

دانشور

پزشکی

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

نویسندگان: زهرا دهقانزاده^۱، پرویز اولیاء^{۲*}، سید محمود امین مرعشی^۳،
حوریه صادری^۲، مریم مکاری^۱

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

E-mail: powlia@gmail.com

*نویسنده مسئول: پرویز اولیا

چکیده

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

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، از سویه‌ی بومی ساکارومایسس سرویزیه S₃ که خاصیت پروبیوتیکی آن در مطالعات قبلی به اثبات رسیده و از باکتری سودوموناس آئروجینوزا سویه‌ی PAOI استفاده گردید. به منظور بررسی اثر (سوپرناتانت و لیزات) مخمر بر سودوموناس آئروجینوزا از آزمایش‌های فنوتیپی (آزمایش تست الاستاز-آلكالین پروتئاز-حرکت) مناسب استفاده گردید.

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

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

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

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست‌ونجم-شماره ۱۳۳
اسفند ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۲۸

آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۱۱/۱۴

پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۱

مقدمه

مطالعه پیرامون پروبیوتیکها و پره بیوتیکها در دنیای امروز افزایش و در حال رشد است. پرداختن به این زمینه به دلیل افزایش مطالعات در علم میکروبیوم انسانی مهم است. پروبیوتیکها و پره بیوتیکها چندین دهه مورد استفاده قرار گرفته است؛ اما امروزه استفاده از آنها به سمت اهداف و دست آوردهای خاص و منحصر به فرد در حال ظهور است (۱). در شرایط کنونی که بیماریهای عفونی ناشی از باکتریهای مقاوم به آنتی بیوتیک به صورت غیرقابل کنترلی در حال تهدید سلامت بشر است. این بیماریها به خصوص در کشورهای در حال توسعه می باشد (۲). از زمانی که افزایش مقاومت به آنتی بیوتیکها درمان با این مواد را با مشکل مواجه کرده است، نیاز به ابزارها و مواد نوین به منظور مبارزه با این عوامل بیش از پیش احساس شد (۳). در این بین سودوموناس آئروجینوزا یکی از مهم ترین عوامل بیماریزا است (۴). استفاده از پروبیوتیکها یکی از راههای نویدبخش است که به تازگی کشف و مورد استفاده قرار گرفته است (۳). بر اساس تعریف ارائه شده توسط سازمان غذا و دارو و سازمان بهداشت جهانی (WHO/FAO): "پروبیوتیکها: میکروارگانیسمهای زنده ای هستند که استفاده کافی از آنها اثرات سودمندی را برای میزبان دارد" (۵). پروبیوتیکها با مکانیسمهای متفاوتی عمل می کنند از جمله ۱- اتصال به موکوز سلولهای روده و اپیتلیوم توسط پروبیوتیکها که مهم ترین معیار انتخاب پروبیوتیکها است. ۲- پروبیوتیکهای ترکیبی و اتصال به پاتوژن ها و تجمعات آنها. ۳- تولید مواد و فرآوردهای ضد میکروبی (اسیدهای ارگانیک، باکتریوسین، هیدروژن پراکسید، کربن دی اکسید، موادی با وزن مولکولی پایین و...) ۴- تأثیرات ایمنولوژیکی باکتریهای پروبیوتیک (میکروبیوم روده-مقابله با پاتوژن به وسیله سیستم ایمنی- تأثیرات مثبت بر پاسخهای ایمنی- سلولهای اپیتلیال- سلولهای دندریتیک - سلولهای T و...) و ۵- تغییرات میکرواکولوژی در روده انسان بر میزبان، تأثیر

می گذارند (۶).

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

سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی و فرصت طلبی است که به خصوص در افراد با نقص در سیستم ایمنی ایجاد عفونت می کند (۸). بیماریزایی در این باکتری با تکیه بر تولید شمار متعددی از فاکتورهای ویروانس (خارج سلولی و دورن سلولی) و مقاومت ذاتی به طیف وسیعی از آنتی بیوتیکهاست (۳). سودوموناس آئروجینوزا توانایی ترشح دست کم ۷ نوع پروتئاز خارج سلولی را دارد که شامل: سودولیزین (LAS B -الاستاز)، آئروژینولیزین (آلکالین پروتئاز)، استافیلولیزین (استافیلوکوکوس اندوپیتیداز- Las A پروتئاز)، لیزیل اندوپیتیداز (پروتئاز چهار-Prp1)، PASP (پروتئاز کوچک)، LEP A (پروتئاز بزرگ) و آمینوپیتیداز است (۹).

الاستاز توانایی تخریب طیف وسیعی از پروتئینهای میزبان را دارد. این پروتئینها می توانند در دیواره رگها- ریه و... وجود داشته باشد که شامل: الاستین- کلاژن-پروتئوگلیکان-ایمونوگلوبین و... می باشند. (۹) آئروژینولیزین یا آلکالین پروتئاز یک متالوپروتئاز وابسته به روی است. در طول عفونت های حاد توسط سودوموناس آئروجینوزا در تهاجمات بافتی و عفونت های سیستمیک و هم چنین در عفونت زخم نقش مؤثری دارد (۱۰). آلکالین پروتئاز فعالیت سیستم

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

ب- آماده سازی عصاره لیزات و سوپرناتانت ساکارومایسس سرویزیه

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

پس از آن کلنی های رشد یافته در محیط فوق را به حجمی معادل با 20cc منتقل و انکوبه کردیم (30°C/16h/170g). در ادامه، به منظور آغاز فرآیند عصاره گیری، این حجم را به حجم یک لیتری از این محیط تلقیح و تحت شرایط مذکور قرار دادیم (-16°C/30 18h/120g). سپس، جذب نوری در طول موج ۶۲۰ نانومتر قرائت شد (که معادل با ۱۰.۵ بود). با توجه به منحنی رشد رسم شده ساکارومایسس سرویزیه، مخمر وارد فاز لگاریتمی خود گشته و برای آغاز فرایند مناسب بود.

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

به منظور تهیه سوپرناتانت، مایع رویی حاصل در این مرحله را از فیلترهای 0.22µ عبور داده و با نسبت ۱ به ۵ اتیل استات وارد دکانتور شد. در این مرحله، عصاره مخمر به دلیل وجود ترکیبات اسید چرب در اتیل استات (فاز آلی) حل گشته و در بازه های زمانی ۳۰ دقیقه ایی به مدت سه ساعت سوپرناتانت را جمع آوری گردید. برای دستیابی به عصاره خشک سوپرناتانت، مایع حاصل را وارد روتاری شد. در نهایت برای تهیه استوکی با غلظت 327.84 میلی گرم بر میلی لیتر میزان کافی (برحسب گرم ماده خشک) متانول را به عنوان حلال اضافه نمودیم (۱۶).

کمپلمان را از مسیر لکتین و هم چنین کلاسیک، مهار و بلاک می کند. این امر از طریق شکستن مولکول C2 در این مسیرها است که در نهایت مانع از بین بردن این باکتری به طریق فاگوسیتوز می گردد (۱۱).

الکالین پروتئاز و الاستاز مانع از عملکرد طبیعی نوتروفیل ها می شود. به دنبال آن به باکتری اجازه ی فرار از سیستم دفاعی میزبان و فاگوسیتوز داده نمی شود. البته یک قاعده کلی نشان دهنده ی تأثیر این آنزیم ها بر عملکرد کلیه ی گلبول های سفید است که فعالیت فاگوسیتوزی را علیه سودوموناس آئروجینوزا را کاهش می دهد (۱۲).

حرکت باکتری ها نقش به سزایی در کلونیزه شدن باکتری در سطوح مختلف و متعاقب آن تشکیل جوامع مقاوم باکتریایی موسوم به بیوفیلم را دارد (۱۳). مشابه با سایر باکتری های متحرک، تحرک در سودوموناس آئروجینوزا به عنوان فاکتور مهمی در جنبش و حرکت در سطوح ویسکوز (مانند اپیتلیال) و سایر سطوح میزبان است (۱۴). یکی از اصلی ترین توانمندی های سودوموناس آئروجینوزا قابلیت انتشار سریع از محل آلودگی و در نهایت تهاجم و انتشار سیستماتیک است (۱۵). از آنجایی که سودوموناس آئروجینوزا مهم ترین عامل عفونت بیمارستانی در کشور است و این باکتری نسبت به طیف وسیعی از مواد آنتی میکروبیال مقاوم است؛ لذا بر آن شدیم که پژوهشی در رابطه با اثر سویه پروبیوتیک بومی بر تولید فاکتورهای مذکور این باکتری انجام گیرد، امیداست نتایج مطلوبی حاصل آید که منجر به افزایش تحقیقات در این زمینه گردد.

مواد و روش ها

الف- سویه های میکروبی

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

۲- سویه ی پروبیوتیکی دخیل در این مطالعه، سویه

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

روش بررسی آلكالین پروتئاز

برای سنجش میزان تأثیر سوپرناتانت و لیزات مخمر بر این آنزیم، از کشت 18-24h باکتری در محیط BHI agar استفاده شد. همچنین، محیط کشت مناسب برای فعالیت آنزیم آلكالین پروتئاز متشکل از:

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

روش بررسی الاستاز

محیط کشت مورد استفاده به منظور سنجش فنوتیپی الاستاز، شامل: ۵٪ پیتون (Sigma-Aldrich) و ۰.۲۵٪ TSB (Merck, Germany) بود. باکتری در این محیط، کشت داده شد. زمانی که جذب نوری در طول موج 540nm به

هم‌چنین برای فراهم آوری عصاره لیزات، پس از سانتریفوژ اولیه رسوب های موجود را جمع‌آوری شد. سپس با استفاده از آب مقطر استریل شست‌وشو داده شد. در ادامه، مجدداً حجم کافی آب مقطر را اضافه کرده و به منظور لیز سلولی محتویات را در سونیکاتور (۹۰٪-/18min) قرار گرفت. مجدداً محتویات سانتریفوژ شده (40°C/15000g/15min) و از فیلترهای 0.45μ عبور یافت. برای دستیابی به عصاره خشک حجم فیلتر شده به روتاری انتقال یافت. در پایان، برای تهیه استوکی با غلظت ۱۶۳.۲۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متناسب با گرم خشک عصاره، آب مقطر استریل را به عنوان حلال اضافه کردیم.

ج- بررسی خواص آنتی باکتریال عصاره لیزات و سوپرناتانت مخمر

به منظور بررسی خاصیت ضد باکتریایی عصاره‌های مخمر از روش میکرو دایلوژن و مطابق با دستورالعمل CLSI استفاده شد. با استناد بر این روش، کمترین غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره لیزات و سوپرناتانت تعیین شد. برای تهیه سوپانسیون باکتریایی از کلنی ۲۴ ساعته باکتری در محیط BHI agar برداشته و غلظتی معادل نیم مک فارلند تنظیم گردید. محیط استفاده شده در این روش BHI agar بوده، هم‌چنین مقادیر رقیق شده باکتری به نسبت ۱ به ۲۰ به همراه استوکهای تهیه شده لیزات و سوپرناتانت (به طور جداگانه) به چاهک‌ها تلقیح شد و تا چاهک ۱۰ این عمل ادامه یافت. شایان ذکر است، چاهک‌های ۱۱ و ۱۲ به عنوان کنترل مثبت و منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیتها در (20h/37°C) انکوبه گردید و روز بعد نتایج قرائت شد. کلیه آزمایش‌های برای اطمینان از صحت سه بار تکرار گردید (۱۷).

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

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

روش بررسی حرکت

برای ارزیابی اثر عصاره لیزات و سوپرناتانت بر

از آن است که رشد باکتری در حضور سوپرناتانت در چاهک سوم و رقت ۲۰۴۸ میلی گرم در میلی لیتر متوقف گردید. بر این اساس، رقت مورد استفاده در تمامی واکنش‌ها برای سوپرناتانت، رقت ۱۰۲۴ میلی گرم در میلی لیتر که معادل 1/2Mic بود، در نظر گرفته شد.

از آنجا که هیچ گونه مهارى توسط لیزات مشاهده نشد، بالاترین رقت تست حساسیت میکروبی معادل ۸۱۹۲ میلی گرم در میلی لیتر در نظر گرفته شد.

نتایج حاصل از تست حرکت

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

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

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

آنالیز آماری

نتایج تست فنوتیپی، توسط تست ANOVA توسط برنامه Sigma Plot آنالیز شد. در آزمون‌های آماری مذکور، مقادیر X کمتر از ۰.۰۵، به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

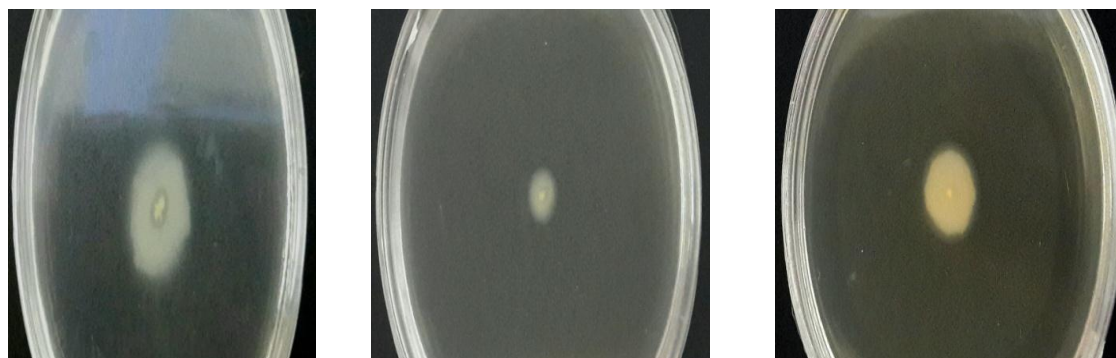
نتایج آنتی بیوگرام سودوموناس آئروجینوزا در حضور لیزات و سوپرناتانت نتایج به دست آمده از تست حساسیت میکروبی حاکی

جدول ۱. اندازه‌گیری هاله رشد حرکت در شرایط متفاوت

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

M: نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش

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



شکل ۱. تصاویر حاصل از بررسی حرکت باکتری

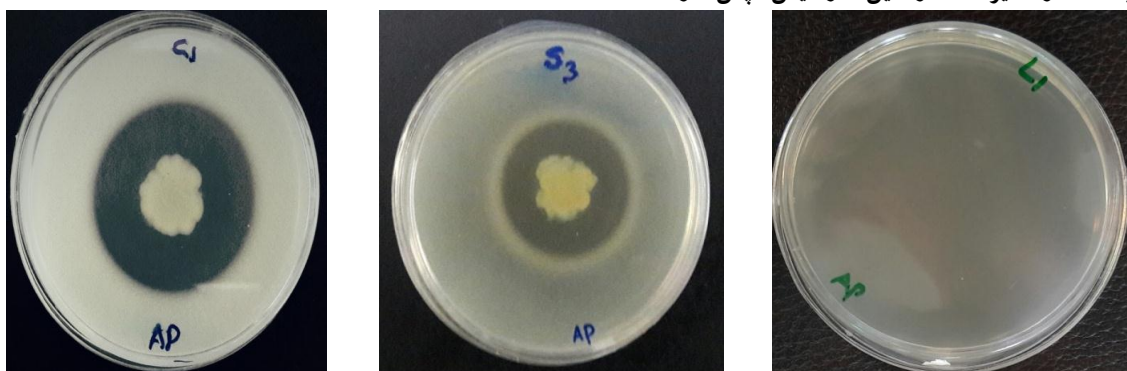
شکل ۱. تصاویر حاصل از بررسی حرکت باکتری

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

نتایج حاصل از آلکالین پروتئاز

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

الف- عصاره سوپرناتانت پس از گذشت ۴۸ ساعت انکوباسیون توانسته بود تأثیر مهاری مطلوبی بر آنزیم باکتریایی اعمال کند. این امر موجب کاهش هاله‌ی شفاف اطراف باکتری در مقایسه با سویه‌ی کنترل گردید. ب- عصاره لیزات در این آزمایش پس از اضافه



شکل ۲. تصاویر حاصل از بررسی فعالیت آنزیم

شکل ۲. تصاویر حاصل از بررسی فعالیت آنزیم

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

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

M: نتایج حاصل از سه بار تکرار آزمایش

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

نتایج حاصل از تست الاستاز

آنزیمی موثر واقع شد. پس از انجام تست جذب نوری قرائت گردید، نتایج حاصل مطابق با جدول ۳ است.

افزودن عصاره سوپرناتانت و لیزات هر دو توانست فعالیت آنزیمی را کاهش دهد و عصاره ها بر فعالیت

جدول ۳. نتایج حاصل از جذب نوری فعالیت آنزیمی

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

کلیه اطلاعات مستخرج از این آزمایش، توسط تست ANOVA مورد آنالیز قرار گرفت. شایان ذکر است مقادیر X کمتر از ۰.۰۵ معنی دار محسوب می شود. در این آزمایش همان طور که در جدول فوق بیان شده است؛ جذب نوری قرائت شده در سویه کنترل 0.869 ± 0.161 است. در تست دوم، آزمایش سوپرناتانت، این میزان 0.345 ± 0.053 است که کاهش تشریح آنزیم و به دنبال آن OD را شاهد هستیم. هم چنین در تست آماری، مقدار X کمتر از ۰.۰۵ است که معنی دار است. در آزمایش مربوط به عصاره لیزات نیز مقادیر قرائت شده از سه بار تکرار 0.623 ± 0.11 است. این میزان در مقایسه با سویه کنترل، کاهش فعالیت آنزیم را نشان می دهد. این کاهش جذب نوری سبب شده است تا مقدار X در این آزمایش نیز کمتر از ۰.۰۵ باشد که معنی دار تلقی می شود.

بحث

سودوموناس آئروجینوزا باکتری فرصت طلب است. این باکتری به عنوان سومین عامل عفونت های بیمارستانی بعد از استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلائی است (۲۱).

از جمله مشکلات عمده ایجاد شده توسط این باکتری در روند درمان و پیشگیری از عفونت های ایجاد شده مقاومت به طیف وسیعی از آنتی بیوتیک هاست که در حال رشد روزافزون است (۲۲). این امر موجب شده است محققین در جستجوی راه های نوین مقابله با این باکتری باشند. ساکارومایسس سرویزیه مخمری با

خاصیت پروبیوتیکی و غیر بیماری زا است (۷) این مخمر توانایی مقابله و حفاظت در برابر باکتری های گوناگون را با مکانیسم های متفاوت دارد. (۷)

مطالعات زیادی پیرامون تاثیر پروبیوتیک ها (ساکارومایسس سرویزیه) بر پاتوژن ها صورت گرفته است. نتایج این مطالعات بر حسب زمان، مکان و باکتری متفاوت بوده است. مطالعه ای در سال ۲۰۱۲ Tiago و همکارانش پیرامون اتصال به سطوح مخمری به عنوان مکانسیم به دام انداختن پاتوژن ها توسط سویه های پروبیوتیکی ساکارومایسس انجام دادند که نتیجه حاصل به شرح زیر است، دوسویه ساکارومایسس سرویزیه UFMG 905 و BY4741 باعث ممانعت از اتصال پاتوژن به رسیپتور اختصاصی آن در سطح سلول های اپیتلیال روده ایی شده بود (۵). در سال در سال ۲۰۱۴ Sudha Joshi و همکارانش به بررسی اثر ممانعتی پروبیوتیکها (لاکتوباسیل پلانناروم) بر تضعیف ویرولانسی فاکتورهای سودوموناس آئروجینوزا شامل الاستاز، پیوسیانین و بیوفیلیم پرداخت که نتایج آن حاکی از تاثیر مثبت لاکتوزاز مترشحه از لاکتوباسیلوس پلانناروم بر عوامل بیماری زای این باکتری است (۱۲). در مطالعه ای در ۱۳۹۳ عیسی غلام پور عزیزی بر تاثیر مخمر ساکارومایسس سرویزیه بر میزان کاهش سم قارچی سیتربین کار کردند که نتایج آن حاکی از کاهش تولید مایکوتوکسین و استفاده از آن به عنوان یک روش بیولوژی و کم خطر است (۲۳). مطالعه ای دیگر در سال

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

نتیجه‌گیری

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

سپاسگزاری

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

۱۳۹۰ رحیم زاده به بررسی اثر ضد میکروبی کفیر بر سودوموناس آئروجینوزا پرداختند که در این مطالعه تجربی تأثیر کفیر بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیمار دچار سوختگی و سودوموناس آئروجینوزا استاندارد (ATCC 27853) مورد ارزیابی قرار گرفت. بررسی اثر ضد باکتریایی عصاره‌های کفیر در دو زمان تخمیر ۴۸ و ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سلسیوس، با روش‌های دیسک پلیت و چاهک و بررسی کینیتیک مرگ به صورت *in vitro* در شرایط آزمایشگاهی انجام شد. جهت تعیین کمترین غلظت از ماده ضد میکروبی (MIC) که از رشد باکتری پس از ۲۴ ساعت ممانعت می‌نماید از روش‌های رقت لوله‌ای و کدورت سنجی استفاده شد. نتایج آن حاکی از اثر عصاره کفیر (استرپتوکوکوسی‌های اسیدلاکتیک، لاکتوباسیل‌های مزوفیلیک، مخمرهای تخمیری و غیرتخمیری لاکتوز و باکتری‌های اسیدلاکتیک) دارای اثرات ضد میکروبی بر روی باکتری سودوموناس آئروجینوزا استاندارد (ATCC27853) و سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از بیمار سوخته بود. (۲۴) هم‌چنین الهه کیایی و همکاران در سال ۱۳۸۵ مطالعه‌ای صورت گرفت که به اثر آنتاگونیستی باکتری‌های لاکتیک جدا شده از ماست که دارای خاصیت پروبیوتیکی بوده‌اند علیه باکتری‌های پاتوژن پرداخت. این مطالعه، اثر مهار لاکتوباسیل‌های (پروبیوتیک) را بر ۷ گونه‌ی مهم پاتوژن‌های گوارشی نشان داد (۲۵).

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

منابع

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

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

Daneshvar
Medicine

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

Received: 19/12/2017

Last revised: 03/02/2018

Accepted: 10/02/2018

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

Zahra DehghanZadeh¹, Parviz Owlia^{2*}, Seyyed Mahmoud Amin Marashi³, Hourie Saderi², Maryam mokari¹

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

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

Abstract

Background and Objective: According to definition of probiotics by WHO/FAO that is "Live microorganisms which, when present in sufficient amount, confer beneficial effects to the host".

Saccharomyces cerevisiae is the first non-pathogenic yeast which is known as a probiotic for humans that its helpful effects for humankind has been proved. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most significant opportunistic pathogen that has notably resistance to many antibacterial agents. This study evaluated the effect of *Saccharomyces cerevisiae* on the pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* such as elastase, alkaline protease, and motility.

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

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

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

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