستهای آماری کلیه آزمایشات معنادار بوده است (گفتنی است مهار حرکت در این تست به معنای کاهش قطر هاله ی حرکت است.)

جدول۱. اندازه‌گیری هاله رشد حرکت در شرایط متفاوت

حرکت	میانگین قطر هاله حرکت (mm)
حرکت در نمونه کنترل (A)	M:12.33±1.178
حرکت در حضور سوپرناتانت(B)	M:5±0.435
حرکت در حضور لیزات(C)	M:8.3±0.62

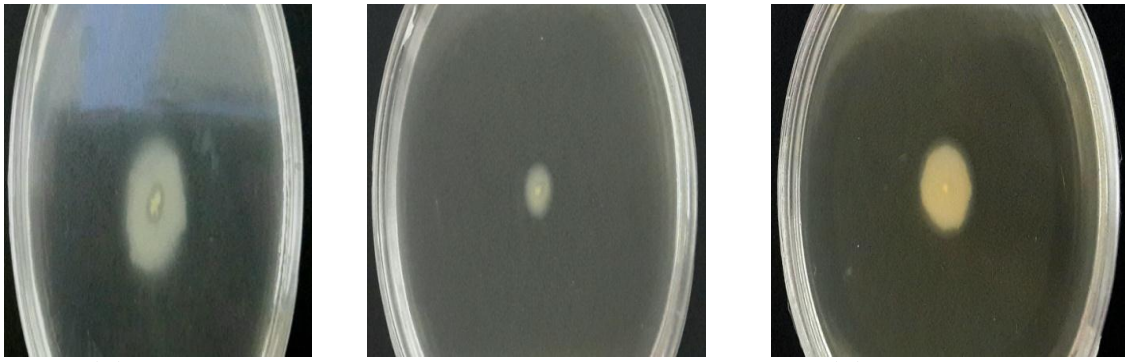
M: نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش

کلیه اطلاعات مستخرج از این آزمایش، توسط تست ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. شایان ذکر است مقادیر X، کمتر از ۰.۰۵ معنی‌دار محسوب می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018



حرکت کنترل(A) حرکت در حضور سوپرناتانت(B) حرکت در حضور لیزات(C)

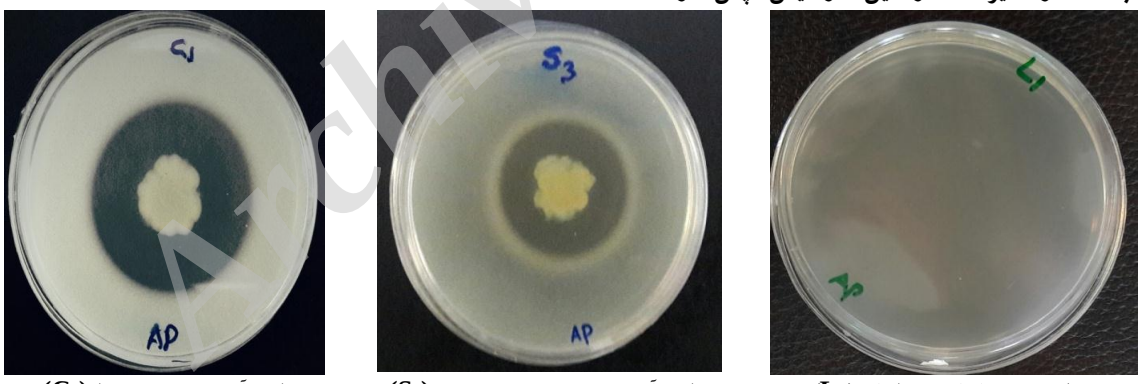
شکل ۱. تصایر حاصل از بررسی حرکت باکتری

نتایج حاصل از آلکالین پروتئاز

انجام تست آلکالین پروتئاز در حضور لیزات و سوپرناتانت نتایج زیر (شکل و جدول ۲) را در پی داشت:

الف-عصاره سوپرناتانت پس از گذشت ٤٨ ساعت انکوباسیون توانسته بود تأثیر مهاری مطلوبی بر آنزیم باکتریایی اعمال کند. این امر موجب کاهش هاله‌ی شفاف اطراف باکتری در مقایسه با سویه‌ی کنترل گردید.

ب-عصاره لیزات در این آزمایش پس از اضافه نمودن به محیط ذکرشده کدورت موجود در محیط را به طور کامل زدود. این امر را می‌توان به حضور پروتئازهای موجود در این عصاره نسبت داد. به این خاطر، انجام تست لیزات غیرقابل انجام شد و در تستهای آماری کلیه آزمایشات معنادار بوده است (لازم به ذکر است، باکتری در این محیط با تکیه بر آنزیم، پروتئین‌ها را تجزیه نموده و هاله شفاف در اطراف ایجاد می‌کند).



فعالیت آنزیم سویه‌ی کنترل(C_1) فعالیت آنزیم در حضور سوپرناتانت(S_3) محیط پایه پس از افزودن لیزات(L_1)

شکل ۲. تصایر حاصل از بررسی فعالیت آنزیم

جدول ۲. اندازه‌گیری نتایج حاصل از فعالیت آنزیم (عدد حاصل میانگین سه بار انجام تست است)

	قطر حاصل از فعالیت آنزیم پروتئاز (هاله شفاف) بر حسب میلی‌متر
نمونه‌ی کنترل	M:9 ±0.04
نمونه‌ی حاوی سوپرناتانت	M:6.5 ±0.81

M: نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش

کلیه اطلاعات مستخرج از این آزمایش، توسط تست ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. شایان ذکر است مقادیر X، کمتر از ۰.۰۵ معنی‌دار محسوب می‌شود.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

نتایج حاصل از تست الاستاز

افزودن عصاره سوپرناتانت و لیزات هر دو توانست فعالیت آنزیمی را کاهش دهد و عصاره ها بر فعالیت آنزیمی موثر واقع شد. پس از انجام تست جذب نوری قرائت گردید، نتایج حاصل مطابق با جدول ۳ است.

جدول ۳. نتایج حاصل از جذب نوری فعالیت آنزیمی

نمونه ها	OD
سویه‌ی کنترل	M: 0.869±0.161
حاوی سوپرناتانت	M: 0.345±0.053
حاوی لیزات	M: 0.623±0.011

خاصیت پروبیوتیکی و غیر بیماری‌زا است (۷) این مخمر توانایی مقابله و حفاظت در برابر باکتری‌های گوناگون را با مکانیسم‌های متفاوت دارد.(۷)

مطالعات زیادی پیرامون تاثیر پروبیوتیک‌ها (*ساکارومایسس سرویزیه*) بر پاتوژن‌ها صورت گرفته است. نتایج این مطالعات بر حسب زمان، مکان و باکتری متفاوت بوده است. مطالعه ایی در سال ۲۰۱۲ Tiago و همکارانش پیرامون اتصال به سطوح مخمری به عنوان مکانسیم به دام انداختن پاتوژن‌ها توسط سویه‌های پروبیوتیکی ساکارومایسس انجام دادند که نتیجه حاصل به شرح زیر است، دوسویه *ساکارومایسس سرویزیه* UFMG 905 و BY4741 باعث ممانعت از اتصال پاتوژن به رسپتور اختصاصی آن در سطح سلول‌های اپیتلیال روده ایی شده بود (۵). در سال در سال ۲۰۱٤ Sudha Joshi و همکارانش به بررسی اثر ممانعتی پروبیوتیکها (*لاکتوباسیل پلانتاروم*) بر تضعیف ویرولانس فاکتورهای سودوموناس آئروجینوزا شامل الاستاز، پیوسیانین و بیوفیلم پرداخت که نتایج آن حاکی از تأثیر مثبت لاکتوناز مترشحه از لاکتوباسیلوس پلانتارم بر عوامل بیماری‌زای این باکتری است (۱۲). در مطالعه‌ای در ۱۳۹۳ عیسی غلام‌پور عزیزی بر تأثیر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر میزان کاهش سم قارچی سیترینین کار کردند که نتایج آن حاکی از کاهش تولید مایکوتوکسین و استفاده از آن به عنوان یک روش بیولوژی و کم‌خطر است (۲۳). مطالعه‌ای دیگر در سال

کلیه اطلاعات مستخرج از این آزمایش، توسط تست ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. شایان ذکر است مقادیر X، کمتر از ۰.۰۵ معنی‌دار محسوب می‌شود. در این آزمایش همان‌طور که در جدول فوق بیان شده است؛ جذب نوری قرائت‌شده در سویه کنترل ۰.۸٦۹ ±۰.۱٦۱ است. در تست دوم، آزمایش سوپرناتانت، این میزان ۰.۳٥٤±۰.۰٥۳ است که کاهش ترشح آنزیم و به دنبال آن OD را شاهد هستیم. هم‌چنین در تست آماری، مقدار X، کمتر از ۰.۰۵ است که معنی‌دار است. در آزمایش مربوط به عصاره لیزات نیز مقادیر قرائت‌شده از سه بار تکرار ۰.٦۲۳ ±۰.۱۱ است. این میزان در مقایسه با سویه کنترل، کاهش فعالیت آنزیم را نشان می‌دهد. این کاهش جذب نوری سبب شده است تا مقدار X در این آزمایش نیز کمتر از ۰.۰۵ باشد که معنی‌دار تلقی می‌شود.

بحث

سودوموناس آئروجینوزا باکتری فرصت‌طلب است. این باکتری به عنوان سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از *استافیلوکوکوس اورئوس واشریشیا کلای* است (۲۱).

از جمله مشکلات عمده ایجاد شده توسط این باکتری در روند درمان و پیشگیری از عفونت‌های ایجاد شده مقاومت به طیف وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌هاست که در حال رشد روزافزون است (۲۲). این امر موجب شده است محققین در جستجوی راه‌های نوین مقابله با این باکتری باشند. *ساکارومایسس سرویزیه* مخمری با

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

با تکیه بر نتایج به دست آمده در این پژوهش، عصاره مخمر (سوپرناتانت) می‌تواند نقش به سزایی در مهار ژن الاستاز باکتری داشته باشد. کاهش هر یک از فاکتورهای یادشده، می‌تواند نقش بسیار مهمی در جهت کنترل و مقابله با انتشار باکتری در عفونت‌ها و دیگر بیماری‌های مرتبط باشد. چراکه باکتری با فعالیت پروتئولیتکی و الاستولیتکی قادر به ایجاد عفونت سیستمیک است. حرکت نیز عامل مهمی در کلونیزه شدن و در پی آن تشکیل بیوفیلم است که به‌واسطه‌ی حضور لیزات و سوپرناتانت به محیط تا حد قابل قبولی کنترل گردید.

نتیجه‌گیری

در نهایت می‌توان گفت همان‌طوری که پیش از این مطرح شد، براساس پژوهش حاضر یکی از راه‌های پیشگیری و مقابله علیه سودوموناس آئروجینوزا استفاده مناسب و مطلوب از پروبیوتیکها (ساکارومایسس سرویزیه) است. با توجه به اثرات حفاظتی و غیر پاتوژنی مخمر و با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری، این روش را می‌توان، به عنوان روش جایگزین در درمان در نظر گرفت. لازم به ذکر است، فاکتورهای ویرولانس مورد مطالعه در این طرح، از جمله فاکتورهای مهم دخیل در شدت و حدت مشکلات ایجاد شده توسط این باکتری است. حال آنکه با توجه به تعدد و کثرت فاکتورهای بیماری‌زای این باکتری، نیاز به تحقیقات گسترده‌تر در جهت تکمیل و تأیید این پژوهش پیش از پیش احساس می‌شود.

سپاسگزاری

این مقاله از پایان‌نامه مقطع کارشناسی ارشد مصوب گروه میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد به دست آمده است. هم‌چنین از همکاری و مساعدت مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

۱۳۹۰ رحیم زاده به بررسی اثر ضد میکروبی کفیر بر سودوموناس آئروجینوزا پرداختند که در این مطالعه تجربی تأثیر کفیر بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیمار دچار سوختگی و سودوموناس آئروجینوزا استاندارد (ATCC 27853) مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های کفیر در دو زمان تخمیر ٤٨ و ٧٢ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، با روش‌های دیسک پلیت و چاهک و بررسی کینیتیک مرگ به صورت in vitro در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. جهت تعیین کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی (MIC) که از رشد باکتری پس از ٢٤ ساعت ممانعت می‌نماید از روش‌های رقت لوله‌ای و کدورت سنجی استفاده شد. نتایج آن حاکی از اثر عصاره کفیر (استرپتوکوکوسی‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیلهای مزوفیلیک، مخمرهای تخمیری و غیرتخمیری لاکتوز و باکتری‌های اسیدلاکتیک) دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* استاندارد (ATCC27853) و *سودوموناس آئروجینوزا* جدا شده از بیمار سوخته بود. (٢٤) هم‌چنین الهه کیایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ مطالعه‌ای صورت گرفت که به اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست که دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده‌اند علیه باکتری‌های پاتوژن پرداخت. این مطالعه، اثر مهاری لاکتوباسیل‌های (پروبیوتیک) را بر ۷ گونه‌ی مهم پاتوژن‌های گوارشی نشان داد (۲۵).

این پژوهش به جهت اهمیت تأثیر پروبیوتیک‌ها (ساکارومایسس سرویزیه) بر پاتوژن انسانی، سودوموناس آئروجینوزا PAO1، و نیاز روزافزون به کنترل و مهار این باکتری پرداخت. تهیه و آماده‌سازی عصاره سوپزناتانت با تکیه بر مطالعات انجام شده در خارج از کشور بوده است. روش کار تست‌های فنوتیپی نیز مطابق با تحقیقات مشابه صورت گرفته، لیکن در انتخاب پاتوژن و فاکتورهای ویرولانس تفاوت‌های قائل شدیم.

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

منابع

1. Kumar H, Salminen S, Verhagen H, Rowland I, Heimbach J, Ares S., et al. Novel probiotics and prebiotics road to the market. Current Opinion in Biotechnology 2015; 32:99–103.
2. Jamalifar H, Rahimi HR, Samadi N, Shahverdi AR, Sharifian Z, Hosseini F., et al. Antimicrobial activity of different Lactobacillus species against multi- drug resistant clinical isolates o Pseudomonas aeruginosa. Iran Journal of Microbiology 2011; 3: 21–25.
3. Youenn A, Rozenn Le B, Georges B, Gwenaelle Le B. Screening of Lactobacillus spp for the prevention of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. Bio Med Current Microbiology 2014; 14:107-5.
4. Jagriti Sh, D. S. Chauhan. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa by antibiotics and probiotics combinations in vitro study. European Journal of Experimental Biology 2014; 4:10-14.
5. Tiago F, Martins F, Souza E, Pimenta P, Araujo H, Castro I. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics. Journal of Medical Microbiology .2012; 61, 1194–1207.
6. Yuan Kun lee, John Wiley & Sons. Seppo Salminen. Handbook of probiotics and prebiotics. New Jersey published simultaneously in Canada 2009.
7. Flaviano S, Martins A, Rodrigues C, Fabiana C. P. Tiago, Francisco J.A, Carlos A. R., et al. Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. Journal of Medical Microbiology 2007; 56:352–35.
8. Valdéz JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdigón G. Interference of Lactobacillus plantarum with Pseudomonas aeruginosa in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. Clinical Microbiology Infection 2005; 11:472–479.
9. Alain Filloux, Juan-Luis Ramos Editors. Pseudomonas methods and protocols. New York. Springer Science Business Media 2014; 15-298.
10. Delden V, H. Iglewski B. Cell-to-cell signaling and pseudomonas aeruginosa infections. Emerging Infectious Diseases 1998; 4, 4.
11. Laarman AJ, Bardoel BW, Ruyken M, Fernie J, Milder FJ, van Strijp JA., et al. Pseudomonas aeruginosa alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. Journal of Immunology 2012; 1; 188, 1:386-93
12. Hoge R, Pelzer R, Rosenau S, Wilhelm S. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of pseudomonas aeruginosa 2008; 75, 7416.
13. Alain Filloux, Juan-Luis Ramos Editors, Pseudomonas methods and protocols. New York. Springer Science Business Media 2014; 7,114.
14. Tetsuyoshi I, Ryuji S, Kazuhiro F. Inhibition of swarming motility of pseudomonas aeruginosa by branched-chainfattyacids. Emerging Infectious Diseases 2008; 01.10-89.
15. Draket D, Montle T. Flagella motility and invasive virulence of pseudomonas aeruginosa. Journal of General Microbiology 1988; 134, 43-52.
16. krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, lukaszewicz M, Dziadkowiec D. The antagonistic effect of saccharomyces boulardii on candida albicans filamentation, adhension and biofilm formation. Federation of European Microbiological Societies 2009; 1312-1321.
17. Clinical and Laboratory Standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing twenty-third informational supplement 2013.
18. Mousavi Nadoushan S. End of Master's Degree Biology -Microbiology, S. Effect of essential oils of Shirazi, case, eucalyptus, cumin and mint on the movement and connection of Pseudomonas aeruginosa. Shahed University:Tehran 1388.
19. Kazanas N. Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. Applied Microbilogy.1968; 128-132.
20. Ohman D, Stanley J, Barbara H. Isolation and characterization of a Pseudomonas aeruginosa PAO1 Mutant That Produces Altered Elastase. Journal of Bacteriology 1980; 836-842.
21. Zinsser HA WJ. Zinsser microbiology: Ayizh 2004; 295.
22. Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, ampC and oprD expression in carbapenem resistance of Pseudomonas aeruginosa clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50, 1633-41.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Gholampour I, Gorji M, Nouri B, Rouhi S. Effect of Saccharomyces cerevisiae yeast in reducing of the amount of citrinin fungal toxin in wheat flour. Jorjani Journal 1393; 2end:25-7.
24. Rahimzadeh G, Bahar M, Amir Mozafari N, Salehi M. Antimicrobial activity Kefir on Pseudomonas aeruginosa. Razi. Journal of Medical Sciences 2011; 18, 82 & 83.
25. Kiayei E, Amirmaszafari N, Sami Aladb Hossein, Jandeghi N, Ghaemi E. The antagonistic effects of lactic bacteria isolated from yogurt against pathogenic bacteria. Journal of Gorgan University of Medical Sciences 2006; 8, 1 -28.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

Archive of SID

www.SID.ir

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 10:57 IRDT on Saturday May 5th 2018

Daneshvar

Medicine

The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on motility, elastase, and alkaline protease in *pseudomonas aeruginosa*

Zahra DehghanZadeh[1], Parviz Owlia[2*], Seyyed Mahmoud Amin Marashi[3], Hourie Saderi[2], Maryam mokari[1]

1. Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Molecular Microbiology Research Center, Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
3. Department of Biology, Faculty of Medicine, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

*** Corresponding author e-mail: powlia@gmail.com**

Abstract

Background and Objective: According to definition of probiotics by WHO/FAO that is "Live microorganisms which, when present in sufficient amount, confer beneficial effects to the host".
Saccharomyces cerevisiae is the first non-pathogenic yeast which is known as a probiotic for humans that its helpful effects for humankind has been proved. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most significant opportunistic pathogen that has notably resistance to many antibacterial agents. This study evaluated the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* such as elastase, alkaline protease, and motility.

Materials and Methods: In this study, we used local strain of *Saccharomyces cerevisiae*, which has the probiotic property and *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 strain). In order to investigate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* (supernatant-lysate) on *Pseudomonas aeruginosa*, appropriate phenotypic tests were used.

Results: The extract of *Saccharomyces cerevisiae* from local strain has inhibitory effects against *Pseudomonas aeruginosa*. Three factors involved in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity, which was studied in this research (elastase, alkaline protease, and motility), to the acceptable extent, controlled and inhibited.

Conclusion: According to results of this study, *Saccharomyces cerevisiae* has reducing effects against *Pseudomonas aeruginosa*, which with more extensive research in this field, it can be used as a promising and innovative way to treat infection of this bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, Elastase, Motility, Alkaline protease

Scientific-Research Journal of Shahed University
25th Year, No.133
February- March 2018

Received: 19/12/2017
Last revised: 03/02/2018
Accepted: 10/02/2018

Daneshvar(medicine) shahed University/ 25th year/2018 /NO.133

Archive of SID

www.SID.ir