

دانشور پزشکی

اثر سوپرناتانت مخمر ساکارومیسس سرویزیه بر ممانعت از رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا و اثر آن بر بیان ژن اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروجینوزا به روش Real – Time PCR

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

۱. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۲. مرکز تحقیقات میکروبی شناسی مولکولی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

۳. گروه میکروبی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج، ایران.

E-mail: powlia@gmail.com

* نویسنده مسئول: پرویز اولیاء

چکیده

مقدمه و هدف: ساکارومیسس سرویزیه یکی از انواع مخمرهای پروبیوتیک است که تأثیرات مثبت بر سلامت دارد. سودوموناس آئروجینوزا یکی از باکتری‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب بسیار مهم است. اگزوتوکسین S از توکسین‌ها و آنزیم‌های ترش‌ساز مهم آن است. هدف از این مطالعه تعیین اثر سوپرناتانت ساکارومیسس سرویزیه بر ممانعت از رشد سودوموناس آئروجینوزا و اثر آن بر بیان ژن اگزوتوکسین S به روش Real-Time PCR است.

مواد و روش‌ها: کشت سودوموناس آئروجینوزا در محیط Brain Heart Broth صورت گرفت. استخراج Total RNA باکتری با کیت RNA Protect Bacteria و استخراج cDNA با کیت QuantiTect Reverse Transcription انجام شد. کشت ساکارومیسس سرویزیه در محیط Potato Dextrose Broth صورت گرفت و سوپرناتانت آن به دست آمد. سه بار آزمایش حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد (MIC) سوپرناتانت علیه سودوموناس آئروجینوزا با روش micro dilution broth انجام شد. سوسپانسیون باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا سه بار جداگانه با کشت خالص و سوپرناتانت مخمر مجاور شد و هر بار آزمایش Real-Time PCR با کیت QuantiTect SYBER Green PCR جهت سنجش بیان ژن اگزوتوکسین S صورت گرفت.

نتایج: حداقل غلظت ممانعت‌گر رشد (MIC) سوپرناتانت علیه سودوموناس آئروجینوزا $2048 \mu\text{g/ml}$ بود. نتایج آزمایش Real-Time PCR نشان‌دهنده‌ی بازده بیان ژن اگزوتوکسین S در کشت باکتری و سوپرناتانت ۱/۷۷ بود.

نتیجه‌گیری: سوپرناتانت باعث ممانعت از رشد سودوموناس آئروجینوزا شد اما سبب افزایش بیان ژن اگزوتوکسین S در سودوموناس آئروجینوزا گردید، زیرا از غلظت $\frac{1}{2}$ MIC سوپرناتانت استفاده شد و عدد بازده بیان ژن بزرگ‌تر از ۱ شد.

واژگان کلیدی: ساکارومیسس سرویزیه، سودوموناس آئروجینوزا، سوپرناتانت، اگزوتوکسین S.

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال بیست و پنجم-شماره ۱۳۳
اسفند ۱۳۹۶

دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۶/۱۱/۱۶
پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۳

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت طلب در خاک، مواد آلی در حال فساد، آب، گیاهان و جانوران یافت می‌شود. افراد ناقل سودوموناس، بیماران بستری در بیمارستان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ارگانسیم را به عنوان قسمتی از فلور میکروبی طبیعی دارند. ایجاد عفونت در دستگاه تنفسی، ادراری، پوست، بافت نرم، گوش خارجی، چشم، باکتری و اندوکاردیت و عفونت‌های موضعی مجرای گوارشی، سیستم عصبی مرکزی و سیستم اسکلتی - عضلانی نیز می‌کند (۱). تشخیص اولیه و کنترل این پاتوژن بسیار اهمیت دارد (۲). اخیراً سودوموناس آئروجینوزا در گروه باکتری‌های پاتوژن "ESKAPE" قرار داده شده است که شامل باکتری‌های: انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسینتوباکتر بومانی، سودوموناس آئروجینوزا و گونه‌های انتروباکتر است (۳). باکتری‌های این گروه برای سلامت انسان‌ها مشکل‌زا هستند زیرا علاوه بر داشتن مکانیسم‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها به صورت عفونت‌های بیمارستانی گسترش می‌یابند (۴ و ۵).

سودوموناس آئروجینوزا دارای فاکتورهای ویروانس متعددی از قبیل اجزای ساختاری، توکسین‌ها و همچنین آنزیم‌ها است. دارای سیستم ترشحی تیپ III برای تلقیح توکسین‌ها به داخل سلول میزبان می‌باشند. از مهم‌ترین توکسین‌ها و آنزیم‌های ترشحی آن می‌توان: الاستاز، آگزوتوکسین A، آگزوتوکسین S، آگزوتوکسین T، آگزوتوکسین U، آگزوتوکسین Y و فسفولیپاز C را نام برد (۶).

هر دو ژنوتیپ *ExoS/ExoT* و *ExoU/ExoY* در ارتباط با عفونت‌های حاد در انسان‌ها می‌باشند. همه‌ی این ۴ نوع پروتئین نیازمند کوفاکتور مخصوص یوکاریوتی برای فعالیتشان هستند. این پروتئین‌ها می‌توانند مسیر سیگنال هدایت را تغییر دهند و سیستم ایمنی ذاتی میزبان را خنثی کنند (۷).

باکتری سودوموناس آئروجینوزا، آگزوتوکسین S را

مستقیماً به درون سیتوپلاسم تزریق می‌کند تا باعث ممانعت از فعالیت سلول‌های هدف بشود. هنگامی که سیستم ترشحی تیپ III پروتئین‌ها را به درون سلول‌های یوکاریوت مورد نظر وارد می‌کند آسیب سلول‌های اپی‌تلیال رخ داده و سبب تسهیل انتشار باکتری، تهاجم بافتی و نکروز می‌شود (۹ و ۸). به دنبال استفاده بی‌رویه از آنتی‌بیوتیک‌ها و مقاومت زیاد سودوموناس آئروجینوزا 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 (۱۱ و ۱۰). یکی از آن‌ها استفاده از پروبیوتیک‌ها است (۱۲).

پروبیوتیک‌ها میکروارگانسیم‌های زنده و غیر پاتوژن و دارای تأثیرات مثبت بر سلامت، کنترل عفونت و مدیریت و درمان بیماری‌ها هستند. شواهد بیانگر تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فرایند متابولیسمی پاتوژن‌های عفونت‌زا است (۱۳). ساکارومیسس سرویزیه یک مخمر تأیید شده‌ی بالینی به عنوان پروبیوتیک انسانی است. دارای تأثیرات تغذیه‌ای، تأثیرات وابسته به تغذیه، تأثیرات تنظیم ایمنی، تأثیرات ضدالتهابی و حفظ تمامیت سلولی سد اپی‌تلیال است (۱۴ و ۱۵).

با توجه به اهمیت سودوموناس آئروجینوزا در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این باکتری، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید و جایگزین الزامی است. این مطالعه نیز با هدف بررسی اثر ساکارومیسس سرویزیه بر بیان ژن آگزوتوکسین S در سودوموناس آئروجینوزا طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

سویه‌های مورد مطالعه و محیط‌های کشت: از سویه استاندارد سودوموناس آئروجینوزا PAO1 برای تولید آگزوتوکسین S استفاده شد. از ساکارومیسس سرویزیه از سویه بومی S3 که خاصیت پروبیوتیکی آن قبلاً مشخص شده بود، استفاده شد. ساکارومیسس سرویزیه سویه بومی S3 به محیط Potato Dextrose Broth (ایران

گرفت. با لوپ استریل یک تک کلنی برداشته شد و درون لوله حاوی محیط کشت Brain Heart Broth تلقیح گردید. میزان OD اولیه با دستگاه اسپکتروفتومتری به دست آمد. سپس از همین لوله ۴ ml برداشته و به درون ارلن حاوی ۱۰۰۰ ml محیط Brain Heart Broth منتقل شد. ارلن درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده و در هر ۱ ساعت میزان OD با دستگاه اسپکتروفتومتری خوانده می‌شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن باکتری‌ها به فاز سکون نمودار OD بر حسب زمان رسم شد (نمودار ۲).

روش تهیه سوپرناتانت مخمر ساکارومیسس سرویزیه

ساکارومیسس سرویزیه در محیط Potato Dextrose Broth (ایران Ibroesco) در انکوباتور شیکردار (ایران فن‌آوران گستر) ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۷۰ RPM به مدت ۱۶ تا ۱۸ ساعت کشت شد تا به انتهای فاز لگاریتمی برسد. سپس به محیط Potato Dextrose Broth (ایران Ibroesco) تلقیح و در انکوباتور شیکردار (ایران فن‌آوران گستر) ۳۰ درجه سانتی گراد با دور ۱۲۰ RPM به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. با دور ۵۱۷۵ RPM به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (آلمان Sigma) شد. سوپرناتانت حاصل با فیلتر ۰/۲۲ μ متصل به پمپ خلأ، استریل شد. محلول حاصل درون دکانتور حاوی اتیل استات (آلمان Merck) با حجم ۰/۲ حجم کل محلول فیلتر شده قرار گرفت تا فاز آلی استخراج شود. این کار را ۶ بار انجام شد. فاز آلی به دست آمده را درون دستگاه روتاری (آلمان Heidolph) متصل به پمپ خلأ قرار گرفت. عصاره تلیخیص شده در انکوباتور (آلمان Memmert) ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت خشک شد. عصاره توزین شد. در نهایت به عصاره‌ی خشک شده، متانول (آلمان Merck) اضافه می‌کنیم تا به غلظت نهایی ۳۲۷/۶۸ mg/ml برسد. استوک نهایی با فیلتر سرنگی ۰/۲۲ μ استریل شد تا آلودگی‌ها از بین برود (۱۶).

Ibroesco) تلقیح شد و در انکوباتور شیکردار (ایران فن‌آوران گستر) با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. باکتری سودوموناس آئروجینوزا PAO1 برای تولید آگزوتوکسین S به محیط Brain Heart Broth (کانادا Quelab) تلقیح شد و در انکوباتور (آلمان Memmert) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت (۱).

به دست آوردن نمودار رشد مخمر ساکارومیسس سرویزیه (نمودار ۱):

۱. مخمر ساکارومیسس سرویزیه به محیط کشت Potato Dextrose Agar تلقیح شد و در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت.
 ۲. پس از گذشت ۲۴ ساعت از سویه‌ی بومی S3 مخمر ساکارومیسس سرویزیه چند کلونی برداشته شد و به محیط کشت Potato Dextrose Broth در لوله تلقیح شد. ارلن درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. میزان OD اولیه با دستگاه اسپکتروفتومتری به دست آمد. سنجش OD با دستگاه اسپکتروفتومتری با طول موج ۶۱۰ نانومتر اندازه گیری شد.
 ۳. میزان ۴ ml از محیط کشت Potato Dextrose Broth به ارلن حاوی ۱۰۰ ml محیط کشت Potato Dextrose Broth اضافه شد. ارلن درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.
 ۴. اولین نقطه نمودار رشد مخمر زمان ۰ در نظر گرفته شد (نمودار ۱).
 ۵. هر ۲ ساعت یکبار رقت سازی انجام شد و میزان OD اندازه گیری شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت و رسیدن مخمرها به فاز سکون نمودار OD بر حسب زمان رسم شد (نمودار ۱).
- به دست آوردن نمودار رشد باکتری (نمودار ۲):
- برای شمارش باکتری‌ها از روش رقت‌های متوالی استفاده شد. باکتری سودوموناس آئروجینوزا به محیط Brain Heart Agar تلقیح شد و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار

سوپرناتانت از متانول استفاده شد تا مشخص شود آیا متانول به عنوان حلال سوپرناتانت نیز مانع رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا می‌گردد؟ متانول ۲۰ برابر رقیق شد و بقیه مراحل مانند روش (MIC) سوپرناتانت ساکارومیسیس سرویزیه و سودوموناس آئروجینوزا، انجام شد. متانول به عنوان کنترل است (۱۸).

بررسی اثر سوپرناتانت ساکارومیسیس سرویزیه بر بیان ژن *exoS* در سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از روش Real-Time PCR: برای دو ژن *recA* و *exoS* با استفاده از نرم‌افزار Allel ID ورژن شماره ۶ پرایمرهای R, F طراحی شد.

پرایمرهای ژن *recA*:

Reverse - GTTGATGAAGATGACCAGGCA
Forward - CCTCGTCGCCTTCCTCAC

پرایمرهای ژن *exoS*:

Forward - GCGAAATCACCGACCAGTTG
Reverse - GCCGATACTCTGCTGACCT

سپس پرایمرهای طراحی شده با دستگاه ترمال سیکلر، PCR شدند تا صحت آن‌ها تأیید گردد.

استخراج Total RNA از سوسپانسیون باکتری سودوموناس آئروجینوزا با کیت RNA Protect Bacteria (آلمان QIAGEN) بود. استخراج cDNA سودوموناس آئروجینوزا با کیت QuantiTect Reverse Transcription (آلمان QIAGEN) انجام شد. cDNA کنترل (سودوموناس آئروجینوزا) و cDNA سوپرناتانت و باکتری سودوموناس آئروجینوزا با دستگاه ترمال سیکلر، PCR شدند تا وجود cDNA های به دست آمده، اثبات گردد.

سوسپانسیون باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا سه بار جداگانه با کشت خالص، سوپرناتانت مجاور شد. هر بار آزمایش Real-Time PCR با کیت QuantiTect SYBER Green PCR (آلمان QIAGEN) جهت سنجش بیان ژن *exoS* صورت گرفت. از ژن *recA* به عنوان ژن House Keeping که در شرایط مختلف میزان بیان نسبتاً ثابتی دارد استفاده شد. آزمایش Real - Time PCR با دستگاه QIAGEN آلمان مدل Rotor - Gene Q انجام شد.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد (MIC) سوپرناتانت ساکارومیسیس سرویزیه علیه سودوموناس آئروجینوزا

از روش Micro Dilution Broth استفاده شد. از استوک سوپرناتانت با غلظت $16/384 \mu\text{g/ml}$ استفاده شد. در یک ردیف از میکروپلیت در همه چاهک‌ها به جز چاهک اول 50λ محیط کشت Brain Heart Broth (کانادا QuelaB) و در چاهک اول 100λ از سوپرناتانت $16/384 \text{ mg/ml}$ ریخته شد. سپس 50λ از چاهک اول برداشته شد. به چاهک دوم اضافه به همین ترتیب 50λ از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم منتقل شد. این کار را تا چاهک دهم انجام داده و در انتها 50λ از چاهک دهم بیرون ریخته شد. در چاهک دوازدهم 50λ عصاره سوپرناتانت ریخته شد. چاهک یازدهم کنترل + و چاهک دوازدهم کنترل- بود. برای تهیه سوسپانسیون باکتریایی، تعدادی کلنی از سودوموناس آئروجینوزا در سرم فیزیولوژی حل کرده تا معادل $0/5$ مک‌فارلند حاصل گردد (۱۷). به طور میانگین غلظت 0.5 مک‌فارلند معادل $2 \times 10^8 \text{ cfu/ml}$ است. به چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۱ به میزان 50λ سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. رقت چاهک‌ها بدین صورت بود:

۱۶-۳۲-۶۴-۱۲۸-۲۵۶-۵۱۲-۱۰۲۴-۲۰۴۸-۴۰۹۶-۸۱۹۲

میکروپلیت را در انکوباتور (آلمان Memmert) با دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 16 تا 20 ساعت قرار می‌دهیم، کمترین غلظت فاقد کدورت برابر با MIC است. (۱۸).

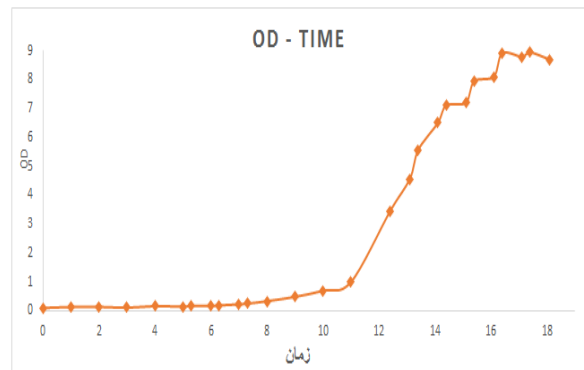
هم‌چنین از 3 چاهک اول هر ردیف در پلیت‌های حاوی محیط کشت Brain Heart Agar (آلمان Merck) کشت تهیه شد و آن‌ها را در انکوباتور (آلمان Memmert) 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت قرار داده شد تا مشخص گردد آیا MIC همان MBC است (۱۸).

تعیین حداقل غلظت بازدارنده‌ی رشد (MIC) متانول علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا

با روش Micro dilution Broth انجام شد. به جای

نتایج

نتایج نمودار رشد مخمر ساکارومیسیس سرو



نمودار ۱. OD رشد برحسب زمان، مخمر ساکارومیسیس سرویژه.

نتایج آزمایش MIC متانول با باکتری سودوموناس آئروجینوزا

متانول نتوانست مانع رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا گردد. چاهک‌های یکم تا چاهک دهم دارای کدورت بودند، یعنی باکتری‌ها در همه چاهک‌ها رشد داشتند. چاهک یازدهم کنترل مثبت و دارای رشد بود. چاهک دوازدهم هم که کنترل منفی بود شفاف و بدون رشد باکتری‌ها بود.

نتایج Real-Time PCR: عدد CT پس از آزمایش Real-Time PCR توسط کامپیوتر متصل به دستگاه (QIAGEN آلمان) به دست آمد (جدول ۱).

جدول ۱. اعداد CT

نام ژن	<i>recA</i>	<i>exoS</i>
کنترل	۱۲/۳۸	۱۲/۰۴
سوپرناتانت	۱۱/۸۵	۱۱/۷۴

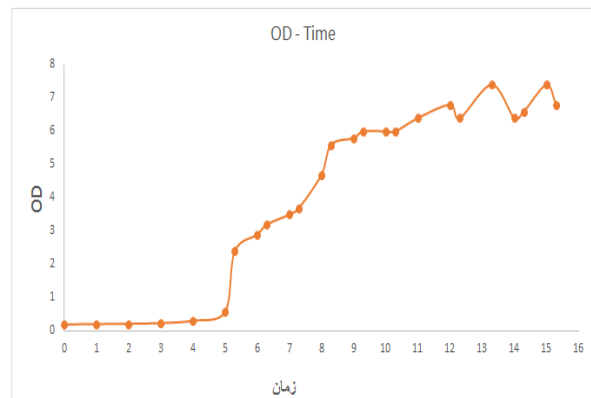
پس از به دست آمدن عدد CT و جایگذاری در فرمول Pffaffel میزان بیان ژن *exoS* باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا در طی سه بار بررسی جداگانه در مجاورت با کشت خالص و سوپرناتانت مخمر ساکارومیسیس سرویژه به دست آمد. میزان بازده نسبت بیان ژن نرمال ($2^{-\Delta\Delta CT}$) تعیین‌کننده‌ی کاهش یا افزایش بیان ژن در مجاورت سوپرناتانت است.

عدد $2^{-\Delta\Delta CT}$ بیانگر بازده بیان ژن‌ها است. اگر بزرگ‌تر از ۱ بشود، باعث افزایش بیان ژن‌های مربوطه می‌شود. اگر کوچک‌تر از ۱ باشد، باعث کاهش بیان ژن‌های مربوطه می‌شود.

بازده بیان ژن *exoS* در کشت باکتری و سوپرناتانت ۱/۷۷ بود.

با توجه به اعداد به‌دست‌آمده، سوپرناتانت مخمر ساکارومیسیس سرویژه باعث افزایش بیان ژن شده است و بر بیان ژن‌ها نه‌تنها کاهش نداشت بلکه کمک به افزایش بیان ژن *exoS* کرده بود.

نتایج نمودار رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا



نمودار ۲. OD رشد برحسب زمان باکتری سودوموناس آئروجینوزا

نتایج MIC سوپرناتانت مخمر ساکارومیسیس سرویژه با سودوموناس آئروجینوزا:

حداقل غلظت ممانعت گر رشد (MIC) برابر با $2048 \mu\text{g/ml}$ بود. در هر ۳ تکرار آزمایش نتایج MIC بدست آمد (۱۹). چاهک یازدهم کنترل مثبت و دارای رشد بود. چاهک دوازدهم کنترل منفی شفاف و بدون رشد بود.

نتایج MBC سوپرناتانت مخمر ساکارومیسیس سرویژه بر سودوموناس آئروجینوزا:

MBC برابر با MIC و $2048 \mu\text{g/ml}$ بود. همه پلیت‌هایی که از ۳ سری اول تهیه شده بود، بدون رشد کلنی بودند.

بحث

باکتری سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت طلب است. افراد ناقل این باکتری، بیماران بستری در بیمارستان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ارگانیزم را به عنوان قسمتی از فلور میکروبی طبیعی دارند (۱)، تشخیص اولیه و کنترل این پاتوژن بسیار اهمیت دارد (۲). با توجه به اهمیت سودوموناس آئروجینوزا در ایجاد عفونت‌های بیمارستانی و افزایش روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی این باکتری، شناسایی و بررسی روش‌های درمانی جدید و جایگزین الزامی است. در این میان استفاده از پروبیوتیک‌ها یک گزینه مناسب به نظر می‌رسد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیزم‌های زنده و غیر پاتوژن و دارای تأثیرات مثبت بر روی سلامت، کنترل عفونت و مدیریت و درمان بیماری‌ها هستند. ساکارومیسس سرویزیه یک مخمر پروبیوتیکی است. استفاده از میکروارگانیزم‌های بومی ایران در محصولات غذایی این مزیت را دارد که این میکروارگانیزم‌ها در طول زمان با سیستم گوارش سازش یافته‌اند و مسلماً می‌توانند اثرات بهتری را در بهبود کیفیت حیات آن‌ها نشان دهند (۲۰ و ۱۹).

Kaur و همکارش به بررسی همکاری سوپرناتانت بدون سلول لاکتوباسیلوس کریسپاتوس با آنتی‌بیوتیک‌های سیپروفلوکساسین و استرپتومایسین در شرایط In-Vitro پرداختند. نتایج بیانگر این بودند که سوپرناتانت دارای طیف وسیعی از فعالیت‌های ضد میکروبی علیه سودوموناس آئروجینوزا است. کاهش حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) به میزان ۳۰ بار برای سیپروفلوکساسین و کاهش حداقل غلظت ممانعت کنندگی (MIC) به میزان ۸ بار برای موکسی فلوکساسین و استرپتومایسین مشاهده شد (۲۱). نتایج آزمایش MIC در آن تحقیق بیانگر، حداقل غلظت ممانعت گر رشد (MIC) برابر با 2.0×10^8 g/ml بود. سوپرناتانت مخمر ساکارومیسس سرویزیه توانسته بود مانع رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا بشود که

نتایج این مطالعه احتمالاً با نتایج آزمایش Kaur و همکارش یکسان بود.

Krasowska و همکارانش به بررسی اثر رقابت‌آمیز عصاره سوپرناتانت حاصل از کشت ساکارومیسس بولاردی بر فیلامنتاسیون، ادهزین و تشکیل بیوفیلم کاندیدا آلبیکنس پرداختند. آن‌ها از سویه لاکتوباسیلوس برای استخراج سوپرناتانت استفاده کردند اما در این مطالعه از سویه ساکارومیسس سرویزیه برای استخراج سوپرناتانت استفاده شد. نتایج Krasowska و همکارانش حاکی از آن بود که اندازه فیلامنت‌های کاندیدا آلبیکنز تحت تأثیر سوپرناتانت ساکارومیسس بولاردی کاهش یافته بود و بیشتر کاندیدا آلبیکنزها تولید فیلامنت‌های کوتاه یا خیلی کوتاه کرده بودند. هم‌چنین کاندیدا آلبیکنز تولید هیف‌ها و سودوهیف‌های بسیار کوچکی کرده بودند. ضمناً با اضافه کردن عصاره سوپرناتانت ساکارومیسس بولاردی، قارچ‌های کاندیدا آلبیکنز کشته نشدند (۱۶). تأثیر سوپرناتانت مخمر پروبیوتیکی بر بیان ژن ویرولانس آگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروجینوزا احتمالاً با نتایج Krasowska و همکارانش مغایر بود، زیرا سوپرناتانت مخمر باعث افزایش بیان ژن ویرولانس آگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروجینوزا گردید.

مسئله مهم در این پژوهش این است که چرا سوپرناتانت، اثر تحریکی بر بیان ژن آگزوتوکسین S دارد؟ زیرا از غلظت $\frac{1}{2}$ MIC سوپرناتانت برای انجام این آزمایش استفاده شد. سوپرناتانت اثر تحریکی بر بیان ژن‌های مذکور داشته است، ضمن اینکه بیان ژن به طور کیفی سنجش شد.

در شرایط طبیعی احتمالاً چنین وضعی پیش نمی‌آید زیرا در کل سوپرناتانت اثر بازدارندگی روی رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا داشت.

منابع

1. Youenn A, Rozenn L, George B, Gwenaëlle L. Screening of *Lactobacillus* spp. for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections. *BMC Microbiology* 2014; 14: 107.
2. Dong D, Zou D, Liu H, Yang Z, Huang S, Liu N, Et al. Rapid detection of *Pseudomonas aeruginosa* targeting the *toxA* gene in intensive care unit patients from Beijing, China. *Frontiers in Microbiology* 2015; 6:1100.
3. Bouillot S, Attrée I, Huber P. Pharmacological activation of Rap1 Antagonizes the Endothelial Barrier Disruption Induced by Exotoxins ExoS and ExoT of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* 2015; 83: 1820–1829.
4. Soltan Dallal M, Davoudabadi A, Abdi M, Hajiabdolbaghi M, Sharifi Yazdi M, Douraghi M, et al. Inhibitory effect of *Lactobacillus plantarum* and *Lb. fermentum* isolated from the faeces of healthy infants against nonfermentative bacteria causing nosocomial infections. *New Microbes and New Infections* 2017; 15:9-13.
5. Woksepp H, Ryberg A, Billström H, Hällgren A, Nilsson L, Marklund B, Et al. Evaluation of High-Resolution Melting Curve Analysis of Ligation-Mediated Real-Time PCR, a Rapid Method for Epidemiological Typing of ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* Species) Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 52: 4339–4342.
6. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. *Medical Microbiology*. 7th Edition. United States of America: Elsevier Saunders 2013. 6-11.
7. Galle M, Jin S, Bogaert P, Haegman M, Peter Vandenaabeele P, Beyaert R. The *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System Has an Exotoxin S/T/Y Independent Pathogenic Role during Acute Lung Infection *PLoS One* 2012; 7.
8. Amirmozafari N, Fallah Mehrabadi J, Habibi A. Association of the Exotoxin A and Exoenzyme S with antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa* strains. *Archives of Iranian Medicine* 2016; 19: 353 – 358.
9. Arnoldo A, Curak J, Kittanakom S, Chevelev I, Lee V, Sahebol-Amri M, Et al. Identification of small molecule inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa* Exoenzyme S using a Yeast phenotypic screen. *PLoS Genetics* 2008; 4.
10. Singh P, Schaefer A, Parsek M, Moninger T, Welsh M, Greenberg E. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature* 2000;407: 762–764.
11. Shokri D, Khorasgani M, Mohkam M, Fatemi M, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* 2017: 1-9.
12. Aminnezhad s, Kasra-Kermanshahi R. Antibiofilm activity from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Feyz* 2014; 18(1): 30-37.
13. Pericolini E, Gabrielli E, Ballet N, Sabbatini S, Roselletti E, Cayzele Decherf A, Et al. Therapeutic activity of a *Saccharomyces cerevisiae*-based probiotic and inactivated whole yeast on vaginal candidiasis. *Virulence* 2017;8(1):74-90.
14. Karathia H, Vilaprinoy E, Sorribas A, Alves R. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism: a comparative study. *PloS one* 2011;6(2):6015.
15. Fakruddin M, Nurhossain M, Ahmed M. Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 2017; 17:64.
16. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Łukaszewicz M, Dziadkowiec D. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* On *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. *FEMS Yeast Research* 2009; 9:1312–1321.
17. Mc farland J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *Journal of the American Medical Association* 1907; (14):1176-1178.
18. Franklin R, Matthew A, Jeff A, Michael N, Geotherge M, Marry J, Et al. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically*; Approved Standard. 9th ed: Clinical and Laboratory Standards Institute 2012.

19. WHO, FAO. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada 2001; 30.
20. Walker R, Buckley M. Probiotic microbes: the scientific basis. Washington, DC: American Academy of Microbiology 2006.
21. Kaur S, Sharma P. Protease-Sensitive inhibitory activity of cell-free supernatant of *Lactobacillus crispatus* 156 Synergizes with Ciprofloxacin, Moxifloxacin and streptomycin against *Pseudomonas aeruginosa*: an in-Vitro study. Probiotics and Antimicrobial Proteins 2015; 7: 172.

The effect of supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* yeast on preventing the growth of *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and its effect on exotoxin S gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria by Real-Time PCR method

Maryam Mokari¹, Parviz Owlia^{2*}, Seyyed Mahmoud Amin Marashi³, Hourie Sadari², Zahra DehghanZadeh¹

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, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

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

Abstract

Background and Objective: *Saccharomyces cerevisiae* is one of the probiotic yeasts that has positive effects on health. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the important opportunistic pathogenic bacteria. The purpose of this study was to determine the effect of supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* on preventing the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and its effect on exotoxin S gene expression by Real-Time PCR method.

Materials and Methods: *Pseudomonas aeruginosa* was cultured in brain heart broth. Total RNA extraction was done by RNA Protect Bacteria kit and cDNA extraction was performed with QuantiTect Reverse Transcription kit. *Saccharomyces cerevisiae* was cultured in potato dextrose broth culture media and its supernatant was gained. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test for supernatant against *P. aeruginosa* was done by micro dilution broth method three times. The bacterial suspension of *P. aeruginosa* was admixed three times with pure culture, supernatant yeast. Each Real-Time PCR test was performed with a QuantiTect SYBER Green PCR kit to measure the expression of *Exotoxin S* gene.

Results: Supernatant Minimal Inhibitory Concentration (MIC) test against *Pseudomonas aeruginosa* was 2048 µg/ml. The results of Real-Time PCR test represent the *Exotoxin S* gene expression efficiency in the culture of bacteria and supernatant was 1.77.

Conclusion: Supernatant of *Saccharomyces cerevisiae* could prevent the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, but increases the expression of Exotoxin S gene in *Pseudomonas aeruginosa*, because supernatant 1/2 MIC concentrations was used and the gene expression efficiency number was greater than 1.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, Supernatant, Exotoxin S