فعالیت ضد بیوفیلمی بخش شناور فاقد سلول *لاکتوباسیلوس کازئی* در *سودوموناس آئروژینوزا*

سرگل امین نژاد [۱]، روحا کسری کرمانشاهی [۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* یک بیماری‌زای فرصت طلب و مهم با توانایی تولید بیوفیلم است. بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* به‌طور ذاتی در مقابل عوامل ضد میکروبی مقاوم است و در شرایط مختلف مشکلات زیادی در خدمات بهداشتی ایجاد می‌کند. لاکتو-باسیلوس‌ها مواد مهاری را در بخش شناور فاقد سلول (cell-*free supernatant*) CFS ترشح می‌کنند که از عفونت‌های ایجاد شده توسط ارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر بازدارندگی CFS لاکتو باسیلوس کازئی PTCC:۱۶۰۸ بر روی تشکیل بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC: ۱۴۳۰ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی بخش شناور فاقد سلول لاکتوباسیلوس با سانتریفیوژ جداسازی شد. خاصیت ضد میکروبی CFS لاکتوباسیلوس ابتدا با روش چاهک پلیت بررسی گردید. حداقل غلظت مهار کننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) آنها با روش میکرودایلوشن و طبق استاندارد CLSI ارزیابی شد. در نهایت توانایی تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور CFS *لاکتوباسیلوس* کازئی به‌صورت درصد با استفاده از روش میکروتیتر پلیت اصلاح شده تعیین گردید.

نتایج: CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* اثرات موثری روی باکتری مورد آزمایش دارد که MIC و MBC آن ۶۲/۵ µl/ml می‌باشد. علاوه بر این، در حضور CFS لاکتوباسیلوس تولید بیوفیلم در غلظت‌های MIC به‌میزان ۲/۶±۸۷ درصد مهار شده و در غلظت‌های Sub-MIC نیز به‌صورت قابل ملاحظه‌ای مهار شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این پژوهش، CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* اثر کشندگی چشم‌گیری روی بیوفیلم باکتریایی *سودوموناس آئروژینوزا* دارد. بنابراین، به‌نظر می‌رسد که این ماده طبیعی می‌تواند عامل امید بخشی در درمان عفونت‌های سودوموناسی باشد.

واژگان کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، لاکتو باسیلوس کازئی، MIC، MBC، بیوفیلم

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره هجدهم، شماره ۱، فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۳، صفحات ۳۷-۳۰

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب انسانی و یکی از چهار بیماری‌زای بیمارستانی است که مسئول بروز ۱۰/۱ درصد از تمام عفونت‌های اکتسابی بیمارستانی می‌باشد [۱]. مقاوم‌ترین و شایع‌ترین عامل عفونت‌های بیمارستانی موجود تا به امروز که در غالب عفونت‌های ثانویه از علل مهم مرگ و میر در سراسر دنیا معرفی گردیده، باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد. میزان مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها در بیماران سرطانی، مبتلایان به ایدز، افراد دارای سیستیک فیبروزیس و بیماران دارای سوختگی شدید ۵۰ درصد است [۳،۲]. این باکتری دارای فاکتورهای بیماری‌زای متعددی می‌باشد.

[۱] کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، تهران، ایران

[۲] استاد، میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهرا (س)، تهران

*** نشانی نویسنده مسئول:**

تهران، خیابان ونک، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۲۷۰۹ **دورنویس:** ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱

پست الکترونیک: rkasra@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۹۲/۵/۱۶

همچنین، مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های آن گزارش گردیده است. در این میان بیوفیلم نقش مهمی در بیماری‌زای باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ایفا می‌کند از جمله با افزایش تراکم آنتی‌بیوتیکی لازم برای کشتن باکتری‌های بیوفیلمی نسبت به پلانکتونیک مقاومت بیوسایدی این باکتری را افزایش می-دهد [٤]. به‌دنبال استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت زیاد *سودوموناس آئروژ ینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و ایجاد مقاومت چندگانه و هم‌چنین هزینه بالا و عوارض این داروها راه‌کارهای جدیدی برای مقابله با این باکتری ضروری به‌نظر می‌رسد که یکی از آن‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشد؛ این باکتری‌ها با وجود طیف عملکرد وسیع بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا برای میزبان یک فلور کاملا طبیعی محسوب شده و علاوه بر این که هیچ اثر زیان‌باری ندارند بلکه بسیاری از ویتامین‌ها و مواد ضروری بدن میزبان را نیز تامین می‌کنند [۸-۵]. بنابراین، می‌توان درمان با واسطه میکروبی را یک روش درمانی جدید و کارامد دانست. باکتری‌های اسید لاکتیک از معمول‌ترین انواع باکتری‌ها هستند که به‌عنوان پروبیوتیک کاربرد دارند و مواد ضد میکروبی متعددی را از جمله اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اسیدهای چرب و ترکیبات حلقوی

Archive

www.SID.ir

تولید می‌کنند؛ این مواد به‌صورت عمده به بخش شناور فاقد سلول این پروبیوتیک‌ها ترشح می‌شوند [۱۰،۹]. یکی از مهمترین پروبیوتیک‌ها لاکتوباسیلوس کازئی است که از گستردگی زیادی برخورداراست [۱۱]. ترکیبات ضد میکروبی ترشح شده توسط لاکتوباسیلوس‌ها مکانیسم‌های اثر مختلفی دارند که از جمله آن می‌توان به نقش اسیدهای آلی اشاره کرد. این مواد باعث اختلاف در شیب الکتروشیمیایی پروتون و تغییر در نفوذپذیری غشاء می‌شوند، هم‌چنین باعث افزایش اسیدیته داخل سلولی و تقلیب شدن پروتئین‌ها می‌گردند [۱۲]. هم‌چنین، لاکتوباسیلوس‌ها در حضور اکسیژن تولید H_2O_2 می‌کنند که اثر ضد میکروبی آن به‌علت تقلیب کردن تعدادی از آنزیم‌ها، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و افزایش نفوذپذیری غشاء ناشی از آن و هم‌چنین تولید رادیکال‌های آزاد ضد میکروبی می‌باشد [۱۳]. بنا به آنچه گفته شد، استفاده از پروبیوتیک‌ها در درمان عفونت‌های باکتریایی و بیوفیلم حاصل از آنها جالب و بررسی آنها ضروری به‌نظر می‌رسد. با توجه به اهمیت *سودوموناس آئروژینوزا* در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و افزایش روزافزون مقاومت آنتی‌بیوتیکی این باکتری، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید و جایگزین الزامی است که این مطالعه نیز با هدف بررسی اثر ضد میکروبی بخش شناور فاقد سلول لاکتوباسیلوس کازئی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* جلوگیری از رشد و بیماری‌زایی و هم‌چنین تولید بیوفیلم در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری و محیط کشت: تمام آزمایش‌ها بر روی سویه‌های استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا ۱۴۳۰*:PTCC و لاکتوباسیلوس کازئی ۱۶۰۸ :PTCC انجام گرفت که به‌صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شدند. *سودوموناس آئروژینوزا* در محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) در $37^{\circ}C$ به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی کشت و گرم‌خانه‌گذاری شد. هم‌چنین، لاکتوباسیلوس کازئی در محیط Mann Rogosa Sharpe Broth (مرک، آلمان) در $37^{\circ}C$ به‌مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروائروفیل در جار بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به‌روش انتشار از دیسک در آگار تست: حساسیت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق با ۹ دیسک آنتی بیوتیک شامل آزیترومایسین (۱۵µg)، ایمی‌پنم (۱۰µg)، جنتامایسین (۱۰µg)، سیپروفلوکساسین (۵µg)، آمیکاسین (۳۰µg)، توبرامایسین (۱۰µg)، سفتازیدیم (۳۰µg)، کلرامفنیکل (۳۰µg)، سفتریاکسون (۳۰µg) تهیه شده از شرکت Mast انگلیس، طبق معیار CLSI (موسسه استانداردهای آزمایشگاهی و بالینی) انجام پذیرفت. در این روش دیسک حاوی آنتی‌بیوتیک روی سطح آگاری که میکروارگانیسم برابر با غلظت ۰/۵ مک فارلند روی آن کشت داده شده است، قرار داده می‌شود و بعد از گرم‌خانه‌گذاری با توجه به نوع باکتری، قطر هاله عدم رشد با جداول استاندارد مقایسه گردید و نتایج به صورت حساس، نیمه حساس و مقاوم گزارش گردید [۱۵،۱۴].

تهیه قسمت شناور فاقد سلول لاکتوباسیلوس (CFS): در این روش لاکتوباسیلوس کازئی در محیط Mann Rogosa Sharpe Broth (با pH =۵/۷) تحت شرایط میکروآئروفیل کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت حاصله در ۱۵۰۰۰ rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و قسمت شناور (مایع رویی) حاصله با فیلتر غشائی(۰/۴۵ µm) میلی پور استریل شد. هم‌چنین میزان pH آن اندازه‌گیری شد که ۳/۹۷ بود [۱۶].

تعیین اثر CFS لاکتوباسیلوس به‌روش چاهک پلیت: سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از *سودوموناس آئروژینوزا* تهیه شد و با استفاده از سوآب استریل بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) به‌صورت چمنی کشت داده شد. سپس، با پی‌پت پاستور استریل بر روی محیط مذکور چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. و ۱۰۰µl از غلظت‌های ۵۰،۱۰ و۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از CFS لاکتوباسیلوس به چاهک‌ها ریخته شد و هم‌چنین ۱۰۰µl از محیط کشت Mann Rogosa Sharpe Broth به‌عنوان شاهد منفی در یکی از چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای $37^{\circ}C$ گرم‌خانه‌گذاری شدند. نتایج حاصل از روی وجود و یا عدم وجود قطر هاله عدم رشد تشخیص داده شد و اندازه‌گیری با کولیس انجام گردید، هم‌چنین آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید [۱۷].

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به‌روش براث میکرودایلوشن: در این روش از پلیت‌های ۹۶ چاهکی Greiner bio- one (آلمان) استفاده شد. غلظت‌های مورد نظر از مواد ضد میکروبی با استفاده از محیط کشت مولر هینتون براث تهیه شد که از دامنه غلظت ۲۵۶ تا ۰/۱۲۵ برای آزیترومایسین و سیپروفلوکساسین و ۲۵۰ تا ۰/۱۲ برای CFS لاکتوباسیلوس استفاده گردید. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف مواد ضد میکروبی به هرچاهک انتقال داده شد. در ادامه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در نهایت غلظت نهایی باکتری در هر چاهک به‌میزان CFU/ml ۱۰۶× (۱-۰/۵) رسید. پلیت‌های میکروتیتر، برای

Archive of SID

www.SID.ir

جلوگیری از تبخیر درون پلاستیکی قرار داده شده و به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شد. از روش‌های پیشنهادی طبق دستور العمل CLSI برای تعیین حساسیت میکروب‌های مورد مطالعه استفاده شد [۱٤].

تعیین کمترین غلظت کشنده (MBC) مواد ضد میکروبی به‌روش کشت بر محیط جامد: برای تعیین MBC یک لوپ از چاهک‌هایی که فاقد کدورت بودند و همچنین چاهک‌های کنترل مثبت و منفی بر سطح محیط نوترینت آگار کشت داده شد. پلیت‌ها بعد از گذشت ۲٤ ساعت بررسی شده و میزان MBC بر اساس حداقل غلظتی از ماده ضد میکروب که از رشد باکتری در سطح پلیت جلوگیری کرده بود، تعیین شد [۱۸].

بررسی اثر CFS لاکتوباسیلوس بر تولید بیوفیلم *سودومو-ناس آئروژینوزا* : برای بررسی تولید بیوفیلم در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*، از روش پلیت میکروتیتر اصلاح شده استفاده شد [۱۹]. باکتری مورد نظر بر روی محیط Trypticase Soy Agar (مرک، آلمان) به‌علاوه ۰/۲ درصد گلوکز (مرک، آلمان) به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C کشت داده شد و از تک کلونی‌های رشد یافته روی این محیط، به محیط Trypticase soy Broth + ۰/۲ درصد گلوکز (مرک، آلمان) تلقیح شد تا سوسپانسیونی با جذب نوری معادل ۰/۱ در طول موج ٦۲۵ نانومتر به‌دست آید. ابتدا ۱۰۰µl از هرکدام از رقت‌های مواد ضد میکروبی به هر چاهک پلیت میکروتیتر افزوده شد، سپس ۱۰۰µl از سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به هر چاهک اضافه گردید. دامنه غلظت برای CFS لاکتوباسیلوس ۱۰۰۰-۷/۸ (رقیق‌کننده محیط کشت Mann Rogosa Sharpe Broth) بود. به چاهک کنترل منفی ۲۰۰µl محیط کشت TSB + ۰/۲ درصد گلوکز و به چاهک کنترل مثبت ۲۰۰µl از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت اضافه شد که معیار کنترل تشکیل بیوفیلم می‌باشد. حجم کلی هر چاهک ۲۰۰µl بود. پلیت‌ها به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از طی دوره گرم‌خانه-گذاری، محتوی چاهک‌ها به‌دقت و به‌وسیله سمپلرهای استریل آسپیره گردید. به‌منظور جدا شدن باکتری‌های متصل نشده، هر چاهک ۳-۲ مرتبه با ۲۰۰µl بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله بعد، ۱۵۰µl متانول مطلق (مرک، آلمان) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه متانول شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰µl کریستال ویوله ۱ درصد اضافه گردید. پس از ۲۰ دقیقه رنگ اضافی خارج شده و پلیت در زیر جریان کم آب شسته شد. پس از خشک شدن پلیت در مجاورت هوا، به هر چاهک ۱۵۰µl اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد (مرک، آلمان) افزوده شد و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا (statfax-2100, Awareness Technology Inc.,USA)، مقدار جذب رنگ موجود در هر چاهک در ٦۵۰ نانومتر خوانده شد و درصد مهار تشکیل بیوفیلم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد: {۱۰۰ × (OD_{650} مربوط به کنترل مثبت /OD_{650} مربوط به بیوساید) } - ۱۰۰= درصد مهار. این آزمایش سه بار تکرار گردید و میانگین و انحراف معیار آنها محاسبه گردید [۱۹].

محاسبات آماری: جهت مقایسه ارتباط داده‌ها از آزمون t مزدوج و آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و معنی‌دار بودن تفاوت‌ها با α=۰/۰۵ مورد ارزیابی قرار گرفت. کل مطالعات آماری با استفاده از نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ (Graph pad Software Inc, San Deigo, USA) انجام شد.

نتایج

حساسیت *سودوموناس آئروژینوزا* و *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف به‌روش انتشار در آگار تعیین گردید که به‌ترتیب *سودوموناس آئروژینوزا* نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین و کلرامفنیکل و *لاکتو باسیلوس کازئی* نسبت به آنتی-بیوتیک‌های ایمی‌پنم، آمیکاسین، توبرامایسین و جنتامایسین مقاومت نشان دادند (جدول شماره ۱). در این پژوهش اثر آنتاگونیستی CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* بررسی گردید: قطر هاله عدم رشد ثبت و توسط نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ آنالیز گردید که نشان دهنده اثر معنی‌دار (P=۰/۰۰۳) این ماده بر روی رشد *باکتری سودوموناس آئروژینوزا* بوده است (جدول شماره ۲). حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) برای آزیترومایسین و سیپروفلوکساسین به-ترتیب برابر ۱۲۸ و۰/۲۵ و همچنین حداقل غلظت کشندگی (MBC) برای آنها به‌ترتیب ۱۲۸ و ۰/۵ بود و این در حالی است که MIC و MBC برای CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* در برابر *سودوموناس آئروژینوزا* یکسان و برابر ٦۲/۵ بود.

تشکیل بیوفیلم در CFS *لاکتوباسیلوس کازئی*: این آزمایش سه بار تکرار شد که بعد از خوانده شدن نتایج کدورت سنجی با دستگاه خواننده الایزا، میانگین اعداد و انحراف معیار مربوط به کدورت (Turbidity) محیط کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در حضور غلظت‌های مختلف از CFS لاکتوباسیلوس در طول موج ٦۵۰ nm محاسبه گردید و کدورت محیط کشت باکتری بدون وجود CFS لاکتوباسیلوس به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (شکل شماره ۱). درصد بازدارندگی تولید بوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* توسط غلظت‌های مختلف CFS لاکتوباسیلوس کازئی و کنترل مثبت و همچنین انحراف معیار مربوط به آن‌ها نیز به‌دست آمد که اختلاف بازدارندگی در صورت

www.SID.ir

Archive of SID

وجود CFS لاکتوباسیلوس و عدم وجود آن (کنترل مثبت) کاملا معنی‌دار بود (P=۰/۰۰۱) (جدول شماره ۳). همان‌گونه که در شکل شماره ۲ نشان داده شده است در غلظت صفر از CFS که نشان دهنده کنترل مثبت است، هیچ بازدارندگی مشاهده نشد. نتایج حاصل از بررسی اثر CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* نشان داد که این ماده به میزان قابل توجهی بر تشکیل بیوفیلم اثر دارد و در حضور غلظت-های میکرولیتر آن تشکیل بیوفیلم، به‌طرز چشم‌گیری کاهش می‌یابد. در مقایسه با آن از شاهد (Mann Rogosa Sharpe Broth) استفاده شد که اثر بازدارندگی روی بیوفیلم نداشته و اختلاف آنها کاملا معنی‌دار است. با افزایش غلظت عصاره گیاه میزان بازدارندگی به‌صورت معنی‌داری (P=۰/۰۰۱) افزایش پیدا کرد. نتایج نشان دادند که تولید بیوفیلم در حضور CFS لاکتوباسیلوس در غلظت برابر MIC ۸۷±۲/۶ درصد مهار می‌شود، هم‌چنین غلظت‌های کمتر از غلظت MIC این عصاره نیز به‌مقدار چشم‌گیری تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهند (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱- الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها به‌روش انتشار از دیسک درآگار

آنتی بیوتیک Conc.(ug.disc) نوع باکتری	ایمی‌پنم (۱۰µg)	کلرامفنیکل (۳۰µg)	سفتریاکسون (۳۰µg)	آمیکاسین (۳۰µg)	توبرامایسین (۱۰µg)	سفتازیدیم (۳۰µg)	جنتامایسین (۱۰µg)	سیپروفلوکساسین (۵µg)	آزیترومایسین (۱۵µg)
سودوموناس آئروژینوزا PTCC:۱۴۳۰	S	R	S	S	S	S	S	S	R
لاکتو باسیلوس کازئی PTCC: ۱۶۰۸	R	S	S	R	R	S	R	S	S

R- مقاوم، S- حساس، I- نیمه حساس

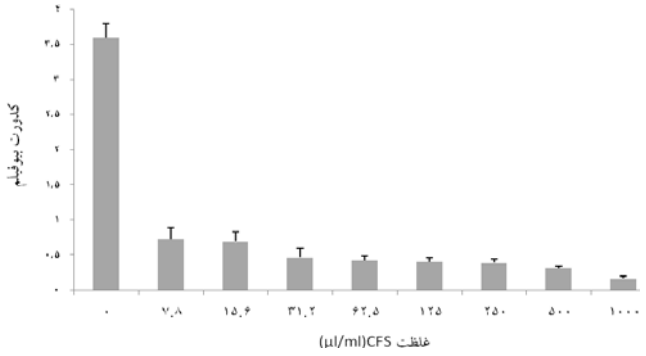
جدول شماره ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با غلظت‌های مختلف CFS *لاکتوباسیلوس کازئی*

غلظت‌های مختلف (CFS)	۱۰	۵۰	۱۰۰	غلظت ۱۰۰ از شاهد(-) (MRS Broth)
قطر هاله عدم باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PTCC :۱۴۳۰	۶±۰۰	۱۴±۰/۷۰	۲۰/۳۳±۰/۵۷	۶±۰۰

نتایج به‌صورت (میانگین سه بار تکرار± انحراف معیار) گزارش شده است. قطر mm ۶ برابر قطر هر چاهک است.

جدول شماره ۳- درصد بازدارندگی تولید بیوفیلم غلظت‌های مختلف از بخش شناور فاقد سلول گونه لاکتوباسیلوس کازئی بر حسب (µl/ml) در *سودوموناس آئروژینوزا* (میانگین سه بار تکرار± انحراف معیار)

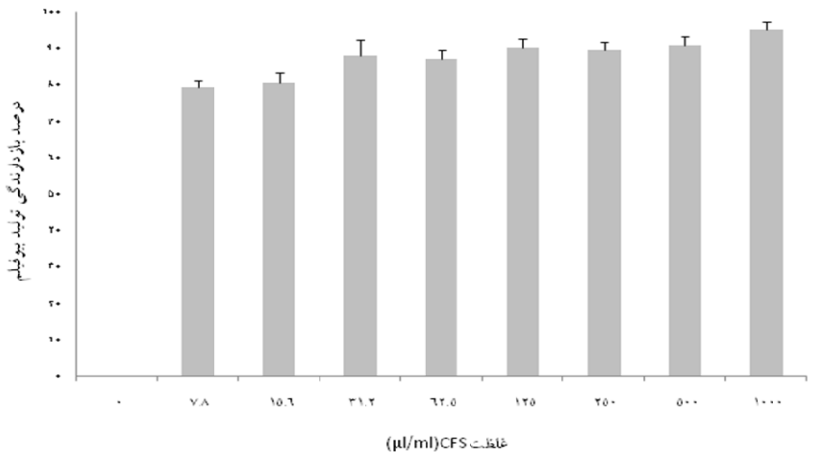
غلظت CFS (µl/ml) سویه لاکتوباسیلوس	کنترل مثبت ۰	۷/۸	۱۵/۶	۳۱/۲	۶۲/۵	۱۲۵	۲۵۰	۵۰۰	۱۰۰۰	P
L. casei PTCC :۱۶۰۸	۰	۷۹/۲±۱/۹	۸۰/۵۶±۲/۶	۸۷/۷±۳/۹	۸۷±۲/۶	۹۰/۱±۲/۴	۸۹/۵±۲/۱	۹۰/۷±۲/۵	۹۵/۲±۲	<۰/۰۰۰۱



شکل شماره ۱- تاثیر غلظت‌های مختلف CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* بر میزان کدورت بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* در OD برابر ۶۵۰ nm (میانگین سه بار تکرار± انحراف معیار)

Archive of SID

www.SID.ir



شکل شماره ۲- درصد بازدارندگی تولید بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* توسط غلظت‌های مختلف CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* (میانگین سه بار تکرار± انحراف معیار)

بحث

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب بوده و دارای مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی چندگانه است [۲۱،۲۰]. هم‌چنین با توجه به اهمیتی که بیوفیلم در بیماری‌زای و مقاومت این باکتری ایفا می‌کند تلاش برای یافتن ترکیبات ضد میکروبی جدیدی که بتواند در تراکم کمتر، باکتری‌های بیوفیلمی را از بین ببرد یک امر ضروری است که در این میان استفاده از پروبیوتیک‌ها یک گزینه مناسب به‌نظر می‌رسد. این باکتری‌ها اثرات ضد میکروبی با مکانیسم‌های مختلف دارند و حتی متفاوت از آنتی‌بیوتیک رشد باکتری‌ها را مهار می‌کنند و این امر لزوم تحقیقات جامع‌تری در حیطه این باکتری‌ها را گوشزد می‌کند. نتایج این مطالعه نشان داد بخش شناور *لاکتوباسیلوس‌کازئی* خاصیت ضد میکروبی شدیدی بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* دارد و *غلظت‌های* MIC و MBC آن بسیار پایین و یکسان می‌باشد که این نشان‌دهنده موثر بودن این ماده ضد میکروبی در بازدارندگی و کشندگی این باکتری می‌باشد. هم‌چنین، CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای قابلیت بسیار بالای در مهار بیوفیلم بود و نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلظت ماده ضد میکروبی میزان بازدارندگی به‌صورت چشم‌گیری افزایش داشت؛ به‌طوری‌که در غلظت برابر MIC ۸۷±۲/۶ درصد مهار می‌شود و هم‌چنین CFS *لاکتوباسیلوس کازئی* در غلظت‌های Sub-MIC نیز دارای اثر ضد بیوفیلمی قابل توجهی بود که می‌تواند نوید بخش این مسئله باشد که می‌توان از این ماده به‌عنوان یک ماده پیش گیرنده و کنترل‌کننده عفونت استفاده کرد. با نگاهی به تاریخچه‌ی بررسی-های انجام شده در این زمینه، نتایج به‌دست آمده توسط سایر همکاران، مؤید بررسی حاضر است. چنانچه در سال ۱۹۹۷، Coconnier و همکاران نشان دادند که *لاکتوباسیلوس اسیدو-فیلوس* دارای اثر بازدارندگی رشد برروی باکتری‌های بیماری‌زای مختلف دستگاه ادراری و واژن از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* بوده است که باعث کاهش چسبندگی این باکتری‌ها به سطح سلول‌های اپی‌تلیال شده و هم‌چنین موجب کاهش تعداد کلونی‌های این باکتری‌ها می‌گردد [۲۲]. در مطالعه حاضر نیز CFS لاکتوباسیلوس کازئی باعث کاهش میزان رشد، تشکیل بیوفیلم و در نتیجه چسپندگی *سودوموناس آئروژینوزا* شد. Forestier و همکارانش نشان دادند که تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای جداسازی شده از نمونه‌های بالینی از جمله *سودوموناس آئروژینوزا* در اثر مجاورت با گونه‌های *لاکتوباسیلوس کازئی رامنوسوس* سویه Lcr به شکل معنی‌داری دچار کاهش رشد شده و تعداد کلونی‌های آنها کاهش پیدا کرده است [۲۳]. جمالی فر و همکاران نیز با استفاده از روش چاهک پلت باکتری‌های لاکتیک جدا شده از منابع مختلف را بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* بالینی با مقامت آنتی‌بیوتیکی چندگانه تاثیر داده و اثر بازدارندگی قابل توجهی را مشاهده کردند که با وجود تفاوت گونه‌های باکتریایی اسید لاکتیک این پژوهش با مطالعه حاضر نتایج مشابهی به‌دست آمد [٦]. Valdez و Peral اثر بازدارندگی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را بر روی فعالیت بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* جداسازی شده از زخم مورد بررسی قراردادند و نتایج حاکی از این بود که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر تولید علائم ملکولی هموسرین لاکتون، تولید آنزیم الاستاز و بیوفیلم اثر بازدارندگی دارد. هم‌چنین، موش‌های دارای عفونت سوختگی با *سودوموناس آئروژینوزا* که با این لاکتوباسیلوس تیمار شده بودند بهبود سریع‌تری را نسبت به موش‌های شاهد نشان دادند [۲٤] که نتایج

Archive of SID

www.SID.ir

این پژوهش با مطالعه حاضر از لحاظ بازدارنگی تولید بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* با وجود استفاده از دو گونه مختلف لاکتوباسیلوس مشابه می‌باشد. هم‌چنین، تاثیر بخش شناور تعدادی از گونه‌های لاکتوباسیلوس بر روی فاکتورهای ویرولانس برخی بیماری‌زاها مانند *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* توسط Iordache و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. آنها نشان دادند که آنزیم‌های لیپاز، کازئیناز، ژلاتیناز و آمیلاز و لکتیاز در حضور بخش شناور فاقد سلول پروبیوتیک‌ها به شکل معنی‌داری کاهش پیدا می‌کنند [۲۵]. در مطالعه حاضر نیز فاکتور ویرولانسی که برای بررسی اثر بخش شناور لاکتوباسیلوس کازئی انتخاب شد، بیوفیلم بود که این فاکتور نیز به شکل معنی‌داری در حضور بخش شناور کاهش پیدا کرد. به‌علاوه، بیان شده است که باکتریوسین جداسازی شده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر روی قدرت چسبندگی و تشکیل بیوفیلم سویه‌های *سودوموناس* جدا شده از کاتتر بیماران دارای عفونت اداری اثر داشته و تا حد بسیار زیادی از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند [۲۶]. نشان داده شده است که بخش شناور فاقد سلول (CFS) *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای قابلیت ضد میکروبی بسیار زیادی بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* بالینی با مقاوت آنتی‌بیوتیکی بالا است و توانایی چسبندگی و تشکیل بیوفیلم و هم‌چنین بیان علائم سیستم تنظیمی حد نصاب احساس (Quorum sensing) و قابلیت بیماری‌زایی این بیماری‌زا را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و باعث بهبود سریع زخم می‌شود [۲۷]. نتایج به‌دست آمده در این تحقیق و هم‌چنین بررسی‌های که سایر محققان انجام داده‌اند، نشان‌دهنده این است که انواع مختلف لاکتوباسیلوس‌های به‌کار رفته در این مطالعات بر روی باکتری‌های بیماری‌زا به‌خصوص *سودوموناس آئروژینوزا* دارای اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی بوده‌اند که می‌توان یکی از دلائل این بازدارندگی را وجود ترکیبات ضد میکروبی ترشح شده از لاکتوباسیلوس دانست که تاحد زیادی مانع اتصال باکتری به سطوح و تشکیل بیوفیلم می‌شوند و البته تفاوت‌های مربوط به نتایج هم به‌دلیل اختلاف در نوع سویه‌های لاکتوباسیلوس، تفاوت در نوع سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* که در اکثر موارد بالینی بوده است و هم‌چنین مربوط به نوع روش ارزیابی خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها بوده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر به‌خوبی نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* دارای فعالیت آنتاگونیستی و ضد بیوفیلمی قوی بر علیه *سودوموناس آئروژینوزا* می‌باشد که قابل مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها در سطح میکرولیتر می‌باشد.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد. بدین‌وسیله از رئیس محترم مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله جناب آقای دکتر رضا رنجبر جهت در اختیار گذاشتن امکانات تحقیق تشکر می‌نماییم. هم‌چنین، از مسئول آزمایشگاه میکروب شناسی این دانشگاه سرکار خانم عذرا باقری جهت همکاری در انجام این پایان‌نامه قدردانی می‌گردد.

References:

[1] Jaffe R, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of Pseudomonas aeruginosa direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). ***J Clin Lab Anal*** 2001; 15(3): 131-7.

[2] Schulert GS, Fltman H, Rabin SD, Martin CG, Battle SE, Rollo J, et al. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent Pseudomonas aeruginosa isolates obtained from patients with hospitalacquired pneumonia. ***J Infect Dis*** 2003; 188(1): 1695-706.

[3] Davis PB, Drumm M, Konstan MW. Cystic fibrosis—State of the art. ***Am J Respir Crit Care Med*** 1996; 154(5): 1229-56.

[4] Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-Induced Dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* Cell in a Biofilm**.** ***Appl Environ Microbiol*** 2006; 72(3): 2064-9.

[5] Percival M. Choosing a probiotic supplement**.** ***Clin Nutr Insights*** 1997; 6: 1-4.

[6] 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 of *Pseudomonas aeruginosa*. ***Iran J Microbiol*** 2011; 3(1): 21-5.

[7] Gan BS, Kim J, Reid G, Cadieux P, Howard JC. *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibits *Staphylococcus aureus* infection of surgical implants in rats. ***J Infect Dis*** 2002; 185(9): 1369-72.

[8] Rishi P, Kaur S, Bhalla MPS, Preet S, Tiwari RP. Selection of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and its prophylactic activity against murine Salmonellosis. ***Int J Pro Pre*** 2008; 3(2): 89-98.

[9] Earnshaw RG. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food preservation systems. In: Brian JB. Wood W, editor. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. London and New York, Elsevier Applied Science; 1992. p. 211-32.

Archive of SID

www.SID.ir

[10] Smulders FJM, Barendsen P, van Logtestijn JG, Mossel DAA , Van Der Marel GM Review: Lactic acid: considerations in favour of its acceptance as a meat decontamininant**.** ***Int J Food Sci Technol*** 1986; *21*(4): 419-436.
[11] Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martinez-Gonzalez B, Eriotou E, Michopoulos S, et al. In vitro and in vivo inhibition of Helicobacter pylori by *Lactobacillus casei* strain Shirota. ***Appl Environ Microbiol*** 2004; 70(1): 518-26.
[12] Coda R, Cassone A, Rizzello CG, Nionelli L, Cardinali G, Gobbetti M. Antifungal activity of Wickerhamomyces anomalus and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. ***Appl Environ Microbiol*** 2011; 77(10): 3484-92.
[13] Kong S, Davison AJ. The role of interactions between O2, H2, OH., e- and O2- in free radical damage to biological systems. ***Arch Biochem Biophys*** 1980; 204(1): 18-29.
[14] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A4. Clinical and Laboratory Standards Institute, Villanova, PA. 1993.
[15] Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine. 5th ed. Philadelphia: Williams & Wilkins; 2005. p. 642-6, 831-7.
[16] Schillinger U, Lucke FK. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* Isolated from meat. ***Appl Environ Microbiol*** 1989; 55(8): 1901-6.
[17] Nitisinprasert S, Nilphai V, Bunyun P, Sukyai P, Doi K, Sonomoto K. Screening and identification of effective thermotolerant Lactic Acid Bacteria producing antimicrobial activity against *Escherchia coli* and *salmonella* sp.Resistant to Antibiotic**.** ***Kasetsart J.(Nat. Sci.)*** 2000; 34: 387-400.
[18] Murray PR. Patrick R. Manual of Clinical Microbiology. 8th ed. Washington DC: ASM press; 2007. p. 719-22.
[19] Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. ***J Microbiol Methods*** 2000*;* 40(2): 175-9.
[20] Vojtová V, Kolár M, Hricová K, Uvízl R, Neiser J, Blahut L, Urbánek K. Antibiotic utilization and *Pseudomonas aeruginosa* resistance in intensive care units**.** ***New Microbiol*** 2011; 34(3): 291-8.
[21] Luzzaro F, Mantengoli E, Perilli M, Lombardi G, Orlandi V, Orsatti A, et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum b-lac-tamase. ***J Clin Microbiol*** 2001; 39(5): 1865-70.
[22] Coconnier MH, Liévin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin AL. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. ***Antimicrob Agents Chemother*** 1997; 41(5): 1046-52.
[23] Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei* and *rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. ***Res Microbiol*** 2001; 152(2): 167-73.
[24] Valdez C, Peral MC. Interference of Lactobacillus plantarum with Pseudomonas aeruginosa in vitro and infected burns:the potential use of probiotics in wound treatment. ***Eur J Clin Microbiol Infect Dis*** 2005; 11(6): 472-9.
[25] Iordache F, Iordache C, Chifiriuc MC, Bleotu C, Pavel M, Smarandache D, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of some probiotic fractions with potential clinical application. ***Archiva Zootechnica*** 2008; 11(3): 41-51.
[26] Al-Mathkhury HJF, Ali AS, Ghafil JA. Antagonistic effect of bacteriocin against urinary catheter associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. ***N Am J Med Sci*** 2011; 3(8): 367-70.
[27] Ramos AN, Cabral ME, Noseda D, Bosch A, Yantorno OM, Valdez JC. Antipathogenic properties of *Lactobacillus plantarum* on *Pseudomonas aeruginosa*: The potential use of its supernatants in the treatment of infected chronic wounds**.** ***Wound Repair Regen*** 2012; 20(4): 552-62.

Archive of SID

www.SID.ir