Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

دانشور پزشکی

دوماهنامه علمی–پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌وپنجم–شماره ۱۳۲
دی ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۸
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۰۹/۲۱
پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸

اثر مخمر پروبیوتیکی ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس

نویسندگان: نوید سعیدی[۱]، پرویز اولیاء[۲]، سید محمود امین مرعشی[۳]، حوریه صادری[۲*]

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

* نویسنده مسئول: حوریه صادری **E-mail: horiehsaderi@gmail.com**

چکیده

مقدمه و هدف: تولید بیوفیلم یک فاکتور بیماری‌زایی مهم در استافیلوکوکوس اورئوس است. اغلب عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم این باکتری به سختی با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شود. تا به حال مکانیسم‌های زیادی برای عملکرد مخمرهای پروبیوتیکی در مقابل عفونت‌های باکتریایی توضیح داده‌شده اما مطالعات کمی در زمینه تأثیر آن‌ها بر تشکیل بیوفیلم انجام شده است. هدف از این تحقیق بررسی اثر مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس بود.

مواد و روش‌ها: از کشت ساکارومایسس سرویزیه عصاره سوپرناتانت و لیزات تهیه شد. پس از تعیین MIC، تأثیر عصاره‌ها با سه غلظت ۵۱۲ µg/ml، ۱۰۲۴ و ۲۰۴۸ بر تشکیل بیوفیلم دوسویه استاندارد باکتری استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 (حساس به متی سیلین) و ATCC 33591 (مقاوم به متی سیلین) به روش میکروتیتر پلیت با سه بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج: هر دو عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر توانستند در تمامی غلظت‌ها تشکیل بیوفیلم دوسویه حساس و مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس را به طور معنی‌داری کاهش دهند ($P<0.001$). درحالی‌که هر دوسویه مورد مطالعه تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند، غلظت ۲۰۴۸ µg/ml سوپرناتانت توانست تشکیل بیوفیلم آن‌ها را به درجه متوسط کاهش دهد. همچنین لیزات به طور مؤثرتری موجب کاهش تشکیل بیوفیلم به درجه ضعیف شد.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه برای اولین بار اثر مطلوب مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر کاهش تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد. با انجام مطالعات بیشتر می‌توان به درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم این باکتری با استفاده از مخمرهای پروبیوتیکی امیدوار بود.

واژگان کلیدی: استافیلوکوکوس اورئوس، بیوفیلم، پروبیوتیک، ساکارومایسس سرویزیه

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

مقدمه

بسیاری از اعضای جنس استافیلوکوکوس می‌توانند ایجاد بیماری کنند، اما میان آن‌ها *استافیلوکوکوس اورئوس* به طور خاص یک پاتوژن محسوب می‌شود (۱). *استافیلوکوکوس اورئوس* یک کوکوس گرم مثبت است که به فراوانی در بینی، دستگاه تنفسی و بر روی پوست یافت می‌شود(۲). این باکتری عامل عفونت‌های کاملاً متفاوتی است. از یکسو عفونت‌های حاد مانند سپتی سمی و آبسه‌های پوستی که عموماً در اثر ترشح اگزوآنزیم‌ها و توکسین‌ها ایجاد می‌شوند و از سوی دیگر عفونت‌های مزمن که در اثر تشکیل بیوفیلم به وجود می‌آیند. بیوفیلم اجتماعی از میکروارگانیسم‌های چسبیده به یکدیگر روی یک سطح هستند که توسط ماتریکس خارج سلولی پلیمری پوشیده شده‌اند. *استافیلوکوکوس اورئوس* قادر است با واسطه بیوفیلم به بافت میزبان مانند استخوان و دریچه‌های قلب و نیز به دستگاه‌های پزشکی تعبیه شونده در بدن مانند کاتتر، مفاصل مصنوعی و دستگاه ضربان‌ساز متصل شود (۳, ٤). استافیلوکوکوس‌ها به عنوان شایع‌ترین عوامل عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم شناخته می‌شوند (۵). بیوفیلم باعث افزایش مقاومت باکتری به مکانیسم‌های دفاعی میزبان شده و همچنین عفونت‌های حاصل از آن به سختی با آنتی‌بیوتیک‌ها درمان می‌شوند. به‌علاوه بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان* یک مخزن انتشار عفونت به سایر نقاط بدن محسوب می‌شود. این مقاومت افزایش‌یافته در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی نقش ویژه‌ای ایفا می‌کند (۵, ٦).

تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس شامل مراحل مختلفی است. پس از اتصال اولیه سلول‌ها بر روی بافت یا سطوح غیرزنده، مرحله تجمع آغاز می‌شود. تجمع و اتصال سلول به سلول می‌تواند به وسیله‌ی انواع مختلفی از مولکول‌ها از قبیل پروتئین‌های چسبنده و یا اگزوپلیمرهای بر پایه‌ی پلی‌ساکارید انجام شود؛ که این مولکول‌ها ماتریکس خارج سلولی پلیمری را ایجاد می‌کنند. ماتریکس بیوفیلم یک چسب پیچیده است که به صورت روکشی همه سلول‌های موجود در ساختار بیوفیلم بالغ را در کنار هم نگهداری می‌کند. در استافیلوکوکوس‌ها، مولکول اصلی مسئول چسبندگی بین سلولی، ادهسین بین سلولی پلی‌ساکاریدی (PIA) است. سنتز PIA توسط لوکوس (icaADBC) میانجی‌گری می‌شود. در برخی از سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس بیوفیلم مستقل از PIA تشکیل می‌شود. پروتئین‌های چسبنده اصلی‌ترین جایگزین برای PIA هستند (۵, ۷).

با توجه به شیوع بالا و دشواری درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*، مطالعه برای یافتن روش‌های نوین برای جلوگیری از تشکیل یا از بین بردن بیوفیلم این باکتری ضروری به نظر می‌رسد. اخیراً استفاده از پروبیوتیک‌ها به عنوان میکروارگانیسم‌های طبیعی و سالم در برابر میکروب‌های مقاوم به آنتی بیوتیک و فاسد کننده غذا به منظور جایگزینی برای آنتی بیوتیک‌ها و مواد نگهدارنده شیمیایی مورد توجه قرار گرفته است (۸). مخمر تک‌سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* از جمله ارگانیسم‌هایی است که بیشترین مطالعات در زمینه ژنتیک و کاربردهای صنعتی بر روی آن انجام شده است. بسیاری از مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اعضای جنس ساکارومایسس می‌توانند دارای خواص ضدمیکروبی و پروبیوتیکی باشند (۹). مکانیسم‌های زیادی برای عملکرد مخمرهای پروبیوتیکی برای حفاظت در مقابل عفونت‌های باکتریایی توضیح داده شده است مانند القا سیستم ایمنی، ممانعت از فعالیت توکسین‌های باکتریایی، تعدیل سیستم‌های ترانسداکشن و مهار تشکیل بیوفیلم (۱۰, ۱۱). هدف از این مطالعه بررسی اثر مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های حساس و مقاوم به متی سیلین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* بود.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورداستفاده: در این مطالعه از سویه بومی ساکارومایسس سرویزیه S3 دارای خاصیت پروبیوتیکی که در مطالعات پیشین در مرکز تحقیقات میکروب‌شناسی مولکولی دانشگاه شاهد جدا شده بود، استفاده گردید. این مخمر در دمای ۷۰- °C در محیط پوتیتو دکستروز براث (PDB) حاوی ۱۵٪ گلیسرول نگهداری می‌شد و برای کشت آن و یا نگهداری در دمای ٤°C از محیط پوتیتو دکستروز آگار (PDA) استفاده گردید. محیط کشت اول از شرکت ایبرسکو ایران و دومی از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. سویه‌های باکتری مورد استفاده استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 (حساس به متی سیلین) و ATCC 33591 (مقاوم به متی سیلین) از دکتر محمد رهبر (دانشگاه علوم پزشکی ایران) گرفته شد که برای رشد آن‌ها از محیط نوترینت آگار و برای نگهداری در دمای ۷۰- °C از محیط نوترینت براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول استفاده شد که هر دو محیط محصول شرکت مرک آلمان بودند.

کشت مخمر: چهار کلنی از مخمر ساکارومایسس سرویزیه S3 به ۲۰ میلی‌لیتر محیط PDB منتقل و به مدت ١٦ ساعت (انتهای فاز لگاریتمی) با دور rpm ۲۳۰ در دمای ۳۰ °C انکوبه گردید. این کشت شبانه برای تلقیح ۱۰۰۰ میلی‌لیتر محیط PDB استفاده شد که در چهار ارلن در حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر تقسیم گردید. ارلن‌ها با دور rpm ۱۲۰ به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه و سپس در دور g ۳۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند تا سوپرناتانت برای تهیه عصاره و رسوب برای تهیه لیزات سلولی تهیه گردد (۱۲).

تهیه عصاره سوپر ناتانت و لیزات مخمر: برای تهیه عصاره سوپرناتانت ساکارومایسس سرویزیه از روشی که قبلاً توسط Krasowska و همکاران شرح داده شده بود با اندکی تغییرات استفاده شد (۱۲). در ابتدا سوپرناتانت به‌دست‌آمده در مرحله قبل از فیلتر µm ۰/۲۲ عبور داده شد و سپس در طی ۳ ساعت با اتیل استات عصاره گیری شد. به این منظور، سوپرناتانت به نسبت ۵ به ۱ با اتیل استات مخلوط و هر نیم ساعت اتیل‌استات تعویض می‌گردید. سپس اتیل استات توسط دستگاه تقطیر در خلأ (Hei-VAP Advantage ML, Heidolph, Germany) حذف و ماده خشک به دست آمد. به طور معمول طی هر بار عصاره گیری از ۱ لیتر کشت، حدود ٤٥ الی ۵۰ میلی‌گرم ماده خشک به دست می‌آمد. با افزودن مقدار مناسب متانول به ماده خشک، عصاره با غلظت ۳۲۷/٦٨mg/ml تهیه شد که به عنوان استوک نگهداری گردید.

برای تهیه لیزات مخمر ساکارومایسس سرویزیه از دستگاه سونیکاتور (Q125 Sonicator, Qsonica, USA) استفاده شد. به‌این‌ترتیب که رسوب مخمر به‌دست‌آمده از مرحله قبل یک بار با آب مقطر استریل شسته شده و مجدداً در آب مقطر حل گردید. سوسپانسیون حاصله به وسیله سونیکاتور در دمای ٤°C لیز شد. هر سیکل سونیکاسیون در طی ۲۰ دقیقه و با برنامه Pulse on ۵۰ ثانیه، Pulse off ۱۰ ثانیه و amplitude ۱۰۰٪ انجام گرفت. در ادامه لیزات به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ٤°C و با دور rpm ۱۵۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس از فیلتر µm ۰/٤٥ عبور داده شد (۱۳). توسط دستگاه تقطیر در خلأ، آب از لیزات حذف و ماده خشک حاصل آمد. به طور میانگین از هر لیتر کشت، حدود ۱۸۰ الی ۲۰۰ میلی‌گرم ماده خشک لیزات به دست می‌آمد. با افزودن مقدار مناسب آب دو بار تقطیر به ماده خشک، استوک لیزات با غلظت ١٦٣/٨٤ mg/ml تهیه گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC): برای تعیین MIC از روش میکرودایلوشن براث در محیط تریپتیک سوی براث (TSB) شرکت مرک آلمان استفاده شد (١٤). با افزودن مقادیر مناسب محیط TSB به عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر غلظت‌های متوالی دوتایی (µg/ml ٦٤، ۱۲۸، ۲۵٦، ۵۱۲، ۱۰۲٤، ۲۰٤۸، ٤۰۳۹، ۸۱۹۲) تهیه و به چاهک‌های میکروپلیت منتقل شد. غلظت باکتری تلقیح شده به هر چاهک برابر با cfu/ml 10^5 بود. چاهک فاقد عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر به

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

عنوان شاهد مثبت و چاهک فاقد باکتری به عنوان شاهد منفی بود. میکروپلیت به انکوباتور ۳۷ °C منتقل و پس از ۲۰ ساعت چاهک‌ها از نظر کدورت مورد بررسی قرار گرفتند. حداقل غلظت عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر که در آن کدورت دیده نمی‌شد به عنوان MIC تعیین گردید. از چاهک‌های فاقد کدورت، شمارش کلنی انجام گرفت و حداقل غلظتی که جمعیت باکتری را ۹۹/۹٪ کاهش داده بود به عنوان MBC ثبت گردید.

بررسی تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتری: به منظور بررسی تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه، از روش میکروتیتر پلیت استفاده شد (۱۵). باکتری‌ها در محیط TSB به مدت ۲٤ ساعت کشت داده شدند. سپس کشت ۲٤ ساعته به نسبت ۱:۱۰۰ با محیط TSB حاوی ۱٪ گلوکز (TSBGlc) رقیق شد تا سوسپانسیونی با ۰/۱ =OD600 (معادل نیم مک فارلند) حاصل آمد. از این سوسپانسیون مقدار ۲۰۰ میکرولیتر به چاهک‌های میکروپلیت منتقل گردید. به هر سویه باکتری ۳ چاهک اختصاص داده شد. همچنین از محیط TSB فاقد باکتری به عنوان شاهد استفاده گردید. میکروپلیت به مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ °C انکوبه شد. در ادامه به منظور حذف باکتری‌های متصل نشده، محیط درون چاهک‌ها تخلیه و ۳ مرتبه با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات سالین (PBS) شسته شد. بعد از خشک شدن چاهک‌ها، ابتدا بیوفیلم توسط اتانول ۹۵٪ فیکس و بعد با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شد. سپس به منظور حذف رنگ اضافی، چاهک‌ها توسط آب جاری شسته شده و در ادامه میکروپلیت در طی ۲ ساعت خشک گردید. با افزودن ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ به چاهک‌ها، رنگ کریستال ویوله آزاد و به صورت محلول درآمد. جذب نوری چاهک‌ها در طول موج ٤۹۰ nm توسط دستگاه قرائت کننده الایزا تعیین گردید. متوسط جذب نوری سه چاهک مربوط به هر سویه به صورت ODt و سه چاهک شاهد به صورت ODc ثبت شد و درجه بیوفیلم تشکیل‌شده طبق جدول ۱ تعیین گردید (۱٦).

جدول ۱. تفسیر نتایج جذب نوری قرائت‌شده در چاهک‌ها

مقدار OD	تفسیر
ODt ≤ ODc	عدم تشکیل بیوفیلم
ODc < ODt < 2x ODc	بیوفیلم ضعیف
2x ODc < ODt < 4x ODc	بیوفیلم متوسط
ODt ≥ 4x ODc	بیوفیلم قوی

تأثیر عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر بر تشکیل بیوفیلم سویه‌های باکتری: باکتری در محیط TSB کشت داده شد. پس از ۲٤ ساعت، کشت باکتری با محیط TSBGlc به نسبت ۱:۵۰ رقیق شد تا سوسپانسیونی با ۰/۲ =OD600 به دست آمد. ۱۰۰ میکرولیتر محیط TSBGlc حاوی غلظت‌های µg/ml ۱۰۲٤، ۲۰٤۸ و ٤۰۹٦ (دو برابر رقت مورد سنجش) عصاره سوپرناتانت و لیزات مخمر، جداگانه درون چاهک‌های میکروپلیت ریخته شد و سپس به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری تهیه شده اضافه گردید. در نتیجه در حجم نهایی هم غلظت عصاره و هم غلظت باکتری نصف شد؛ یعنی هر چاهک حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط دارای غلظت‌های µg/ml ۵۱۲، ۱۰۲٤، ۲۰٤۸ عصاره و سوسپانسیون باکتری با ۰/۱ =OD600 بود. شاهد مثبت چاهک فاقد عصاره و شاهد منفی چاهک فاقد باکتری بود. میکروپلیت به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۳۷ °C قرار گرفت. تشکیل بیوفیلم با روش گفته شده در پاراگراف قبل مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت جذب نمونه شاهد مثبت با نمونه‌های دارای عصاره مقایسه شد. این آزمایش ۳ بار تکرار شد (۱۷).

تجزیه و تحلیل آماری: نتایج به‌دست‌آمده در مقایسه با نمونه شاهد با آزمون آنالیز واریانس یک‌راهه (ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای LSD مورد بررسی قرار گرفتند. معنادار بودن تفاوت‌ها با P value کمتر از ۰/۰۵ ارزیابی شد.

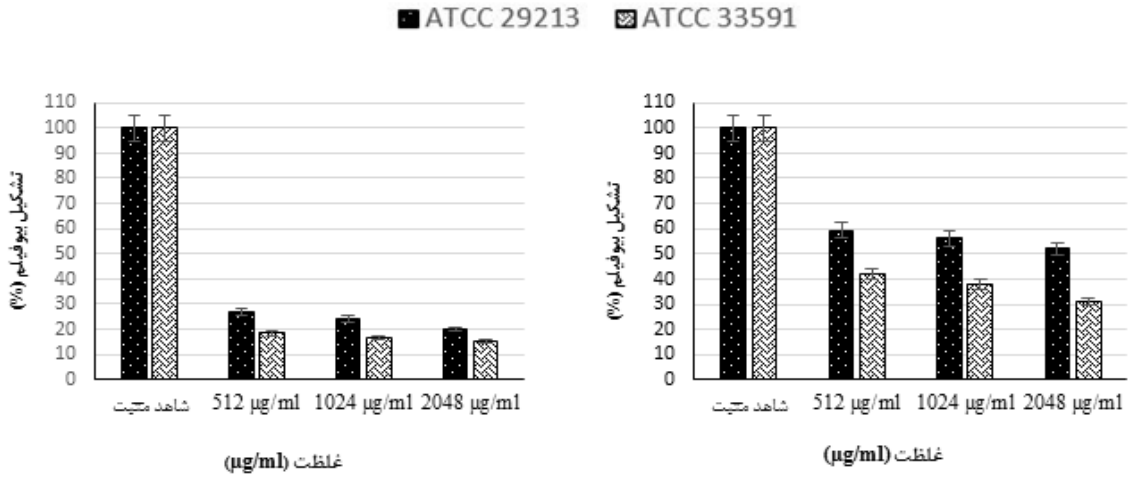
Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

نتایج

با روش میکروبراث دایلوشن، MIC عصاره سوپرناتانت برای هر دوسویه استافیلوکوکوس اورئوس حساس و مقاوم به متی سیلین ٤٠٩٦ µg/ml به دست آمد. همچنین MBC نیز برای هر دوسویه برابر با همان غلظت MIC (٤٠٩٦ µg/ml) بود. عصاره لیزات اثر کشندگی و مهاری بر روی هیچ‌یک از دوسویه استافیلوکوکوس اورئوس مورد مطالعه نشان نداد.

به منظور ارزیابی بیوفیلم تولیدشده توسط سویه‌های مورد مطالعه، جذب نوری نمونه‌های آزمایش با شاهد مقایسه شد. نتایج نشان دهنده تشکیل بیوفیلم قوی توسط هر دوسویه بود($ODt \geq 4x\ ODc$). در سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213، جذب نوری نمونه آزمایش ٦/٢ برابر و در سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 مقدار جذب ٩/٤ برابر شاهد بود.

در این مطالعه اثر سه غلظت sub-MIC عصاره سوپرناتانت مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد. این غلظت‌ها برابر با µg/ml ٥١٢، ١٠٢٤، ٢٠٤٨ بودند. همچنین برای بررسی اثر ضد بیوفیلمی عصاره لیزات مخمر نیز از همین غلظت‌ها استفاده شد. درحالی‌که هر دوسویه مورد مطالعه تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند، هر دو عصاره سوپرناتانت و لیزات توانستند در تمامی غلظت‌ها تشکیل بیوفیلم دوسویه حساس و مقاوم به متی سیلین استافیلوکوکوس اورئوس را به طور معنی‌داری کاهش دهند ($P<0.001$). در مورد عصاره لیزات در هر دوسویه این اثر تا حدی وابسته به غلظت به دست آمد و افزایش غلظت باعث کاهش بیشتر تشکیل بیوفیلم شد. به‌طوری‌که اختلاف معنی‌دار بین غلظت µg/ml ٢٠٤٨ نسبت به µg/ml ٥١٢ دیده شد ($P<0.05$). اثر عصاره سوپرناتانت برای سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 33591 وابسته به غلظت بود و اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) بین غلظت µg/ml ٢٠٤٨ نسبت به µg/ml ٥١٢ دیده شد ولی برای سویه استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 29213 تفاوت معناداری بین غلظت‌ها مشاهده نشد. در بالاترین غلظت، عصاره لیزات تشکیل بیوفیلم در هر دوسویه را بیش از ٨٠٪ کم کرد که به معنای کاهش تشکیل بیوفیلم به درجه ضعیف بود. همچنین بالاترین غلظت عصاره سوپرناتانت موجب کاهش ٤٨ درصدی در سویه حساس به متی سیلین و کاهش ٦٩ درصدی تشکیل بیوفیلم در سویه مقاوم به متی سیلین شد که به معنای کاهش تشکیل بیوفیلم هر دوسویه به درجه متوسط بود (نمودار ١).



نمودار ١. اثر عصاره سوپرناتانت (راست) و عصاره لیزات (چپ) مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یکی از مهم‌ترین باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم، عامل عوارض گوناگونی از بیماری‌های جزئی تا عفونت‌های تهدیدکننده حیات است. این باکتری به واسطه دارا بودن توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی کاتترها، ایمپلنت‌های پزشکی، استخوان و دریچه مصنوعی قلب مورد توجه محققان بسیاری در دهه اخیر قرار گرفته است. در حال حاضر عموماً برای درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم از آنتی بیوتیک‌ها استفاده می‌شود که این امر می‌تواند موجب گسترش مقاومت‌های دارویی شود. همچنین در عفونت‌های ناشی از تشکیل بیوفیلم بر روی دستگاه‌های پزشکی، درمان اغلب نیازمند خروج و جایگزینی دستگاه از بدن با جراحی است که همراه با عوارض و خطرات گوناگون است (۱۸). استفاده از ترکیبات طبیعی تولید شده توسط سایر میکروارگانیسم‌ها مانند پروبیوتیک ها برای مهار تشکیل بیوفیلم می‌تواند به عنوان راه حلی برای این مشکل باشد (۱۲).

مطالعه در زمینه تأثیر پروبیوتیک‌ها بر بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس به تازگی شروع شده و فقط چند مقاله در این زمینه توسط محققان خارج کشور منتشرشده که در بیشتر آن‌ها نیز اثر لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک مورد بررسی قرار گرفته است. این مطالعات در ادامه آورده شده است. Melo و همکاران نشان دادند که غلظت‌های sub-MIC سوپرناتانت لاکتوباسیلوس فرمنتوم می‌تواند تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس را به طور معناداری کاهش دهد. به‌طوری‌که در این مطالعه درجه بیوفیلم تشکیل‌شده از قوی به متوسط تقلیل یافت. همچنین در این تحقیق، بیان ژن icaA کاهش‌یافته و از طرف دیگر بیان ژن کنترلی icaR با افزایش رو به رو شد (۱۹). در مطالعه‌ای که توسط Merghni و همکاران انجام شد، اثرات ضدبیوفیلمی بیوسورفاکتانت جداشده از لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر روی سویه‌های دهانی استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان‌دهنده کاهش تشکیل و همچنین تخریب بیوفیلم‌های ایجاد شده بود (۲۰). Rybalchenko و همکاران با استفاده از میکروسکوپ الکترونی تأثیر کشت هم زمان لاکتوباسیلوس فرمنتوم بر تشکیل بیوفیلم تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله استافیلوکوکوس اورئوس را مورد مطالعه قراردادند. نتایج حاکی از تخریب و کاهش تراکم سلول‌ها در بیوفیلم بود (۲۱). تنها مطالعه یافت شده در زمینه تأثیر ساکارومایسس سرویزیه بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس‌ها مطالعه‌ای بود که توسط Walencka و همکاران انجام گرفته است. در این تحقیق از مانوپروتئین استخراج‌شده از دیواره سلولی ساکارومایسس سرویزیه برای مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده کاهش رشد بیوفیلم و همچنین تسهیل جدا شدن سلول‌ها از بیوفیلم بالغ بود (۱۱). این مطالعه حاضر اولین مطالعه‌ای است که تأثیر سوپرناتانت و لیزات ساکارومایسس سرویزیه را بر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس مورد بررسی قرار داده است. در این مطالعه لیزات اثر بیشتری در ممانعت از ایجاد بیوفیلم نسبت به سوپرناتانت نشان داد. هر دو عصاره توانستند تشکیل بیوفیلم هر دوسویه را به طور معناداری کاهش دهند اما این لیزات بود که موجب کاهش تشکیل بیوفیلم سویه‌ها از قوی به ضعیف شد. درحالی‌که سوپرناتانت تشکیل بیوفیلم را به درجه متوسط کاهش داد. همچنین در این مطالعه مشاهده شد تحت تأثیر هر دو عصاره، تشکیل بیوفیلم در سویه مقاوم به متی سیلین کاهش بیشتری دارد که این تفاوت کاهش در مورد سوپرناتانت قابل توجه تر بود. در مطالعات پیشین نشان داده شده بیوفیلم تشکیل‌شده توسط سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس از نظر فنوتیپی متفاوت‌اند. سویه‌های حساس به متی‌سیلین عموماً بیوفیلم وابسته به PIA تولید می‌کنند. درحالی‌که بیوفیلم تشکیل‌شده به واسطه پروتئین‌های سطحی چسبنده و DNA خارج

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

سلولی (eDNA) در سویه‌های مقاوم به متی‌سیلین مشاهده می‌شود. در سویه‌های دارای ژن mecA، تشکیل بیوفیلم وابسته به PIA سرکوب‌شده و همچنین سیستم Agr دچار فرو تنظیمی می‌شود که این وقایع در نهایت موجب تشکیل فنوتیپ بیوفیلم مستقل از PIA می‌شود (۲۲).

به طور خلاصه این مطالعه نشان دهنده اثر مطلوب ضد بیوفیلمی مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر روی سویه‌های حساس و مقاوم به متی‌سیلین استافیلوکوکوس اورئوس بود. هر دو عصاره تشکیل بیوفیلم را کاهش دادند اما لیزات اثر بیشتری نسبت به سوپرناتانت داشت. با توجه به این نتایج می‌توان با انجام مطالعات بیشتر به درمان عفونت‌های ناشی از بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از مخمرهای پروبیوتیکی امیدوار بود.

تشکر و سپاسگزاری

این مطالعه مستخرج از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروب‌شناسی دانشکده پزشکی شاهد بوده و بودجه آن توسط معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد تأمین شده است.

منابع

1. Peschel A, Otto M. Phenol-soluble modulins and staphylococcal infection. Nature Reviews Microbiology 2013;11(10):667-73.
2. Masalha M, Borovok I, Schreiber R, Aharonowitz Y, Cohen G. Analysis of transcription of the Staphylococcus aureus aerobic class Ib and anaerobic class III ribonucleotide reductase genes in response to oxygen. Journal of Bacteriology 2001;183(24):7260-72.
3. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nature Reviews Microbiology 2004;2(2):95-108.
4. Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers In Cellular and Infection Microbiology 2014;4:178.
5. Aguilar C, Anderson GG, Donlan RM, Earl AM, Erickson DL, Otto M, et al. Bacterial Biofilms: springer 2008: 301.
6. Revdiwala S, Rajdev BM, Mulla S. Characterization of Bacterial Etiologic Agents of Biofilm Formation in Medical Devices in Critical Care Setup. Critical Care Research and Practice 2012;2012:6.
7. Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials 2012;33(26):5967-82.
8. Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The Inhibition Effect of Lactobacilli Against Growth and Biofilm Formation of Pseudomonas aeruginosa. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2017.
9. Fakruddin M, Hossain MN, Ahmed MM . Antimicrobial and antioxidant activities of Saccharomyces cerevisiae IFST062013, a potential probiotic. BMC Complementary and Alternative Medicine 2017;17(1):64.
10. Tiago FC, Martins FS, Souza EL, Pimenta PF, Araujo HR, Castro IM, et al. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics. Journal of Medical Microbiology 2012;61(Pt 9):1194-207.
11. Walencka E, Wieckowska-Szakiel M, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B. A surface-active agent from Saccharomyces cerevisiae influences staphylococcal adhesion and biofilm development. Zeitschrift fur Naturforschung C, Journal of Biosciences 2007;62(5-6):433-8.
12. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Lukaszewicz M, Dziadkowiec D. The antagonistic effect of Saccharomyces boulardii on Candida albicans filamentation, adhesion and biofilm formation. FEMS Yeast Research 2009;9(8):1312-21.
13. Liu D, Zeng X-A, Sun D-W, Han Z. Disruption and protein release by ultrasonication of yeast cells. Innovative Food Science & Emerging Technologies 2013;18:132-7.
14. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. M7-A9 2012.
15. Zmantar T, Kouidhi B, Miladi H, Mahdouani K, Bakhrouf A. A microtiter plate assay for Staphylococcus aureus biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. The New Microbiologica 2010;33(2):137-45.

16. Stepanovic S, Vukovic D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukic S, Cirkovic I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica 2007;115(8):891-9.
17. Fonseca AP, Extremina C, Fonseca AF, Sousa JC. Effect of subinhibitory concentration of piperacillin/tazobactam on Pseudomonas aeruginosa. Journal of Medical Microbiology 2004;53(Pt 9):903-10.
18. Chung PY, Toh YS. Anti-biofilm agents: recent breakthrough against multi-drug resistant Staphylococcus aureus. Pathogens and Disease 2014;70(3):231-9.
19. Melo TA, Dos Santos TF, de Almeida ME, Junior LA, Andrade EF, Rezende RP, et al. Inhibition of Staphylococcus aureus biofilm by Lactobacillus isolated from fine cocoa. BMC Microbiology 2016;16(1):250.
20. Merghni A, Dallel I, Noumi E, Kadmi Y, Hentati H, Tobji S, et al. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from Lactobacillus casei and their anti-biofilm effect in oral Staphylococcus aureus strains. Microbial Pathogenesis 2017;104:84-9.
21. Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, Markov AG, Amasheh S. Inhibitory effects of Lactobacillus fermentum on microbial growth and biofilm formation. Archives of Microbiology 2015;197(8):1027-32.
22. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in Staphylococcus aureus. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 2015;5:1.

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

Downloaded from daneshvarmed.shahed.ac.ir at 18:38 IRST on Saturday January 20th 2018

Daneshvar

Medicine

Scientific-Research Journal of Shahed University
25th Year, No.132
December- January 2017-2018

Daneshvar(medicine) shahed University/ 25th year/2017-2018 /NO.132

Received: 30/10/2017
Last revised: 12/12/2017
Accepted: 19/12/2017

The effect of probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* on *Staphylococcus aureus* biofilm formation

Navid Saidi[1], Parviz Owlia[2], Seyed Mahmoud Amin Marashi[3], Horieh Saderi[2*]

1. School of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran
2. Molecular Microbiology Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
3. Department of Microbiology and Immunology, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

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

Abstract

Background and Objective: Biofilm formation is an important virulence factor in *Staphylococcus aureus*. Most infections associated with biofilm of this bacterium are difficult to treat with antibiotics. As yet, a lot of mechanisms have been explained for probiotic yeast functions against bacterial infections, but few studies have been done on their effects on biofilm formation. The aim of this study was to evaluate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on *Staphylococcus aureus* biofilm formation**.**

Materials and Methods: Extract of supernatant and lysate was prepared from *Saccharomyces cerevisiae* culture. After determining the MIC, the effect of extracts at three concentrations of 2048, 1024 and 512 µg/ml was evaluated on biofilm formation of two standard strains of *S. aureus*, ATCC 29213 (methicillin-sensitive) and ATCC 33591 (methicillin-resistant) using the microtiter plate assay in three replications.

Results: Both supernatant and lysate extract of yeast could significantly reduce the biofilm formation of both methicillin-sensitive and resistant strains of *S. aureus* at all concentrations. While both studied strains were strong biofilm producers, at the concentration of 2048 µg/ml, supernatant could reduce their biofilm formation to moderate level. Also, lysate reduced biofilm formation to weak level more effectively.

Conclusion: In this study, the good effect of *S. cerevisiae* yeast on the reduction of *S. aureus* biofilm formation was observed for the first time. Doing more studies, it is expected to treat infections caused by biofilm of this bacterium with probiotic yeasts.

Keywords: *Staphylococcus aureus***,** Biofilm**,** Probiotic**,** *Saccharomyces cerevisiae*