

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 CLSI 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

فعالیت ضد بیوفیلمی بخش شناور فاقد سلول لاكتوباسیلوس کازئی در سودوموناس آنروژینوزا

سرگل امین نژاد^۱، روح‌الله کسری کرمانشاهی^{۲*}

خلاصه:

سابقه و هدف: سودوموناس آنروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب و مهم با توانایی تولید بیوفیلم است. بیوفیلم سودوموناس آنروژینوزا به طور ذاتی در مقابل عوامل ضد میکروبی مقاوم است و در شرایط مختلف مشکلات زیادی در خدمات بهداشتی ایجاد می‌کند. لاكتوباسیلوس‌ها 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 لاكتوباسیلوس کازئی PTCC:۱۶۰۸ بر روی تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آنروژینوزا PTCC: ۱۴۳۰ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی بخش شناور فاقد سلول لاكتوباسیلوس با سانتریفیوژ جداسازی شد. خاصیت ضد میکروبی CFS لاكتوباسیلوس 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 آنروژینوزا در حضور CFS لاكتوباسیلوس کازئی به صورت درصد با استفاده از روش میکروتیتر پلیت اصلاح شده تعیین گردید.

نتایج: CFS لاكتوباسیلوس کازئی اثرات موثری روی باکتری مورد آزمایش دارد که MIC و MBC آن $62/5 \mu\text{g}/\text{ml}$ می‌باشد. علاوه بر این، در حضور CFS لاكتوباسیلوس تولید بیوفیلم در غلظت‌های MIC بهمیزان $87 \pm 2/6$ درصد مهار شده و در غلظت‌های Sub-MIC نیز به صورت قابل ملاحظه‌ای مهار شد.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌های این پژوهش، CFS لاكتوباسیلوس کازئی اثر کشنده‌گی چشم‌گیری روی بیوفیلم باکتریایی سودوموناس آنروژینوزا دارد. بنابراین، به نظر می‌رسد که این ماده طبیعی می‌تواند عامل امید بخشی در درمان عفونت‌های سودوموناسی باشد.

واژگان کلیدی: سودوموناس آنروژینوزا، لاكتوباسیلوس کازئی، MIC، MBC، بیوفیلم

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

هم‌چنین، مقاومت زیادی نسبت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در سویه‌های آن گزارش گردیده است. در این میان بیوفیلم نقش مهمی در بیماری‌زای باکتری سودوموناس آنروژینوزا ایفا می‌کند از جمله با افزایش تراکم آنتی‌بیوتیکی لازم برای کشنن باکتری‌های بیوفیلمی نسبت به پلانکتونیک مقاومت بیوسایدی این باکتری را افزایش می‌دهد [۴]. بدنبال استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت زیاد سودوموناس آنروژینوزا 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 لاكتیک از معمول‌ترین انواع باکتری‌ها هستند که به عنوان پروبیوتیک کاربرد دارند و مواد ضد میکروبی متعددی را از جمله اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، اسیدهای چرب و ترکیبات حلقوی

مقدمه
سودوموناس آنروژینوزا 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]. مقاومت‌های شایع ترین 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 آنروژینوزا می‌باشد. میزان مرگ و میر ناشی از این عفونت‌ها در بیماران سلطانی، مبتلایان به ایدز، افراد دارای سیستیک فیبرозیس 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 الزهرا (س)^(s)، تهران

* لشانی نویسنده مسئول؛

تهران، خیابان ونک، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی
تلفن: ۰۲۱۸۸-۵۲۷-۹۰۶۰-۵۸۹۱

پست الکترونیک: rkasra@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸

(۳۰ µg)، کلرامفنیکل (۳۰ µg)، سفترباکسون (۳۰ µg) 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 فارلنند روی آن کشت داده شده است، قرار داده می شود و بعد از گرم خانه گذاری 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 [۱۴، ۱۵].

تهیه قسمت شناور فاقد سلول لاکتوپاسیلوس (CFS): در این روش لاکتوپاسیلوس کائزی در محیط Mann Rogosa pH ۷/۵ (با pH ۷/۵) تحت شرایط میکروآئروفیل کشت داده شد. بعد از ۴۸ ساعت محیط کشت حاصله در ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ و قسمت شناور (مایع رویی) حاصله با فیلتر غشائی (۰/۴۵ µm) میلی پور استریل شد. همچنان میزان pH آن اندازه گیری شد که ۳/۹۷ بود [۱۶].

تعیین اثر CFS لاکتوپاسیلوس به روش چاهک پلیت: سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلنند از سودوموناس آئروژینوزا تهیه شد و با استفاده از سواپ استریل بر روی محیط کشت مولر هیتون آگار (مرک، آلمان) به صورت چمنی کشت داده شد. سپس، با پی پت پاستور استریل بر روی محیط مذکور چاهک هایی به قطر ۶ میلی متر ایجاد شد. و ۱ml از غلظت های ۱۰^۰، ۱۰^۱ و ۱۰۰ میکرولیتر بر میلی لیتر از CFS لاکتوپاسیلوس به چاهک ها ریخته شد و همچنان ۱ml از محیط کشت Mann Rogosa Sharpe Broth به عنوان شاهد منفی در یکی از چاهک ها ریخته شد. پلیت ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C گرم خانه گذاری شدند. نتایج حاصل از روی وجود یا عدم وجود قطر هاله عدم رشد تشخیص داده شد و اندازه گیری با کولیس انجام گردید، هم چنان آزمایش سه بار تکرار شد و میانگین و انحراف معیار محاسبه گردید [۱۷].

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) به روش برات میکرودایلوشن: در این روش از پلیت های ۹۶ چاهکی Greiner bio-one (آلمان) استفاده شد. غلظت های مورد نظر از مواد ضد میکروبی با استفاده از محیط کشت مولر هیتون برات تهیه شد که از دامنه غلظت ۲۵۶ تا ۱/۲۵۰ برای آزیتروماسین و سپروفلوكسازین و ۲۵۰ تا ۰/۱۲ برای CFS لاکتوپاسیلوس استفاده گردید. سپس، ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت های 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 CFU/ml (۰/۵-۱۰/۶) رسید. پلیت های میکروپلیت، برای

تولید می کنند؛ این مواد به صورت عمده به بخش شناور فاقد سلول این پروپیوتیک ها ترشح می شوند [۱۰، ۹]. یکی از مهمترین پروپیوتیک ها لاکتوپاسیلوس کائزی است که از گستردگی زیادی برخوردار است [۱۱]. ترکیبات ضد میکروبی ترشح شده توسط لاکتوپاسیلوس ها مکانیسم های اثر مختلفی دارند که از جمله آن می توان به نقش اسیدهای آلی اشاره کرد. این مواد باعث اختلاف در شبکه کلتروشیمیابی پروتون و تغییر در نفوذ پذیری غشاء می شوند، همچنان باعث افزایش اسیدیته داخل سلولی و تقلیب شدن پروتئین ها می گردد [۱۲]. همچنان، لاکتوپاسیلوس ها در حضور اکسیژن تولید H₂O₂ می کنند که اثر ضد میکروبی آن به علت تقلیب کردن تعدادی از آنزیم ها، پراکسیداسیون لیپیدهای غشایی و افزایش نفوذ پذیری غشاء ناشی از آن و همچنان تولید رادیکال های آزاد ضد میکروبی می باشد [۱۳]. بنا به آنچه گفته شد، استفاده از پروپیوتیک ها در درمان عفونت های باکتریابی و بیوفیلم حاصل از آنها جالب و بررسی آنها ضروری به نظر می رسد. با توجه به اهمیت سودوموناس آئروژینوزا در ایجاد عفونت های بیمارستانی و افزایش روزافزون مقاومت آنتی بیوتیکی این باکتری، شناسایی و بررسی روش های درمانی جدید و جایگزین الزامي است که این مطالعه نیز با هدف بررسی اثر ضد میکروبی بخش شناور فاقد سلول لاکتوپاسیلوس کائزی بر روی سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری از رشد و بیماری زایی و همچنان تولید بیوفیلم در این باکتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش ها

باکتری و محیط کشت: تمام آزمایش ها بر روی سویه های استاندارد سودوموناس آئروژینوزا ۱۴۳۰ و لاکتوپاسیلوس کائزی PTCC: ۱۶۰۸ انجام گرفت که به صورت لیوفلیزه از مرکز کلکسیون قارچ ها و باکتری های صنعتی ایران تهیه شدند. سودوموناس آئروژینوزا در محیط کشت نوتریت برات (مرک، آلمان) در ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت در شرایط هوایی کشت و گرم خانه گذاری شد. همچنان، لاکتوپاسیلوس کائزی در محیط Mann Rogosa Sharpe Broth (مرک، آلمان) در ۳۷°C به مدت ۴۸ ساعت در شرایط میکروآئروفیل در جار بی هوایی گرم خانه گذاری شد.

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی به روش انتشار از دیسک در آگار تست: حساسیت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم های مورد استفاده در این تحقیق با ۹ دیسک آنتی بیوتیک شامل آزیتروماسین (۰/۱۵ µg)، ایمی پنم (۱۰ µg)، جنتامایسین (۱۰ µg)، سپروفلوكسازین (۰/۵ µg)، آمیکاسین (۳۰ µg)، توبرامایسین (۱۰ µg)، سفتارامایسین (۳۰ µg)

Technology Inc., USA) چاهک در ۶۵۰ نانومتر خوانده شد و درصد مهار تشکیل بیوفیلم با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد: $\{ \times 100 \} \times OD_{650}$ 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 معنی دار بودن تفاوت‌ها با $a=0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت. کل مطالعات آماری (Graph pad Prism نسخه ۵ Graph Pad Prism Software Inc, San Deigo, USA)

نتایج

حساسیت سودوموناس آئروژینوزا و لاکتوپاسیلوس کازئی نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف به روش انتشار در آگار تعیین گردید که به ترتیب سودوموناس آئروژینوزا نسبت به آنتی بیوتیک‌های آزیترومایسین و کلرامفینیکل و لاکتوپاسیلوس کازئی نسبت به آنتی بیوتیک‌های ایمی پن، آمیکاسین، توبرامایسین و جنتامایسین مقاومت CFS نشان دادند (جدول شماره ۱). در این پژوهش اثر آنتاگونیستی لاکتوپاسیلوس کازئی بررسی گردید: قطر هاله عدم رشد ثبت و توسط نرم افزار Graph Pad Prism نسخه ۵ آنالیز گردید که نشان دهنده اثر معنی دار ($P=0.003$) این ماده بر روی رشد باکتری سودوموناس آئروژینوزا بوده است (جدول شماره ۲). حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC) برای آزیترومایسین و سپرروفلوکسازین به ترتیب برابر ۱۲۸ و همچنین حداقل غلظت کشنندگی (MBC) برای آنها به ترتیب ۱۲۸ و ۵ بود و این در حالی است که MIC و MBC برای CFS لاکتوپاسیلوس کازئی در برابر سودوموناس آئروژینوزا یکسان و برابر ۶۲/۵ بود.

تشکیل بیوفیلم در CFS لاکتوپاسیلوس 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 لاکتوپاسیلوس در طول موج ۶۵۰ nm محسوبه گردید و کدورت محیط کشت باکتری بدون وجود CFS لاکتوپاسیلوس به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد (شکل شماره ۱). درصد بازدارندگی تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا توسط غلظت‌های مختلف CFS لاکتوپاسیلوس کازئی و کنترل مثبت و همچنین انحراف معیار مربوط به آنها نیز به دست آمد که اختلاف بازدارندگی در صورت

جلوگیری از تبخیر درون پلاستیکی قرار داده شده و به مدت ۲۴ ساعت در 37°C گرمخانه گذاری 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 به روش کشت بر محیط جامد: برای تعیین MBC یک لوب از چاهک‌هایی که قادر کدورت بودند و همچنین چاهک‌های کنترل مثبت و منفی بر سطح محیط نوتریمنت 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 لاکتوپاسیلوس 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) به علاوه $0.2\text{ }\mu\text{g}$ درصد گلوكز (مرک، آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C کشت داده شد و از تک کلونی‌های رشد یافته روی این محیط، به محیط $0.2\text{ }\mu\text{g}$ Trypticase soy Broth (مرک، آلمان) تلقیح شد تا سوسپانسیونی با جذب نوری معادل 0.1 در طول موج ۶۲۵ نانومتر به دست آید. ابتدا 1 ml از هر کدام از رقت‌های مواد ضد میکروبی به هر چاهک پلیت میکروتیتر افزوده شد، سپس 1 ml از سوسپانسیون باکتری و محیط کشت به هر چاهک اضافه گردید. دامنه غلظت برای لاکتوپاسیلوس $7/8$ (Mann Rogosa Sharpe Broth (Rogosa-Sharpe) بود. به چاهک کنترل منفی 1 ml محیط کشت $0.2\text{ }\mu\text{g}$ TSB + گلوكز و به چاهک کنترل مثبت 1 ml از سوسپانسیون میکروبی و محیط کشت اضافه شد که معیار کنترل تشکیل بیوفیلم می‌باشد. حجم کلی هر چاهک 1 ml بود. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای 37°C گرمخانه گذاری شدند. پس از طی دوره گرمخانه گذاری، محتوی چاهک‌ها بدقت و به وسیله سپلیرهای استریل آسپیره گردید. به منظور جدا شدن باکتری‌های متصل نشده، هر چاهک ۲-۳ مرتبه با 1 ml $200\text{ }\mu\text{l}$ بافر PBS استریل شستشو داده شد. در مرحله بعد، 1 ml $150\text{ }\mu\text{l}$ متابول مطلق (مرک، آلمان) به هر چاهک اضافه شد و پس از ۱۰ دقیقه متابول شستشو داده شد. سپس به هر چاهک 1 ml 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 1 ml اسید استیک گلاسیال $33\text{ }\mu\text{l}$ درصد (مرک، آلمان) افزوده شد و با استفاده از دستگاه خواننده الایزا statfax-2100, Awareness از خشک شدن پلیت در مجاورت هوا، به هر چاهک 1 ml اسید استیک گلاسیال $33\text{ }\mu\text{l}$ درصد (مرک، آلمان) افزوده شد و با

استفاده شد که اثر بازدارندگی روی بیوفیلم نداشته و اختلاف آنها کاملاً معنی دار است. با افزایش غلظت عصاره گیاه میزان بازدارندگی به صورت معنی داری ($P=0.001$) افزایش پیدا کرد. نتایج نشان دادند که تولید بیوفیلم در حضور CFS لاکتوباسیلوس در غلظت برابر MIC 87 ± 2.6 درصد مهار می شود، همچنین غلظت های کمتر از غلظت MIC این عصاره نیز به مقدار چشم گیری تشکیل بیوفیلم را کاهش می دهند (شکل های شماره ۱ و ۲).

وجود CFS لاکتوباسیلوس و عدم وجود آن (کنترل مثبت) کاملاً معنی دار بود ($P=0.001$) (جدول شماره ۳). همان گونه 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 میکروولیتر آن تشکیل بیوفیلم، به طرز چشم گیری کاهش می یابد. در مقایسه با آن از شاهد (Mann Rogosa Sharpe Broth) در میزان قابل توجهی بر تشکیل بیوفیلم اثر دارد و در حضور غلظت های میکروولیتر آن تشکیل بیوفیلم، به طرز چشم گیری کاهش می یابد.

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

| | | | | | | | | | | آنتی بیوتیک |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---------------------------------|
| | | | | | | | | | | Conc. (ug/disc) |
| | | | | | | | | | | نوع باکتری |
| R | S | S | S | S | S | S | S | R | S | سودوموناس آئروژینوزا PTCC: ۱۴۳۰ |
| S | S | R | S | R | R | S | S | R | R | لاکتوباسیلوس کازئی PTCC: ۱۶۰۸ |

- مقاوم، S- حساس، I- نیمه حساس

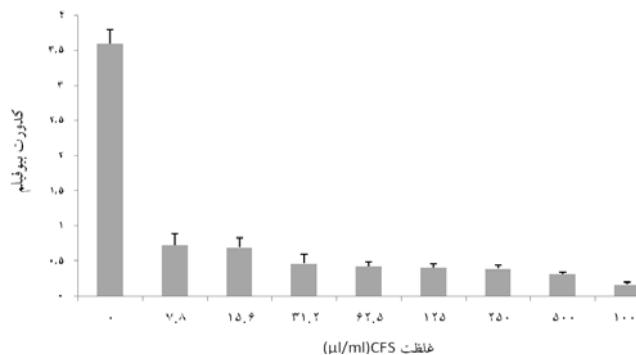
جدول شماره ۲- میانگین قطر هاله عدم رشد در باکتری سودوموناس آئروژینوزا با غلظت های مختلف CFS لاکتوباسیلوس کازئی

| غلظت از شاهد(-) (MRS Broth) | غلظت های مختلف (CFS) | | |
|-----------------------------------|---|---------|-----|
| | قطر هاله عدم باکتری سودوموناس آئروژینوزا | ۱۰۰ | ۵۰ |
| ۶±۰ | ۲۰/۳۳±۰/۰۷ | ۱۴±۰/۷۰ | ۶±۰ |

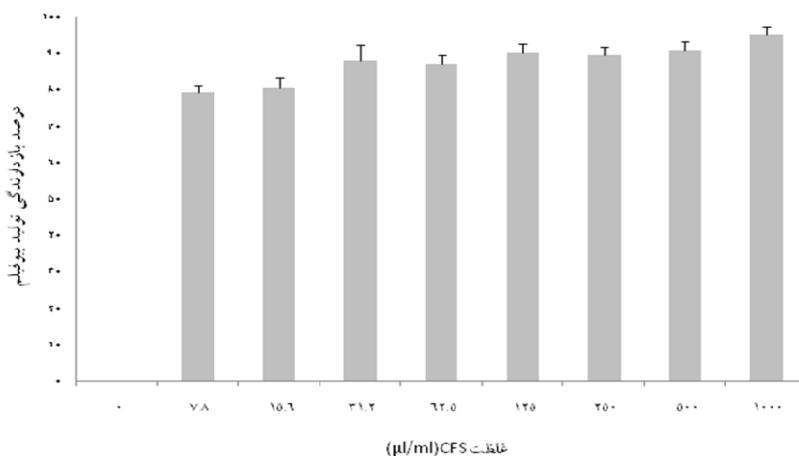
نتایج به صورت (میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار) گزارش شده است. قطر ۶ mm برابر قطر هر چاهک است.

جدول شماره ۳- درصد بازدارندگی تولید بیوفیلم غلظت های مختلف از بخش شناور فاقد سلول گونه لاکتوباسیلوس کازئی بر حسب سودوموناس آئروژینوزا (میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار)

| P | غلظت CFS | | | | | | | | | |
|---------|------------|--|----------|----------|--------|----------|-----------|----------|---|------------------------|
| | کنترل مثبت | سویه لاکتوباسیلوس ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | |
| <0.0001 | ۹۵/۲±۲ | ۹۰/۷±۲/۰ | ۸۹/۰±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 غلظت های مختلف CFS لاکتوباسیلوس کازئی بر میزان کدورت بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در OD برابر ۶۵۰ nm (میانگین سه بار تکرار ± انحراف معیار)



شکل شماره ۲- درصد بازدارندگی تولید بیوفیلم در سودوموناس آنروژینوزا توسط غلاظت‌های مختلف CFS لاكتوباسیلوس کازئی (میانگین سه بار تکرار \pm انحراف معیار)

Coconnier و همکاران نشان دادند که لاكتوباسیلوس اسیدو-فیلوس دارای اثر بازدارندگی رشد برومو باکتری‌های بیماری‌زای مختلف دستگاه ادراری و واژن از جمله سودوموناس آنروژینوزا 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 لاكتوباسیلوس کازئی باعث کاهش میزان رشد، تشکیل بیوفیلم و در نتیجه چسبندگی سودوموناس آنروژینوزا شد. Forestier و همکارانش نشان دادند که تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای جداسازی شده از نمونه‌های بالینی از جمله سودوموناس آنروژینوزا در اثر مجاورت با گونه‌های لاكتوباسیلوس کازئی رامتوسوس سویه Lcr به شکل معنی‌داری چهار کاهش رشد شده و تعداد کلونی‌های آنها کاهش پیدا کرده است [۲۳]. جمالی فر و همکاران نیز با استفاده از روش چاهک پلت باکتری‌های لاكتیک جدا شده از منابع مختلف را بر روی سودوموناس آنروژینوزا بالینی با مقامات آنتی‌بیوتیکی چندگانه تاثیر داده و اثر بازدارندگی قابل توجهی را مشاهده کرده‌اند که با وجود تفاوت گونه‌های باکتری‌ای اسید لاكتیک این پژوهش با مطالعه حاضر نتایج مشابهی به دست آمد [۶]. Peral و Valdez پلاتارتروم را بر روی فعالیت بیماری‌زایی سودوموناس آنروژینوزا جداسازی شده از زخم مورد بررسی قراردادند و نتایج حاکی از این بود که لاكتوباسیلوس پلاتارتروم بر تولید علائم ملکولی هموسرین لاكتون، تولید آنزیم الاستاز و بیوفیلم اثر بازدارندگی دارد. هم‌چنین، موش‌های دارای عفونت سوختگی با سودوموناس آنروژینوزا که با این لاكتوباسیلوس تیمار شده بودند بهبود سریع‌تری را نسبت به موش‌های شاهد نشان دادند [۲۴] که نتایج

بحث

سودوموناس آنروژینوزا 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 لاكتوباسیلوس کازئی خاصیت ضد میکروبی شدیدی بر علیه سودوموناس آنروژینوزا دارد و غلاظت‌های MIC و MBC آن بسیار پایین و یکسان می‌باشد که این نشان‌دهنده موثر بودن این ماده ضد میکروبی در بازدارندگی و کشنندگی این باکتری می‌باشد. هم‌چنین، CFS لاكتوباسیلوس کازئی دارای قابلیت بسیار بالای در مهار بیوفیلم بود و نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش غلاظت ماده ضد میکروبی میزان بازدارندگی به صورت چشم‌گیری افزایش داشت؛ بدطوری که در غلاظت برابر $87 \pm 2/6$ MIC درصد مهار می‌شود و هم‌چنین CFS لاكتوباسیلوس کازئی در غلاظت‌های 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 تاریخچه برسی‌های انجام شده در این زمینه، نتایج به دست آمده توسط سایر همکاران، مؤید بررسی حاضر است. چنانچه در سال ۱۹۹۷،

روی باکتری‌های بیماری‌زا بهخصوص سودوموناس آنروژینوزا 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 تاحد زیادی مانع اتصال باکتری به سطوح و تشکیل بیوفیلم می‌شوند و البته تفاوت‌های مربوط به نتایج هم بدلیل اختلاف در نوع سویه‌های لاکتوباسیلوس، تفاوت در نوع سویه‌های سودوموناس آنروژینوزا که در اکثر موارد بالینی بوده است و همچنان مربوط به نوع روش ارزیابی خاصیت ضد میکروبی لاکتوباسیلوس‌ها بوده است.

نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر به خوبی نشان داد که لاکتوباسیلوس کازئی دارای فعالیت آنتاگونیستی و ضد بیوفیلمی قوی بر علیه سودوموناس آنروژینوزا 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 تشكیر می‌نماییم. هم‌چنین، از مشغول آزمایشگاه میکروب شناسی این دانشگاه سرکار خانم عنذرًا 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, Flitman 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.
- [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.

این پژوهش با مطالعه حاضر از لحاظ بازدارنگی تولید بیوفیلم سودوموناس آنروژینوزا 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 آنروژینوزا و استافیلکوکوس اورئوس توسط Iordache و همکارانش مورد بررسی قرار گرفت. آنها نشان دادند که آنزیم‌های لپاز، کازئیناز، ژلاتیناز و آمیاز و لکتیاز در حضور بخش شناور فاقد سلول پروپیوتیک‌ها به شکل معنی‌داری کاهش پیدا می‌کنند [25]. 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. به علاوه، بیان شده است که باکتریوسبین 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 [26]. نشان داده شده است که بخش شناور فاقد سلول (CFS) لاکتوباسیلوس پلاتاتروم دارای قابلیت ضد میکروبی بسیار زیادی بر علیه سودوموناس آنروژینوزا بالینی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالا است و توانایی چسبندگی و تشکیل بیوفیلم و هم‌چنین بیان عالم سیستم تنظیمی حد نصاب احساس (Quorum sensing) و قابلیت بیماری‌زا این بینی بیماری‌زا را تا حد زیادی کاهش می‌دهد و باعث بهبود سریع زخم می‌شود [27]. نتایج به دست آمده در این تحقیق و هم‌چنین بررسی‌های که سایر محققان انجام داده‌اند، نشان‌دهنده این است که انواع مختلف لاکتوباسیلوس‌های به کار رفته در این مطالعات بر

- [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, Cardinale 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 *Escherichia 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; 24(6): 472-9.
- [25] Iordache F, Iordache C, Chifiriu 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.