

Antibiofilm activity of cell-free supernatant from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*

Aminnezhad S¹, Kasra-Kermanshahi R^{2*}

1- Young Researchers and Elites Club, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, I. R. Iran.

2 - Department of Biology, School of Science, Alzahra University, Tehran, I. R. Iran.

Received March 18, 2013; Accepted August 7, 2013

Abstract:

Background: *Pseudomonas aeruginosa*, as an important opportunistic pathogen, can produce *P. aeruginosa* biofilm. Intrinsically resistant to antimicrobial agent, the biofilm causes difficulties in various healthcare settings. Lactobacilli are known to secrete inhibitory substances in cell-free supernatant (CFS) to prevent infection by pathogenic organisms. The purpose of this study was to evaluate the inhibitory effects of CFS from *Lactobacillus casei* PTCC: 1608 on biofilm formation of *P. aeruginosa* PTCC: 1430.

Materials and Methods: In this experimental study, CFS from *Lactobacillus* was separated by centrifugation. The antimicrobial effect of CFS from *L. casei* was evaluated by agar well diffusion assay. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined by microdilution method according to CLSL standard. Finally, biofilm-production ability of *P. aeruginosa* as a percentage was determined in the presence of CFS from *L. casei* using the modified microtiter plate method.

Results: Results showed that CFS from *L. casei* has a significant effect on the tested strain and the MIC and MBC values for the strain were the same (62.5 µl/ml). Furthermore, in the presence of CFS from *L. casei*, biofilm production in MIC (87±2.6) and Sub-MIC concentration was considerably inhibited.

Conclusion: CFS from *L. casei* is effective in killing *P. aeruginosa* biofilm. Therefore, this material appears to be a promising agent for prophylaxis against various pseudomonal infections.

Keywords: *P. aeruginosa*, *L. casei*, MIC, MBC, Biofilm

* Corresponding Author.

Email: rkasra@yahoo.com

Tel: 0098 21 880 52709

Fax: 0098 21 880 5891

Conflict of Interests: No

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences April, 2014; Vol. 18, No 1, Pages 30-37

Please cite this article as: Aminnezhad S, Kasra- Kermanshahi R. Antibiofilm activity of cell-free supernatant from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*. Feyz 2014; 18(1): 30-7.

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 به طور 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 CFS (cell-free supernatant) ترشح می‌کنند که از عفونت‌های ایجاد شده توسط ارگانیسم‌های بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. هدف از این مطالعه ارزیابی اثر بازدارندگی CFS لاکتو باسیلوس کازئی ۱۶۰۸:PTCC بر روی تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا ۱۴۳۰:PTCC 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 میکرودايلویشن و طبق استاندارد CLSI ارزیابی شد. در نهایت توانایی تولید بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در حضور CFS لاکتوباسیلوس کازئی به صورت 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 $\mu\text{l/ml}$ می‌باشد. علاوه بر این، در حضور CFS لاکتوباسیلوس تولید بیوفیلم در غلظت‌های MIC به میزان $87 \pm 2/6$ درصد مهار شده و در غلظت‌های Sub-MIC نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای مهار شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این پژوهش، CFS لاکتوباسیلوس کازئی اثر کشندگی چشم‌گیری روی بیوفیلم باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا دارد. بنابراین، به نظر 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

هم‌چنین، مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در سوبه‌های 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 می‌دهد [۴]. به دنبال استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت زیاد سودوموناس آئروژینوزا به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و ایجاد مقاومت چندگانه و هم‌چنین هزینه بالا و عوارض این داروها راه‌کارهای جدیدی برای مقابله با این باکتری ضروری به نظر می‌رسد که یکی از آن‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها می‌باشد؛ این باکتری‌ها با وجود طیف عملکرد وسیع بر علیه باکتری‌های بیماری‌زا برای میزبان یک فلور کاملاً 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 [۵-۸]. بنابراین، می‌توان درمان با واسطه میکروبی را یک روش درمانی جدید و کارآمد 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

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 سیستمیک فیبروزیس و بیماران دارای سوختگی شدید ۵۰ درصد است [۲،۳]. 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 زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه الزهراء (س)،

تهران

* نشانی نویسنده مسئول:

تهران، خیابان ونک، دانشگاه الزهراء، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

دورنویس: ۰۲۱۸۸۰۵۸۹۱

تلفن: ۰۲۱۸۸۰۵۲۷۰۹

پست الکترونیک: rkasra@yahoo.com

تاریخ پذیرش نهایی: ۹۲/۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸

($30\mu\text{g}$)، کلرامفنیکل ($30\mu\text{g}$)، سفتریاکسون ($30\mu\text{g}$) 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 میکروارگانسیم 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 $\text{pH}=7/5$) تحت شرایط میکروآتروفیل کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت حاصله در 15000 rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و قسمت شناور (مایع رویی) حاصله با فیلتر غشائی ($0/45\ \mu\text{m}$) میلی پور استریل شد. هم‌چنین میزان pH آن اندازه‌گیری شد که $3/97$ بود [۱۶].

تعیین اثر CFS لاکتوباسیلوس به روش چاهک پلیت: سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از سودوموناس آتروژنیوزا تهیه شد و با استفاده از سواب استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس، با پی‌پت پاستور استریل بر روی محیط مذکور چاهک‌هایی به قطر ۶ میلی‌متر ایجاد شد. با $100\ \mu\text{l}$ از غلظت‌های ۵۰، ۱۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از CFS لاکتوباسیلوس به چاهک‌ها ریخته شد و هم‌چنین $100\ \mu\text{l}$ از محیط کشت Mann Rogosa Sharpe Broth به‌عنوان شاهد منفی در یکی از چاهک‌ها ریخته شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°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) به روش برات میکروداپلوشن: 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 هیتون برات تهیه شد که از دامنه غلظت ۲۵۶ تا $0/125$ برای آزیترومایسین و سیپروفلوکساسین و ۲۵۰ تا $0/12$ برای CFS لاکتوباسیلوس استفاده گردید. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف مواد ضد میکروبی به هر چاهک انتقال داده شد. در ادامه به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری اضافه گردید. در نهایت غلظت نهایی باکتری در هر چاهک به میزان $10^6 \times (1-0/5)$ رسید. پلیت‌های میکروتیتر، برای

تولید می‌کنند؛ این مواد به صورت عمده به بخش شناور فاقد سلول این پروبیوتیک‌ها ترشح می‌شوند [۱۰، ۹]. یکی از مهمترین پروبیوتیک‌ها لاکتوباسیلوس کازئی است که از گستردگی زیادی برخوردار است [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 تقلب شدن پروتئین‌ها می‌گردند [۱۲]. هم‌چنین، لاکتوباسیلوس‌ها در حضور اکسیژن تولید H_2O_2 می‌کنند که اثر ضد میکروبی آن به علت تقلب 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 بیوفلم حاصل از آنها جالب و بررسی آنها ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به اهمیت سودوموناس آتروژنیوزا 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 آتروژنیوزا جلوگیری از رشد و بیماری‌زایی و هم‌چنین تولید بیوفلم در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

باکتری و محیط کشت: تمام آزمایش‌ها بر روی سویه‌های استاندارد سودوموناس آتروژنیوزا $\text{PTCC}: 1430$ و لاکتوباسیلوس کازئی $\text{PTCC}: 1608$ انجام گرفت که به صورت لیوفیلیزه از مرکز کلکسیون فارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران تهیه شدند. سودوموناس آتروژنیوزا در محیط کشت نوترینت برات (مرک، آلمان) در 37°C به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوازی کشت و گرم‌خانه‌گذاری شد. هم‌چنین، لاکتوباسیلوس کازئی در محیط Mann Rogosa Sharpe Broth (مرک، آلمان) در 37°C به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآتروفیل در جار بی‌هوازی گرم‌خانه‌گذاری شد.

تعیین حساسیت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار از دیسک در آگار تست: حساسیت آنتی‌بیوتیکی میکروارگانسیم‌های مورد استفاده در این تحقیق با ۹ دیسک آنتی‌بیوتیک شامل آزیترومایسین ($10\ \mu\text{g}$)، ایمپنم ($10\ \mu\text{g}$)، جنتامایسین ($10\ \mu\text{g}$)، سیپروفلوکساسین ($5\ \mu\text{g}$)، آمیکاسین ($30\ \mu\text{g}$)، تویرامایسین ($10\ \mu\text{g}$)، سفنازیدیم

Technology Inc., USA)، مقدار جذب رنگ موجود در هر چاهک در ۶۵۰ نانومتر خوانده شد و درصد مهار تشکیل بیوفیلم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد: $\{100 \times OD_{650} \text{ مربوط به کنترل مثبت } / OD_{650} \text{ مربوط به بیوساید}\} - 100 =$ 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 $\alpha=0/05$ 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 آنتی‌بیوتیک‌های مختلف به‌روش انتشار در آگار تعیین گردید که به‌ترتیب سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های آزیترومایسین و کلرامفنیکل و لاکتوباسیلوس کازئی نسبت به آنتی-بیوتیک‌های ای‌بی‌پنم، آمیکاسین، تورامایسین و جنتامایسین مقاومت نشان دادند (جدول شماره ۱). در این پژوهش اثر آنتاگونیستی CFS لاکتوباسیلوس کازئی بررسی گردید: قطر هاله عدم رشد مثبت و توسط نرم‌افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ آنالیز گردید که نشان دهنده اثر معنی‌دار ($P=0/003$) 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 و ۰/۲۵ 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 ۶۲/۵ بود.

تشکیل بیوفیلم در CFS لاکتوباسیلوس کازئی: این آزمایش سه بار تکرار شد که بعد از خوانده شدن نتایج کدورت سنجی با دستگاه خواننده الیزا، میانگین اعداد و انحراف معیار مربوط به کدورت (Turbidity) محیط کشت باکتری سودوموناس آئروژینوزا در حضور غلظت‌های مختلف از CFS لاکتوباسیلوس در طول موج ۶۵۰ 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 بیوفیلم 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

جلوگیری از تبخیر درون پلاستیکی قرار داده شده و به‌مدت ۲۴ ساعت در 37°C گرم‌خانه‌گذاری شد. از روش‌های پیشنهادی طبق دستور العمل CLSI برای تعیین حساسیت میکروب‌های مورد مطالعه استفاده شد [۱۴].

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 ۲۴ 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 سودوموناس 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 ۲۴ ساعت در دمای 37°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 ۶۲۵ نانومتر به‌دست آید. ابتدا ۱۰۰ μl از هرکدام از رقت‌های مواد ضد میکروبی به هر چاهک پلیت میکروتیتر افزوده شد، سپس ۱۰۰ μl 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 ۲۰۰ μl محیط کشت TSB + ۰/۲ درصد گلوکز و به چاهک کنترل مثبت ۲۰۰ μl از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت اضافه شد که معیار کنترل تشکیل بیوفیلم می‌باشد. حجم کلی هر چاهک ۲۰۰ μl بود. پلیت‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرم‌خانه‌گذاری شدند. پس از طی دوره گرم‌خانه‌گذاری، محتوی چاهک‌ها به‌دقت و به‌وسیله سمپلرهای استریل اسپره گردید. به‌منظور جدا شدن باکتری‌های متصل نشده، هر چاهک ۲-۳ مرتبه با ۲۰۰ μl بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله بعد، ۱۵۰ μl متانول مطلق (مرک، آلمان) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه متانول شستشو داده شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ μl 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 ۱۵۰ μl اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد (مرک، آلمان) افزوده شد و با استفاده از دستگاه خواننده الیزا (statfax-2100, Awareness)

استفاده شد که اثر بازدارندگی روی بیوفیلم نداشته و اختلاف آنها کاملاً معنی‌دار است. با افزایش غلظت عصاره گیاه میزان بازدارندگی به صورت معنی‌داری ($P=0/001$) افزایش پیدا کرد. نتایج نشان دادند که تولید بیوفیلم در حضور CFS لاکتوباسیلوس در غلظت برابر MIC $87 \pm 2/6$ درصد مهار می‌شود، هم‌چنین غلظت‌های کمتر از غلظت MIC این عصاره نیز به مقدار چشم‌گیری تشکیل بیوفیلم را کاهش می‌دهند (شکل‌های شماره ۱ و ۲).

وجود CFS لاکتوباسیلوس و عدم وجود آن (کنترل مثبت) کاملاً معنی‌دار بود ($P=0/001$) (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 غلظت‌های میکرولیتر آن تشکیل بیوفیلم، به طرز چشم‌گیری کاهش می‌یابد. در مقایسه با آن از شاهد (Mann Rogosa Sharpe Broth)

جدول شماره ۱- الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی باکتری‌ها به روش انتشار از دیسک در آگار

آزیترومایسین (۱۵µg)	سیپروفلوکساسین (۵µg)	جتنامایسین (۱۰µg)	سفتازیدیم (۳۰µg)	توبرامایسین (۱۰µg)	آمی‌کاسین (۳۰µg)	سفتریاکسون (۳۰µg)	کلرامفنیکل (۳۰µg)	ایمی پنم (۱۰µg)	آنتی بیوتیک Conc. (ug.disc) نوع باکتری
R	S	S	S	S	S	S	R	S	سودوموناس آنروژینوزا PTCC: ۱۴۳۰
S	S	R	S	R	R	S	S	R	لاکتوباسیلوس کازئی PTCC: ۱۶۰۸

R- مقاوم، S- حساس، I- نیمه حساس

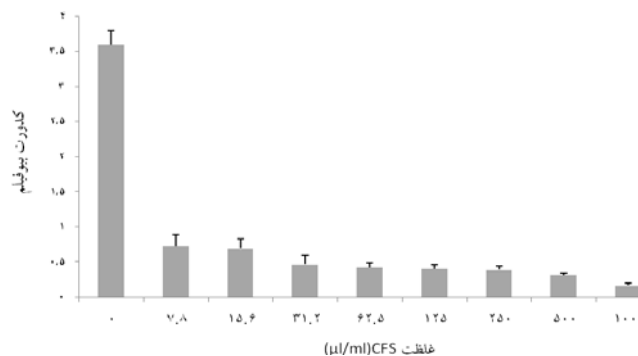
جدول شماره ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری سودوموناس آنروژینوزا با غلظت‌های مختلف CFS لاکتوباسیلوس کازئی

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

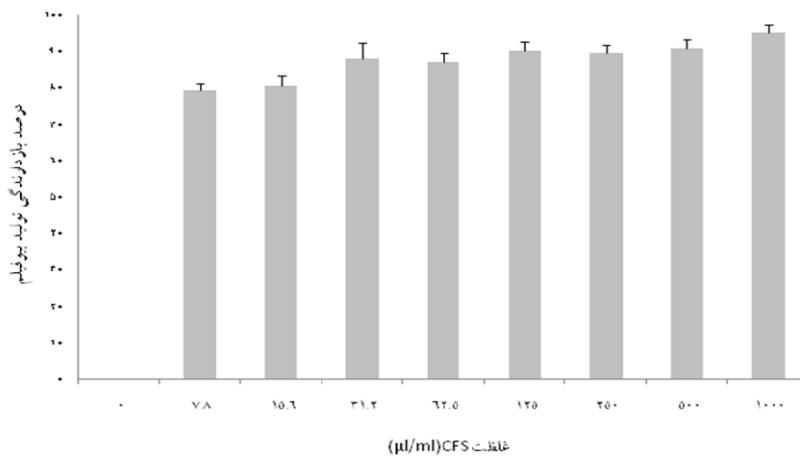
نتایج به صورت (میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار) گزارش شده است. قطر ۶ mm برابر قطر هر چاهک است.

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

P	۱۰۰۰	۵۰۰	۲۵۰	۱۲۵	۶۲/۵	۳۱/۲	۱۵/۶	۷/۸	غلظت CFS (µl/ml) کنترل مثبت سویه لاکتوباسیلوس
<0/0001	۹۵/۲±۲	۹۰/۷±۲/۵	۸۹/۵±۲/۱	۹۰/۱±۲/۴	۸۷±۲/۶	۸۷/۷±۳/۹	۸۰/۵۶±۲/۶	۷۹/۲±۱/۹	L. casei PTCC: ۱۶۰۸



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



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 به نظر 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 لاکتوباسیلوس کازئی 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 به صورت چشم‌گیری افزایش داشت؛ به طوری که در غلظت برابر MIC $87 \pm 2/6$ 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 به عنوان یک ماده پیش‌گیرنده و کنترل‌کننده عفونت استفاده کرد. با نگاهی به تاریخچه‌ی بررسی‌های انجام شده در این زمینه، نتایج به دست 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 بروی 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 چسبندگی 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 LCF 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 به دست آمد [۶]. Valdez و Peral اثر بازدارندگی لاکتوباسیلوس پلاتاروم را بر روی فعالیت بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا جداسازی شده از زخم مورد بررسی قراردادند و نتایج حاکی از این بود که لاکتوباسیلوس پلاتاروم 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 [۲۴] که نتایج

روی باکتری‌های بیماری‌زا به‌خصوص سودوموناس آئروژینوزا دارای اثر ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی بوده‌اند که می‌توان یکی از دلایل این بازدارندگی را وجود ترکیبات ضد میکروبی ترشح شده از لاکتوباسیلوس دانست که تا حد زیادی مانع اتصال باکتری به سطوح و تشکیل بیوفیلم می‌شوند و البته تفاوت‌های مربوط به نتایج هم به دلیل 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 می‌نمایم. 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 hospital-acquired 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.

این پژوهش با مطالعه حاضر از لحاظ بازدارندگی 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 ویروانس برخی بیماری‌ها مانند سودوموناس آئروژینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس توسط Iordache و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. آنها نشان دادند که آنزیم‌های لیپاز، کازیناز، ژلاتیناز و آمیلاز و لکتیناز در حضور بخش شناور فاقد سلول پروبیوتیک‌ها به شکل معنی‌داری کاهش پیدا می‌کنند [۲۵]. در مطالعه حاضر نیز فاکتور ویروانسی 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 کاتر بیمارار 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 پلانٹاروم 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

[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.

- [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 decontaminant. *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, Gobetti 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] Nitisingprasert 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, Nosedá 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.