دانشور
پزشکی

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

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

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 دهقان‌زاده[۱]

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

* نویسنده مسئول: پرویز اولیاء **E-mail: powlia@gmail.com**

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 توکسین ها و آنزیم‌های ترشحی 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 ممانعت گر رشد (MIC) سوپرناتانت علیه سودوموناس آئروجینوزا ۲۰۴۸ µg/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.

مقدمه

باکتری سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب 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 ارگانیسم را به عنوان قسمتی از فلور میکروبی طبیعی دارند. ایجاد عفونت در دستگاه تنفسی، ادراری، پوست، بافت نرم، گوش خارجی، چشم، باکترمی 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 (۵ و ٤).

سودوموناس آئروجینوزا دارای فاکتورهای ویرولانس متعددی از قبیل اجزای ساختاری، توکسین ها و همچنین آنزیم‌ها است. دارای سیستم ترشحی تیپ III برای تلقیح توکسین ها به داخل سلول میزبان می باشند. از مهم‌ترین توکسین ها و آنزیم‌های ترشحی آن می‌توان: الاستاز، اگزوتوکسین A، اگزوتوکسین S، اگزوتوکسین T، اگزوتوکسین U، اگزوتوکسین Y و فسفولیپازC را نام برد (٦).

هردو ژنوتیپ *ExoS/ExoT* و *ExoU/ExoY* در ارتباط با عفونت‌های حاد در انسان‌ها می‌باشند. همه‌ی این ٤ 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، اگزوتوکسین S را مستقیماً به درون سیتوپلاسم تزریق می‌کند تا باعث ممانعت از فعالیت سلول‌های هدف بشود. هنگامی‌که 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 پروبیوتیک ها است (۱۲).

پروبیوتیک ها میکروارگانیسم‌های زنده و غیر پاتوژن و دارای تأثیرات مثبت بر سلامت، کنترل عفونت و مدیریت و درمان بیماری‌ها هستند. شواهد بیانگر تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فرایند متابولیکی پاتوژن‌های عفونت‌زا است (۱۳). ساکارومیسس سرویزیه یک مخمر تائید شده‌ی بالینی به عنوان پروبیوتیک انسانی است. دارای تأثیرات تغذیه‌ای، تأثیرات وابسته به تغذیه، تأثیرات تنظیم ایمنی، تأثیرات ضدالتهابی و حفظ تمامیت سلولی سد اپی تلیال است (۱۵ و ١٤).

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 اگزوتوکسین S در سودوموناس آئروجینوزا طراحی شده است.

مواد و روش‌ها

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

Ibresco) تلقیح شد و در انکوباتور شیکر دار (ایران فن‌آوران گستر) با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت. باکتری سودوموناس آئروجینوزا PAO1 برای تولید اگزوتوکسین S به محیط Brain Heart Broth (کانادا Quelab) تلقیح شد و در انکوباتور (آلمان Memmert) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت (۱).

به دست آوردن نمودار رشد مخمر ساکارومیسس سرویزیه (نمودار۱):

۱. مخمر ساکارومیسس سرویزیه به محیط کشت Potato Dextrose Agar تلقیح شد و درانکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت.
۲. پس از گذشت ۲٤ 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 طول‌موج ٦۱۰ نانومتر اندازه گیری شد.
۳. میزان ٤ ml از محیط کشت Potato Dextrose Broth به ارلن حاوی ۱۰۰ml محیط کشت Potato Dextrose Broth اضافه شد. ارلن درون انکوباتور شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد.
٤. 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 ۲٤ 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 ۲٤ ساعت قرار 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 ٤ml 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 ۲٤ 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 Ibresco) در انکوباتور شیکر دار (ایران فن‌آوران گستر) ۳۰ درجه سانتی گراد با دور RPM ۱۷۰ به مدت ۱٦ تا ۱۸ ساعت کشت شد تا به انتهای فاز لگاریتمی برسد. سپس به محیط Potato Dextrose Broth (ایران Ibresco) تلقیح و در انکوباتور شیکر دار (ایران فن‌آوران گستر) ۳۰ درجه سانتی گراد با دورRPM ۱۲۰ به مدت ۲٤ ساعت قرار گرفت. با دورRPM ۵۱۷۵ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ (آلمانSigma) شد. سوپرناتانت حاصل با فیلترμ ۰/۲۲ 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 تافاز آلی استخراج شود. این کار را ٦ بار انجام شد. فاز آلی به‌دست‌آمده را درون دستگاه روتاری (آلمان Heidolph) متصل به پمپ خلأ قرار گرفت. عصاره تلخیص شده در انکوباتور (آلمان Memmert) ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲٤ ساعت خشک شد. عصاره توزین شد. در نهایت به عصاره‌ی خشک‌شده، متانول (آلمانMerck) اضافه می‌کنیم تا به غلظت نهایی mg/ml ۳۲۷/٦۸ برسد. استوک نهایی با فیلتر سرنگی μ ۰/۲۲ استریل شد تا آلودگی‌ها از بین برود (۱٦).

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

از روش Micro Dilution Broth استفاده شد. از استوک سوپرناتانت با غلظت ۱۶/۳۸۴ µg/ ml استفاده شد. در یک ردیف از میکروپلیت در همه چاهک‌ها به‌جز چاهک اول ۵۰ λ محیط کشت Brain Heart Broth (کانادا Quelab) و در چاهک اول ۱۰۰ λ از سوپرناتانت ۱۶/۳۸۴ mg/ ml ریخته شد. سپس ۵۰ λ از چاهک اول برداشته شد. به چاهک دوم اضافه به همین ترتیب ۵۰ λ از چاهک دوم برداشته و به چاهک سوم منتقل شد. این کار را تا چاهک دهم انجام داده و در انتها ۵۰λ از چاهک دهم بیرون ریخته شد. در چاهک دوازدهم ۵۰λ 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 ۰/۵ مک‌فارلند حاصل گردد (۱۷). به طور میانگین غلظت ۰.۵ مک فارلند معادل ۱۰۸ cfu/ml × ۲ -۱ است. به چاهک‌های شماره ۱ تا ۱۱ به میزان ۵۰ λ سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. رقت چاهک‌ها بدین‌صورت بود:

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

میکروپلیت را در انکوباتور (آلمانMemmert) با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ تا ۲۰ ساعت قرار می‌دهیم، کمترین غلظت فاقد کدورت برابر با MIC است. (۱۸).

هم‌چنین از ۳ چاهک اول هر ردیف در پلیت های حاوی محیط کشت Brain Heart Agar (آلمانMerck) کشت تهیه شد و آن‌ها را در انکوباتور (آلمان Memmert) ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ 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 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 ساکارومیسس سرویزیه و سودوموناس آئروجینوزا، انجام شد. متانول به عنوان کنترل است (۱۸).

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

پرایمر های ژن *recA*:

Reverse - GTTGATGAAGATGACCAGGCA
Forward – CCTCGTCGCCTTCCTTCAC

پرایمر های ژن *exoS*:

Forward - GCGAAATCACCGACCAGTTG
Reverse – GCCGATACTCTGCTGACCT

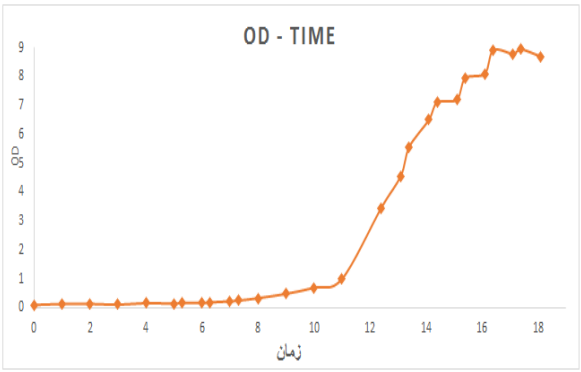
سپس پرایمرهای طراحی‌شده با دستگاه ترمال سیکلر، PCR شدند تا صحت آن‌ها تائید گردد.

استخراج Total RNA از سوسپاسیون باکتری سودوموناس آئروجینوزا با کیت RNA Protect Bacteria (آلمانQIAGEN) بود. استخراج cDNA سودوموناس آئروجینوزا با کیت QuantiTect Reverse Transcription (آلمانQIAGEN) انجام شد. cDNA کنترل (سودوموناس آئروجینوزا) وcDNA سوپرناتانت و باکتری سودوموناس آئروجینوزا با دستگاه ترمال سیکلر، PCR شدند تا وجود cDNA های به‌دست‌آمده، 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 (آلمانQIAGEN) جهت سنجش بیان ژن *exoS* صورت گرفت. از ژن *rec A* به عنوان ژن House Keeping که در شرایط مختلف میزان بیان نسبتاً ثابتی دارد استفاده شد. آزمایشReal – Time PCR با دستگاه QIAGEN آلمان مدلRotor – Gene Q انجام شد.

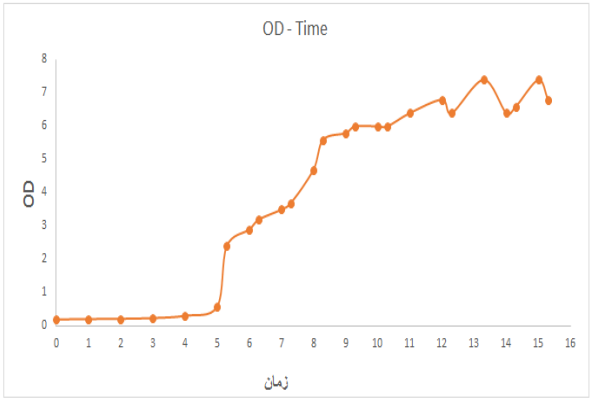
نتایج

نتایج نمودار رشد مخمر ساکارومیسس سرو



نمودار ۱. OD رشد برحسب زمان، مخمر ساکارومیسس سرویزیه.

نتایج نمودار رشد باکتری سودوموناس آئروجینوزا



نمودار ۲. OD رشد برحسب زمان باکتری سودوموناس آئروجینوزا

نتایج MIC سوپرناتانت مخمر ساکارومیسس سرویزیه با سودوموناس آئروجینوزا:

حداقل غلظت ممانعت گر رشد (MIC) برابر با ۲۰۴۸ µg/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 ساکارومیسس سرویزیه بر سودوموناس آئروجینوزا:

MBC برابر با MIC و ۲۰۴۸µg/ml بود. همه پلیت‌هایی که از ۳ سری اول تهیه شده بود، بدون رشد کلنی بودند.

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	*recA*	*exoS*
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 وسوپرناتانت مخمر ساکارومیسس سرویزیه 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 ساکارومیسس سرویزیه باعث افزایش بیان ژن شده است و بر بیان ژن‌ها نه‌تنها کاهش نداشت بلکه کمک به افزایش بیان ژن *exoS* کرده بود.

بحث

باکتری سودوموناس آئروجینوزا یک پاتوژن فرصت‌طلب است. افراد ناقل این باکتری، بیماران بستری در بیمارستان و افراد دارای نقص سیستم ایمنی ارگانیسم 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 پروبیوتیک ها یک گزینه مناسب به نظر می‌رسد. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های 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 میکروارگانیسم‌های بومی ایران در محصولات غذایی این مزیت را دارد که این میکروارگانیسم‌ها 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 با۲۰۴۸ µ 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 فیلامنت های 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 مخمرپروبیوتیکی بر بیان ژن ویرولانس اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروجینوزا احتمالاً با نتایج Krasowska و همکارانش مغایر بود، زیرا سوپرناتانت مخمر باعث افزایش بیان ژن ویرولانس اگزوتوکسین S در باکتری سودوموناس آئروجینوزا گردید.

مسئله مهم در این پژوهش این است که چرا سوپرناتانت، اثر تحریکی بر بیان ژن اگزوتوکسین S دارد؟ زیرا از غلظت $\frac{1}{2}$ MIC سوپرناتانت برای انجام این آزمایش استفاده شد. سوپرناتانت اثر تحریکی بر بیان ژن‌های مذبور 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, Gwenaelle 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 Vandenabeele 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, Cayzeele 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, Vilaprinyo 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.

Daneshvar

Medicine

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 Mokari[1], Parviz Owlia[2*], Seyyed Mahmoud Amin Marashi[3], Hourie Saderi[2], Zahra DehghanZadeh[1]

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

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

Received: 27/12/2017
Last revised: 05/02/2018
Accepted: 12/02/2018