



The Impact of *Lactobacillus plantarum* Supernatant and Colistin on Growth, Surface Hydrophobicity, Exopolysaccharide Production, and Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*

Faezeh Ebadi¹, Fatemeh Noorbakhsh^{2*}, Akram Sadat Tabatabaee Bafroee³

¹Department of Biology, ET.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Microbiology, VP.C., Islamic Azad university, Varamin-Pishva, Iran

Article Info

Article History:

Recived 2025.09.20

Revised 2025.10.17

Accepted 2025.10.18

KeyWords:

Klebsiella pneumoniae
Lactobacillus plantarum
Colistin
Biofilm
Synergistic effect

*Corresponding author:

E-mail address:

niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

Abstract

Introduction: *Klebsiella pneumoniae* is a significant bacterial pathogen, notable for its antibiotic resistance and ability to form biofilms. This study aimed to investigate the effect of *Lactobacillus plantarum* supernatant and colistin on *Klebsiella pneumoniae*, focusing on antimicrobial activity and biofilm inhibition.

Materials and Methods: In this study, 100 clinical samples were collected from patients, and 20 isolates of *Klebsiella pneumoniae* were identified using biochemical tests. Antibiotic susceptibility was determined by the antibiogram method. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for colistin and *Lactobacillus plantarum* supernatant were evaluated. The Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index, anti-biofilm activity, biofilm dispersion, cell surface hydrophobicity, and exopolysaccharide production under treatment with colistin and the supernatant were also assessed.

Results: Colistin demonstrated higher antimicrobial activity compared to *Lactobacillus plantarum* supernatant. The FIC index ranged from 0.517 to 0.827, indicating an additive effect. Biofilm formation was significantly reduced with colistin treatment compared to supernatant treatment ($p < 0.05$). Biofilm dispersion increased with the combined treatment compared to individual treatments. Cell surface hydrophobicity decreased from 62% (control) to 34% with the combined treatment. Exopolysaccharide production decreased from 473 mg (control) to 231 mg per 100 ml with the combined treatment.

Conclusion: The combination of *Lactobacillus plantarum* supernatant and colistin demonstrated enhanced antimicrobial efficacy and control of biofilm formation against *Klebsiella pneumoniae*. This synergistic approach could potentially lead to a reduction in antibiotic dosage and improved treatment outcomes for *Klebsiella pneumoniae* infections.

Cite this article: F. Ebadi, F. Noorbakhsh, A S Tabatabaee Bafroee. The Impact of *Lactobacillus plantarum* Supernatant and Colistin on Growth, Surface Hydrophobicity, Exopolysaccharide Production, and Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. Iranian Journal of Biological Sciences. 2025; 20 (1): 61-73

doi <https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1218560>

Publisher: Islamic Azad University of Varamin – Pishva branch

Print ISSN: 1735-4226

Online ISSN: 1727-459X

This is an open access article under the: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



بررسی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کلیستین بر رشد، آب گریزی سطحی، آگزوپلی ساکارید خارج سلولی، و تشکیل بیوفیلم در کلبسیلا پنومونیه

فائزه عبادی^۱، فاطمه نوربخش^{۲*}، اکرم سادات طباطبایی بفروئی^۳

^۱ گروه زیست شناسی، واحد تهران شرق، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

مقدمه: کلبسیلا پنومونیه یک باکتری بیماریزا است که به دلیل مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تشکیل بیوفیلم اهمیت بسیاری دارد. این مطالعه با هدف بررسی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کلیستین بر کلبسیلا پنومونیه، با تمرکز بر فعالیت ضد میکروبی و مهار بیوفیلم انجام شد.

مواد و روش: این مطالعه روی ۱۰۰ نمونه بالینی از بیماران انجام شد و با استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی ۲۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه جدا شد. حساسیت آنتی‌بیوتیکی با روش آنتی‌بیوگرام تعیین شد. حداقل غلظت مهارکننده و حداقل غلظت کشنده برای کلیستین و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم ارزیابی شدند. شاخص غلظت مهارکننده کسری، فعالیت ضد بیوفیلم، پراکندگی بیوفیلم، آگزیزی سطح سلول و تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی تحت تیمار با کلیستین و سوپرناتانت ارزیابی شدند.

یافته‌ها: کلیستین فعالیت ضد میکروبی بالاتری در مقایسه با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم نشان داد. شاخص مهارتی از ۰/۵۱۷ تا ۰/۸۲۷ متغیر بود که نشان دهنده اثرات افزایشی است. تشکیل بیوفیلم با تیمار کلیستین در مقایسه با تیمار سوپرناتانت به طور معنی دار کاهش نشان داد ($p < ۰/۰۵$). پراکندگی بیوفیلم با تیمار ترکیبی در مقایسه با تیمارهای تکی افزایش یافت. آگزیزی سطح سلول از ۶۲٪ (کنترل) به ۲۴٪ با تیمار ترکیبی کاهش یافت. تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی از ۴۷۳ میلی‌گرم (کنترل) به ۲۳۱ میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر با تیمار ترکیبی کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: ترکیب سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کلیستین افزایش اثربخشی ضد میکروبی و کنترل تشکیل بیوفیلم در برابر کلبسیلا پنومونیه را نشان داد. این رویکرد هم‌افزایی می‌تواند به طور بالقوه منجر به کاهش دوز آنتی‌بیوتیک و بهبود نتایج درمان برای عفونت‌های کلبسیلا پنومونیه شود.

تاریخچه مقاله

ارسال ۱۴۰۴/۰۶/۲۹

بازنگری ۱۴۰۴/۰۷/۲۴

پذیرش ۱۴۰۴/۰۷/۲۶

کلمات کلیدی

کلبسیلا پنومونیه
لاکتوباسیلوس پلانتاروم
کلیستین
بیوفیلم
مقاومت ضد میکروبی

* مسئول مکاتبات:

niloofar_noorbakhsh@yahoo.com

شیوه آدرس‌دهی این مقاله: ف عبادی، ف نوربخش، ا طباطبایی بفروئی. بررسی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کلیستین بر رشد، آب گریزی سطحی، آگزوپلی ساکارید خارج سلولی، و تشکیل بیوفیلم در کلبسیلا پنومونیه. مجله دانش زیستی ایران. ۲۰:۱۴۰۴ (۱): ۶۱-۷۳

doi: https://doi.org/10.71631/zisti.2024.1218560

نویسندگان: حق مؤلف ©

شاپا الکترونیکی: ۴۵۹ X - ۷۱۷

شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۴۲۲۶

ناشر: دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین - پیشوا

مقدمه

کلبسیلا پنومونیه یک باکتری گرم منفی کپسولدار است که در سطوح مخاطی پستانداران وجود دارد. این باکتری معمولاً اوروفارنکس و دستگاه گوارش را کلونیزه می‌کند و می‌تواند به راحتی وارد گردش خون و سایر بافت‌ها شده و باعث عفونت‌هایی مانند باکتری می، سپتیسمی، عفونت محل جراحی، عفونت دستگاه ادراری، پنومونی اکتسابی بیمارستانی و پنومونی مرتبط با دستگاه تنفس مصنوعی شود. یکی از ویژگی‌های مهم این باکتری، توانایی آن در تشکیل بیوفیلم است. بیوفیل‌ها جوامعی از باکتری‌ها هستند که در یک ماتریکس خارج سلولی متشکل از پروتئین‌ها، اگزوپلی ساکاریدها، DNA و لیپوپتیدها قرار دارند (۲۰۱).

آبگریزی سطح سلول (CSH) یک پارامتر بیوفیزیکی مهم است که بر تعامل سلول-سلول و برهمکنش سطح سلول با محیط تأثیر می‌گذارد. آبگریزی سطحی به میکروارگانیسم‌ها اجازه می‌دهد تا به قطرات هیدروکربن روی سطح سلول‌ها بچسبند و از آب به فاز آلی هیدروکربنی حرکت کنند. توانایی اتصال به سطوح برای شروع کلونیزاسیون باکتریایی بسیار مهم است (۳). اگزوپلی ساکارید (EPS) یک جزء کلیدی از ماتریکس بیوفیلم در بسیاری از باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم است و عملکرد اصلی آن نگهداری جامعه باکتریایی، تثبیت سلول‌های باکتری روی سطوح جامد و حفظ هیدراتاسیون مناسب و در دسترس بودن مواد مغذی است. کلبسیلا پنومونیه می‌تواند یک لایه ضخیم از بیوفیلم خارج سلولی تولید کند که از اتصال باکتری به سطوح زنده یا غیرزنده پشتیبانی می‌کند و از نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها محافظت کرده و اثرات آنها را کاهش می‌دهد (۴).

آنتی‌بیوتیک‌های پلی میکسین مانند کولیستین (CST) یکی از معدود عوامل ضد میکروبی هستند که علیه باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو (MDR) فعالیت دارند و آخرین خط درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها محسوب می‌شوند. پلی میکسین‌ها پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی هستند که بخش فسفات لیپوپلی ساکارید باکتریایی (LPS) را هدف قرار می‌دهند، بار منفی غشای خارجی را مختل می‌کنند و باعث مرگ سلولی می‌شوند (۶۰۵).

درمان عفونت‌های جدی با باکتری کلبسیلا پنومونیه به دلیل مقاومت همزمان به آنتی‌بیوتیک‌های متعدد،

بسیار دشوار است بنابراین، نیاز فوری به استراتژی‌های درمانی جدید برای این گروه‌های حیاتی از باکتری‌های بیماری‌زا وجود دارد. کودکان در برابر عوارض ناشی از آنتی‌بیوتیک‌ها مانند کولیستین آسیب‌پذیرتر هستند. در کارآزمایی برای یافتن گزینه‌های درمانی غیر آنتی‌بیوتیکی، امروزه درمان با پروبیوتیک در حال افزایش است (۴).

لاکتوباسیل‌ها یکی از مهمترین پروبیوتیک‌ها هستند که به طور کلی به عنوان یک عامل درمانی بیولوژیکی ایمن (GRAS) شناخته می‌شوند و همچنین برای تقویت پاسخ‌های ایمنی میزبان استفاده می‌شوند. مکانیسم‌های مختلفی وجود دارد که لاکتوباسیل‌ها می‌توانند فعالیت ضد میکروبی خود را اعمال کنند، از جمله تولید ترکیبات بازدارنده، تحریک سیستم ایمنی، رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا برای اتصال گیرنده و رقابت بر روی مواد مغذی. ترکیبات بازدارنده تولید شده توسط لاکتوباسیل‌ها شامل اسیدهای آلی مانند اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید فرمیک یا باکتریوسین‌ها هستند. لاکتوباسیل‌ها از طریق این مکانیسم‌های ضد میکروبی، فعالیت‌های آنتاگونیستی را علیه باکتری‌های بیماری‌زای مختلف از جمله انتروباکتریاسه‌های مقاوم به کاربپنم نشان داده‌اند (۸۰۷).

درمان ترکیبی سوپرناتانت باکتری پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک، به دلیل خواص ضدباکتریایی و ضدالتهابی آنها برای جلوگیری از افزایش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و نیز به عنوان یک راه حل جایگزین برای کاهش استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های شیمیایی بسیار مهم است (۵). با ترکیب کلیستین با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس، می‌توان به کاهش مصرف کلیستین و همچنین پیشگیری از ایجاد مقاومت در برابر آن کمک کرد. آبگریزی سطحی، اگزوپلی ساکارید خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم از عوامل مهم در بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه هستند. در این پژوهش، تأثیر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و آنتی‌بیوتیک کولیستین بر آبگریزی سطحی، اگزوپلی ساکارید خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم در کلبسیلا پنومونیه مورد مطالعه قرار گرفت

مواد و روش ها

این مطالعه با کد اخلاق IR.IAU.ET.REC.1403.050 انجام شده است. در این مطالعه تعداد ۱۰۰ نمونه بالینی مشکوک به عفونت کلبسیلا پنومونیه جدا شده از ادرار و خون بیماران مراجعه کننده به بیمارستان های شهر تهران (میلا، شریعتی و امام خمینی) از تاریخ مهر تا اسفند ۱۴۰۲ جدا سازی شد. نمونه ها روی محیط EMB و مک کانکی کشت داده شد، سپس کشت ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند و از کشت های تازه جهت تست های افتراقی مانند رنگ آمیزی گرم، کشت در محیط های MRVP، TSI، SIM، اوره آز و سیمون سیترات برای تأیید کلبسیلا پنومونیه انجام شد. بعد از انجام تست های افتراقی تعداد ۲۰ سویه جدا شد

تهیه ی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم

سویه لاکتوباسیل از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی (ATCC 14917) تهیه شد. برای تهیه ی محلول رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم، باکتری ها به محیط کشت مایع (MRS (de Man, Rogosa, and Sharpe) تلقیح شده و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و در شرایط بی هوازی انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کشت باکتریایی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و با سرعت $g \times 10000$ سانتریفیوژ شد تا سلول های باکتریایی ته نشین شوند. سپس محلول رویی با دقت جمع آوری شد و اطمینان حاصل شد که هیچ سلول باکتریایی به آن منتقل نشده باشد. در ادامه، محلول رویی با استفاده از فیلتر غشایی ۰/۲۲ میکرومتری استریل شد تا هرگونه باکتری باقی مانده حذف شود. محلول رویی بدون سلول (CFS) حاصل در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. قبل از انجام آزمایش ها، pH محلول رویی به حالت خنثی (pH=7) تنظیم شد تا تاثیر اسیدیته حذف شود و اطمینان حاصل شود که هرگونه اثر مشاهده شده بر روی کلبسیلا پنومونیه به دلیل متابولیت های ضد میکروبی است

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)

برای تعیین MIC از روش سریال دایلوژن به صورت سه تکرار در محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) استفاده شد. بدین صورت که ابتدا به تمامی چاهک های مورد مطالعه ۱۰۰ میکرولیتر از محیط MHB افزوده شد. سپس

به چاهک های ردیف اول ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم با غلظت ۱۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر اضافه شد و به روش سریال دایلوژن تا آخرین چاهک مورد مطالعه رقیق سازی انجام گردید. در انتها ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری کلبسیلا پنومونیه با غلظت 10^1 (۱/۱۰۰) کدورت نیم مک فارلند) به تمامی چاهک های مورد مطالعه افزوده شد. برای هر پلیت یک چاهک کنترل مثبت (محیط کشت و سوسپانسیون باکتری) و یک چاهک کنترل منفی (محیط کشت) استفاده شد. پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه تیمار شدند. تمامی این مراحل برای آنتی بیوتیک کولیسستین (با غلظت ۷/۵ میکروگرم در میلی لیتر) نیز انجام شد. نهایتاً، کدورت تمام چاهک ها با استفاده از دستگاه الیزا در طول موج ۶۲۰ نانومتر خوانش شدند.

بررسی تشکیل بیوفیلم در سویه های جمع آوری شده به روش میکروتیتر پلیت

ابتدا محیط کشت (TSB) (Tryptic Soy Broth) حاوی ۲٪ گلوکز تهیه و استریل گردید. برای تهیه سوسپانسیون باکتری، سویه های مورد مطالعه در مقداری از محیط TSB حاوی ۲٪ گلوکز به کدورت نیم مک فارلند رسانده شد. در انتها در یک پلیت ۹۶ خانه به هر چاهک سوسپانسیون باکتری یاد شده اضافه شد. ۳ چاهک کنترل منفی که در آن باکتری اضافه نشده بود (عدم رشد باکتری در نتیجه عدم تشکیل بیوفیلم) و ۳ چاهک کنترل مثبت که حاوی باکتری بود (رشد باکتری و تشکیل بیوفیلم) در پلیت استفاده شد. جهت بررسی اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس بر تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه، بعد از تهیه سوسپانسیون نیم مک فارلند از سویه های مورد مطالعه در محیط کشت TSB حاوی ۲٪ گلوکز در هنگام اضافه کردن سوسپانسیون باکتری به چاهک ها، غلظت MIC سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز به چاهک ها اضافه شد. سپس پلیت ها ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردید (۱۰)

روش رنگ آمیزی برای مطالعه بیوفیلم

ابتدا محیط کشت ها از داخل چاهک ها دور ریخته شد. چاهک ها ۱ الی ۲ بار با بافر PBS شستشو داده شد

هر چاهک حل شد. جذب در ۵۷۰ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش میکروپلیت برای تعیین مقدار پراکندگی بیوفیلیم اندازه‌گیری شد. درصد پراکندگی بیوفیلیم با مقایسه جذب چاهک‌های تیمار شده با چاهک‌های کنترل تعیین شد. همه آزمایش‌ها به صورت سه تایی انجام شدند تا تکرارپذیری تضمین شود. فرمول محاسبه درصد پراکندگی بیوفیلیم به صورت زیر است

$$\text{درصد پراکندگی بیوفیلیم} = \frac{AC - AT}{AC} \times 100$$

که در آن، AC: جذب کنترل (بیوفیلیم بدون تیمار) در ۵۷۰ نانومتر و AT: جذب چاهک تیمار شده (با مایع رویی، کولیستین، یا ترکیب هر دو) در ۵۷۰ نانومتر (۱۰)

تعیین شاخص FIC

برای تعیین شاخص FIC (غلظت مهاري کسري) سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین در برابر کلبسیلا پنومونیه، از روش رقیق‌سازی میکروپلیت به صورت شطرنجی استفاده شد. ابتدا، سوپرناتانت با کشت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، سانتی‌فیوژ و فیلتر کردن تهیه شد. همچنین محلول استوک کولیستین نیز تهیه شد. سپس، رقت‌های سریالی دو برابری از کولیستین و سوپرناتانت در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای تهیه شده و سپس سوپانسیون کلبسیلا پنومونیه به آن اضافه شد. پس از ۳ روز انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵٪ CO₂، MIC (حداقل غلظت مهاري) کولیستین و سوپرناتانت به تنهایی و در ترکیب با یکدیگر، با بررسی بصری کدورت و اندازه‌گیری OD₆₀₀ تعیین شد. در نهایت، شاخص FIC با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۱)

$$FIC = \frac{\text{ترکیب کولیستین با سوپرناتانت}}{MIC} + \frac{\text{ترکیب کولیستین با سوپرناتانت}}{MIC}$$

بر اساس نتیجه، تعامل به صورت هم‌افزایی، افزایشی، بی‌تفاوت یا آنتاگونیستی صورت زیر تفسیر می‌شود

$0.5 \leq FIC \leq 1$ هم‌افزایی $0.5 < FIC \leq 1$ افزایشی (Additive)،
 $1 < FIC \leq 4$ بی‌تفاوت (Indifferent)، $FIC > 4$ آنتاگونیستی (Antagonistic)

بعد از شستشوی مرحله قبل و خالی کردن چاهک‌ها به چاهک‌ها متانول مطلق افزوده و در دمای اتاق انکوبه گردید سپس متانول دور ریخته شد و پلیت ثابت گذاشته شد تا الکل از آن حذف شود. به چاهک‌ها کریستال ویوله ۱٪ اضافه گردید و در دمای اتاق انکوبه شد. با آب مقطر چاهک‌ها شستشو داده شد تا رنگ اضافی حذف گردد. در انتها چاهک‌ها خالی گردید. به هر یک از چاهک‌ها استیک اسید گلاسیال ۳۳٪ افزوده شد و بعد از گذشت ۲۰ دقیقه پلیت با دستگاه الیزا ریدر با طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد. برای بررسی نتایج از روش Optical density cut-off (ODc) استفاده گردید. به منظور بررسی طبق فرمول زیر محاسبه انجام گرفت (۱۰)

+ میانگین OD چاهک‌های کنترل منفی = ODc
 (انحراف معیار چاهک‌های کنترل منفی $\times 3$)
 بعد از محاسبه ی ODc یا کات اف، OD چاهک‌های مورد مطالعه به صورت زیر دسته بندی گردید (۹)

بیوفیلیم قوی $OD > 4 \times ODc$ ، بیوفیلیم متوسط $ODc < OD \leq 4 \times ODc$ ، بیوفیلیم ضعیف $OD < OD \leq 2 \times ODc$ و بیوفیلیم منفی $OD \leq ODc$

ارزیابی پراکندگی بیوفیلیم

پس از تشکیل بیوفیلیم کلبسیلا پنومونیه، سلول‌های پلانکتونی با شستشوی ملایم چاهک‌ها سه بار با ۲۰۰ میکرولیتر محلول نمکی فسفات (PBS) حذف شدند. برای ارزیابی پراکندگی بیوفیلیم، ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، کولیستین یا ترکیبی از هر دو به چاهک‌ها اضافه شد، که شامل کنترل‌های مناسب مانند کنترل مثبت (بیوفیلیم بدون تیمار با ماده)، کنترل منفی (محیط کشت استریل بدون باکتری)، کنترل سوپرناتانت (فقط سوپرناتانت و محیط کشت)، کنترل کولیستین (فقط کولیستین و محیط کشت)، پلیت به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شد تا پراکندگی بیوفیلیم رخ دهد. پس از انکوباسیون، محلول‌های تیمار حذف شدند و چاهک‌ها سه بار با PBS شسته شدند. بیوفیلیم باقی مانده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله ۱٪ به هر چاهک رنگ‌آمیزی شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس چاهک‌ها سه بار با PBS شسته شدند تا رنگ اضافی حذف شود و کریستال ویوله متصل شده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۵٪ یا اسید استیک ۳۰٪ به

ارزیابی آب گریزی سطح سلول (CSH)

برای ارزیابی آب گریزی سطح سلول (CSH)، از روش چسبندگی میکروبی به حلال (MATS) با استفاده از هگزادکان به عنوان حلال استفاده شد. باکتری کلبسیلا پنومونیه در محیط کشت تریپتیک سوی براث (TSB) حاوی غلظت زیرمهارى سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم یا کولیسیتین به مدت 24 ساعت کشت داده شد. پس از انکوباسیون، سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ در 7000 دور در دقیقه به مدت 5 دقیقه جمع‌آوری و یک بار با محلول نمکی فسفات (PBS) شستشو داده شدند تا محیط کشت باقی مانده حذف شود. سپس یک سوسپانسیون باکتریایی در PBS تهیه شد و چگالی نوری (OD) در ۶۰۰ نانومتر به ۰/۳ (OD1) تنظیم شد. به ۰/۸ میلی‌لیتر هگزادکان به ۵/۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون باکتریایی اضافه شد و مخلوط ورتکس شد تا امولسیون ایجاد شود. پس از یک دوره انکوباسیون ۲۰ دقیقه‌ای که اجازه جداسازی فاز را می‌دهد، OD فاز آبی در ۶۰۰ نانومتر (OD2) اندازه‌گیری شد. یک گروه کنترل متشکل از کلبسیلا پنومونیه کشت داده شده بدون سوپرناتانت یا کولیسیتین برای مقایسه استفاده شد. سپس CSH به صورت درصد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۲)

$$CSH\% = 1 - (OD2/OD1) \times 100$$

ارزیابی محتوای پلی‌ساکارید خارج سلولی (EPS)

برای این آزمایش ابتدا، کلبسیلا پنومونیه در محیط کشت لوریا-برتانی کشت داده شد و به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با تکان دادن (با سرعت rpm ۱۵۰) انکوبه شد. سپس، کشت باکتری به چند قسمت

مساوی تقسیم شد و هر قسمت تحت تیمار متفاوتی قرار گرفت: کنترل منفی (بدون تیمار، فقط محیط کشت و باکتری)، تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، تیمار با کولیسیتین و تیمار ترکیبی با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیسیتین. کشت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ °C درجه با تکان دادن انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، کشت‌ها با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند تا سلول‌های باکتریایی رسوب کنند و مایع رویی حاوی EPS جمع‌آوری شد. برای رسوب EPS، به مایع رویی سه برابر حجم اتانول مطلق سرد (ترجیحاً در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد) اضافه شد و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد تا EPS به طور کامل رسوب کند. سپس EPS رسوب کرده با سانتریفیوژ در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ °C سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل به دقت خشک و سپس در حجم ۱ میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. برای تعیین مقدار EPS، از روش فنل-سولفوریک اسید استفاده شد. به طور خلاصه، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه EPS حل شده با ۲۰۰ میکرولیتر محلول فنل ۵٪ مخلوط شد. سپس ۱ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ (۹۵-۹۸٪) به آرامی و با احتیاط به مخلوط اضافه شد. لوله به خوبی ورتکس شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد تا واکنش رنگی کامل شود. جذب نوری (OD) در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. غلظت EPS با مقایسه جذب نمونه‌ها با منحنی استاندارد گلوکز محاسبه شد. نتایج به صورت میکروگرم در میلی‌لیتر EPS بیان شدند (۱۳)

آنالیز آماری

استفاده شد. برای مقایسه‌های دوتایی، در صورت لزوم از آزمون t مستقل استفاده شد. مقدار p کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد. تمام تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزارهای آماری SPSS (نسخه ۲۵) انجام شد

برای تحلیل داده‌ها از روش‌های آماری مختلفی استفاده شد. داده‌های به‌دست‌آمده از سنجش‌های مهار رشد، آزمایش‌های آبرگریزی سطحی، کمی‌سازی پلی‌ساکارید خارج سلولی (EPS) و سنجش‌های تشکیل بیوفیلم ابتدا با استفاده از آزمون Shapiro-Wilk از نظر نرمال بودن بررسی شدند. سپس داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) از حداقل سه آزمایش مستقل بیان شدند. برای ارزیابی اهمیت آماری تفاوت‌ها بین گروه‌های تیمار شده و کنترل، از تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) و به دنبال آن آزمون post-hoc Tukey

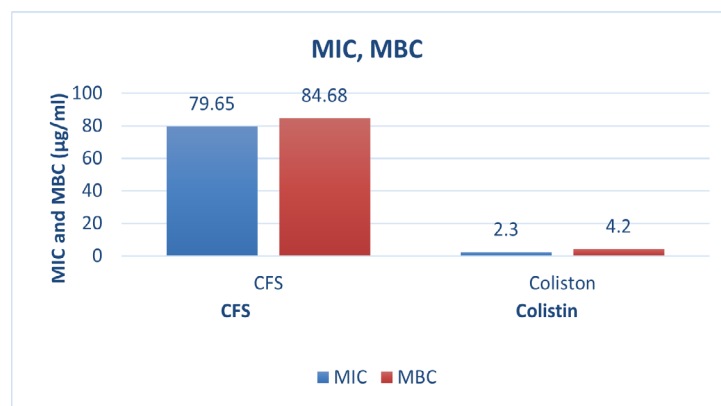
نتایج

از مجموع ۱۰۰ نمونه مورد بررسی از نمونه های بیمارستانی، ۲۰ جدایه با استفاده از تست های تشخیصی افتراقی کلبسیلا تشخیص داده شدند

نتایج MIC ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

آنالیزهای حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) کولیستین و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در ۲۰ جدایه کلبسیلا پنومونیه، حساسیت های متفاوتی را نسبت به هر دو عامل ضد میکروبی نشان داد. کولیستین MIC های را در محدوده

۰/۹۳۷ $\mu\text{g/ml}$ تا ۳/۷۵ (میانگین ۱/۴۵ $\mu\text{g/ml}$) و MBC های را از ۰/۹۳۷ $\mu\text{g/ml}$ تا ۷/۵ (میانگین ۲/۸۱ $\mu\text{g/ml}$) نشان داد. سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم طیف وسیع تری از MIC ها (۹/۳۷ تا ۱۵۰؛ میانگین ۸۱/۰۹ $\mu\text{g/ml}$) و MBC ها (۹/۳۷۵ تا ۱۵۰) را نشان داد نتایج کمی و آزمون آماری نشان می دهند که کولیستین از حیث هر دو شاخص MIC و MBC به طور معنی داری ($p < 0/05$) مؤثرتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم است (نمودار ۱)



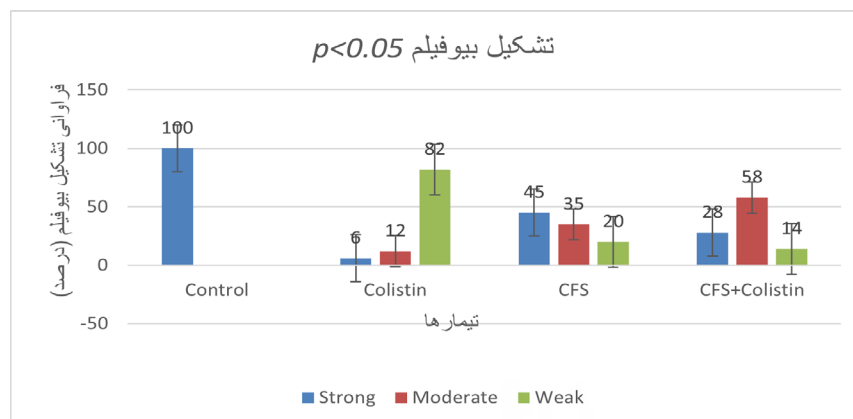
نمودار ۱. مقادیر میانگین MIC و MBC کولیستین و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم برای ایزوله های کلبسیلا پنومونیه

برای بررسی مهار تشکیل بیوفیلم در سویه های مورد مطالعه از غلظت های MIC ۱/۲ سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین استفاده شد. میزان تشکیل بیوفیلم سویه های مورد مطالعه پس از تیمار با غلظت MIC ۱/۲ سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم به صورت بیوفیلم قوی با ۴۵٪، بیوفیلم متوسط با ۳۵٪ و بیوفیلم ضعیف ۲۰٪ فراوانی مشاهده شد کاهش بیوفیلم «قوی» در مقایسه با کنترل در سطح $p < 0/05$ معنی دار بود. پس از تیمار با غلظت MIC ۱/۲ کولیستین به صورت، بیوفیلم قوی با ۶٪، بیوفیلم متوسط ۱۲٪ و بیوفیلم ضعیف ۸۲٪ فراوانی مشاهده شد این تغییرات در مقایسه با گروه کنترل در سطح $p < 0/05$ معنی دار بودند. ترکیب MIC ۱/۲ کولیستین با سوپرناتانت با فراوانی بیوفیلم قوی ۲۸٪، بیوفیلم متوسط ۵۸٪ و بیوفیلم ضعیف ۱۴٪ مشاهده شد مقایسه پس از آزمون (Tukey) نشان داد که این کاهش در برابر هر سه تیمار دیگر در سطح $p < 0/05$ معنی دار است.

شاخص غلظت مهارکننده جزئی (FIC)

شاخص های FIC برای ایزوله های آزمایش شده از ۰/۵۱۷ تا ۰/۸۲۷ با میانگین شاخص FIC ۰/۷۵۹ متغیر بود. که نشان دهنده تعامل افزایشی بین سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین است. قابل ذکر است که هیچ یک از ایزوله ها تعاملات بی تفاوت یا آنتاگونیستی را نشان ندادند. این نتایج نشان می دهد که ترکیب سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم با کولیستین می تواند به طور بالقوه اثربخشی آنتی بیوتیک را در برابر کلبسیلا پنومونیه افزایش دهد، که به طور بالقوه امکان دوزهای کمتر کولیستین را فراهم می کند و خطر سمیت مرتبط را کاهش می دهد.

اثر سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین بر تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه در مطالعه حاضر تمامی سویه های کلبسیلا پنومونیه مورد بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم قوی را نشان دادند.

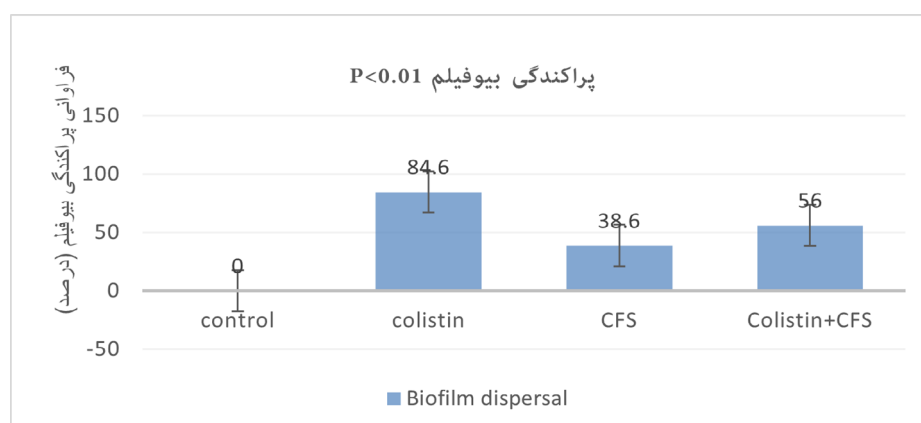


نمودار ۲. تشکیل بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین و ترکیب آنها

سنجش پراکندگی بیوفیلم

نتایج سنجش پراکندگی بیوفیلم، اثربخشی مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین را به صورت جداگانه و ترکیبی، بر تخریب بیوفیلم تشکیل شده توسط کلبسیلا پنومونیه نشان می‌دهد. نمونه کنترل چگالی نوری نسبتاً بالایی در ۵۷۰ نانومتر (۰/۱۵) نشان داد که نشان‌دهنده حضور قابل توجه بیوفیلم است. تیمار با $MIC 1/2$ کولیستین اثر قوی پراکندگی بیوفیلم با فراوانی 84.6% نسبت به گروه کنترل را نشان داد. $MIC 1/2$ سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم نیز پراکندگی 38.6% را نشان داد. به طور قابل توجهی، ترکیب $MIC 1/2$ کولیستین و $MIC 1/2$ CFS پراکندگی 56% را نشان می‌دهد و نشان‌دهنده اثر هم‌افزایی بین دو تیمار است. کاهش جزئی در بیوفیلم

توسط تیمار ترکیبی نشان می‌دهد که در حالی که کولیستین به تنهایی بسیار موثر است، افزودن مایع رویی نشان می‌دهد که در حالی که هم کولیستین و هم مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم به طور مستقل تشکیل بیوفیلم را مختل می‌کنند، ترکیب آنها ممکن است یک استراتژی درمانی بالقوه برای افزایش پراکندگی بیوفیلم در کلبسیلا پنومونیه ارائه دهد و احتمالاً مقاومت باکتریایی مرتبط با عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم را کاهش دهد. آزمون چندمقایسه‌ای Tukey نشان داد که ترکیب در مقایسه با هر سه گروه دیگر (و همچنین هر دو تیمار منفرد در مقایسه با کنترل) تفاوت معنی‌دار دارد ($p < 0.01$).

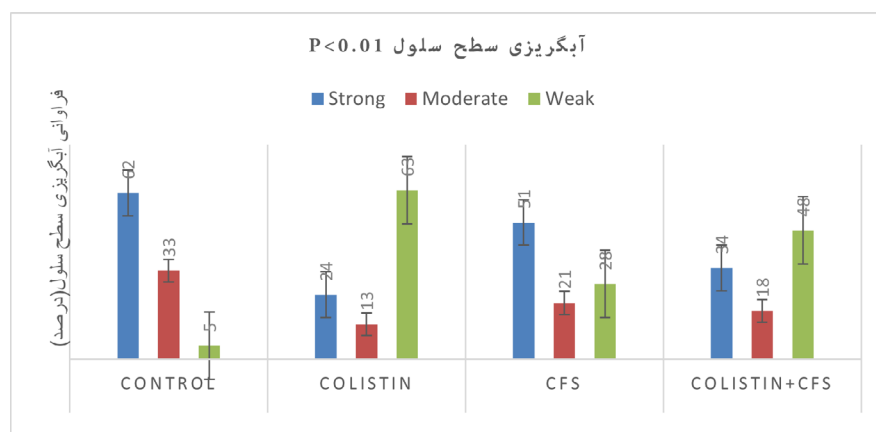


نمودار ۳. سنجش پراکندگی بیوفیلم کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین و ترکیب آنها

سنجش آب گریزی سطح سلول

نتایج سنجش آب گریزی سطح سلول تغییرات قابل توجهی را در خواص سطحی کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین، به صورت جداگانه و ترکیبی، نشان می‌دهد. نمونه کنترل آبگریزی بالایی معادل ۶۲٪ قوی، ۳۳٪ متوسط و ۵٪ ضعیف را نشان داد که نشان‌دهنده خاصیت آب گریزی قوی است که معمولاً با افزایش چسبندگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلم مرتبط است. تیمار با ۱/۲ MIC کولیستین منجر به کاهش قابل توجه آب گریزی به ۲۴٪ قوی، ۱۳٪ متوسط و ۶۳٪ ضعیف شد که نشان می‌دهد کولیستین به طور موثر آب گریزی کلبسیلا پنومونیه را کاهش می‌دهد و به طور بالقوه توانایی آن را برای چسبیدن به سطوح و تشکیل بیوفیلم را مختل می‌کند این تغییر در

سطح $p < 0/05$ نسبت به کنترل معنی‌دار بود. سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در غلظت MIC ۱/۲ نیز آبگریزی سطح سلول را کاهش داد، که به صورت ۵۱٪ قوی، ۲۱٪ متوسط و ۲۸٪ ضعیف مشاهده شد $p < 0/05$ ، سوپرناتانت تأثیر متوسطی بر آب گریزی سطحی کلبسیلا پنومونیه دارد. تیمار ترکیب MIC ۱/۲ کولیستین و ۱/۲ MIC سوپرناتانت منجر به ایجاد آبگریزی سطحی به صورت ۳۴٪ قوی، ۱۸٪ متوسط و ۴۸٪ ضعیف شد که نشان‌دهنده کاهش بیشتر آبگریزی در مقایسه با سوپرناتانت به تنهایی است، اما به اندازه کولیستین به تنهایی مشخص نیست. اختلاف این مقادیر با هر سه گروه دیگر در آزمون Tukey در سطح $p < 0/01$ معنی‌دار بود (مُودار۴)

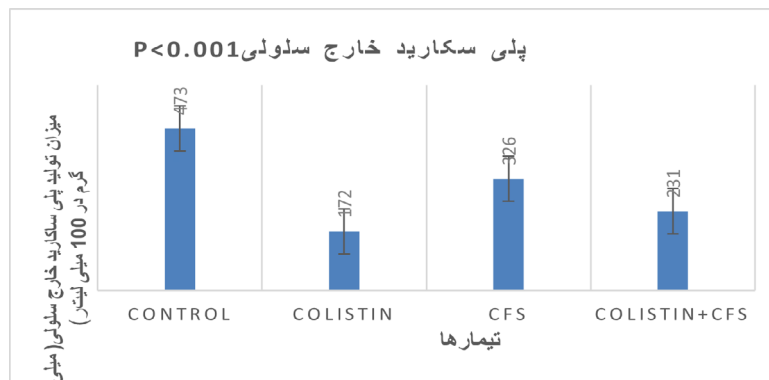


مُودار۴. سنجش آب گریزی سطح سلول کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین و ترکیب آنها

تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی

تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی (EPS) نشان داد که قرار گرفتن در معرض کولیستین و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، به طور معنی‌داری محتوای EPS را در کلبسیلا پنومونیه کاهش می‌دهد. گروه کنترل بیشترین میزان تولید EPS (473 ± 32 میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت) را نشان داد که بیانگر سنتز قوی EPS در شرایط رشد استاندارد است. تیمار با MIC ۱/۲ کولیستین منجر به کاهش تولید EPS (172 ± 15 میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) شد که نشان‌دهنده اثر مهار آنتی‌بیوتیک بر سنتز EPS است. همچنین، قرار گرفتن در معرض MIC ۱/۲ سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم منجر به کاهش محتوای EPS (326 ± 12 میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر)

شد که نشان‌دهنده وجود عوامل مهارکننده EPS در سوپرناتانت است. تیمار ترکیب MIC ۱/۲ کولیستین و ۱/۲ MIC سوپرناتانت منجر به کاهش EPS (231 ± 9 میلی‌گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر) در سطح تولید شد که کمتر از سوپرناتانت به تنهایی اما بیشتر از کولیستین به تنهایی بود. این مشاهده نشان‌دهنده یک اثر هم‌افزایی بالقوه، هرچند نه کاملاً افزایشی، از دو تیمار در کاهش تولید EPS در کلبسیلا پنومونیه است. تحلیل واریانس یک‌طرفه که روی مقادیر EPS چهار گروه انجام شد، اختلاف میانگین‌ها را به طور بسیار معنی‌داری تأیید کرد ($p < 0/001$). (مُودار۵)



نمودار ۵. تولید پلی ساکراید خارج سلولی سلول کلبسیلا پنومونیه پس از تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین و ترکیب آنها

بحث

(۱۶و۱۵) با این حال، ظهور مقاومت به کولیستین یک نگرانی رو به رشد است (۱۷). تحقیقات Oelschlaeger (۲۰۱۰) و دیگران به پتانسیل ضد میکروبی سویه های پروبیوتیک اشاره کرده است (۱۸). نتایج مطالعه حاضر که اثربخشی قابل ملاحظه مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم را نشان می دهد با این تنوع مطابقت دارد، که نشان می دهد همه سویه های پروبیوتیک یا متابولیت های آنها دارای خواص ضد باکتریایی قوی نیستند

هم افزایی مشاهده شده بین کولیستین و مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم می تواند به چندین مکانیسم بالقوه نسبت داده شود. یک احتمال این است که ترکیبات مایع رویی ممکن است نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری را تغییر دهند، کولیستین آنتی بیوتیکی است که بر هم ریختگی در غشاء خارجی در دیواره باکتری و غشاء سیتوپلاسمی ایجاد می کند و در نتیجه تعامل این دو عامل موجب از بین رفتن باکتری می گردد. Gao و همکاران نیز نشان دادند برخی از ترکیبات زیست فعال می توانند غشاهای باکتریایی را مختل کنند (۱۹). این مطالعات نشان می دهد ترکیب آنتی بیوتیک ها و ترکیبات زیست فعال لاکتوباسیل ها می تواند یک رویکرد جدید برای درمان بیماری های عفونی و درمان های ضد میکروبی در باکتری های بیماری زای بیمارستانی مقاوم به چند دارو باشد در این مطالعه خواص ضد بیوفیلم سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم و کولیستین در برابر کلبسیلا پنومونیه پرداخته شد و بر توانایی هر دو عامل در مهار و پراکنده کردن بیوفیلم ها تأکید می کند. در نمونه های کنترل تیمار نشده، تشکیل قوی بیوفیلم مشاهده شد. تیمار با کولیستین به طور قابل توجهی تشکیل بیوفیلم را کاهش داد و به حالت تشکیل بیوفیلم

کلبسیلا پنومونیه، یک پاتوژن (عامل بیماری زا) مضر، مسئول انواع عفونت ها، به ویژه در افراد دارای نقص ایمنی است و توانایی آن در ایجاد مقاومت به آنتی بیوتیک های متعدد، از جمله گزینه های آخرین راه حل مانند کولیستین، منجر به شکست درمان و افزایش میزان مرگ و میر شده است. ظهور سویه های مقاوم به چند دارو (MDR) بر فوریت نیاز به رویکردهای جدید برای مبارزه با این پاتوژن تأکید می کند. در این زمینه، استفاده از مواد مشتق شده از پروبیوتیک ها، مانند سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم، به دلیل خواص ضد میکروبی بالقوه شان مورد توجه قرار گرفته است. لاکتوباسیلوس پلانتاروم به دلیل توانایی خود در تولید ترکیبات زیست فعال که می توانند رشد و عوامل بیماری زای مختلف را مهار کنند، شناخته شده است (۱۴). نتایج حداقل غلظت مهارکننده (MIC) و حداقل غلظت کشنده (MBC) نشان داد که کولیستین مؤثرتر از سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم است، این مطالعه همچنین تعامل بین این دو عامل را از طریق شاخص غلظت مهارکننده کسری (FIC) بررسی کرد، که عمدتاً اثر افزایشی را نشان داد، و برخی از جدایه ها هم افزایی را نشان دادند. این تعاملات هم افزایی نشان می دهد که مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم می تواند اثربخشی کولیستین را افزایش دهد، که به طور بالقوه امکان کاهش دوزها و به حداقل رساندن خطرات سمیت را فراهم می کند

با مقایسه این نتایج با مطالعات قبلی، آشکار است که کولیستین همچنان یک آنتی بیوتیک قوی آخرین راه حل در برابر کلبسیلا پنومونیه مقاوم به چند دارو است، همانطور که در مطالعات مختلف مستند شده است

در همین حال، سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم منجر به کاهش بیوفیلیم و تبدیل آن از حالت قوی به متوسط شد. قابل ذکر است که ترکیب هر دو عامل نیز تشکیل بیوفیلیم را بیشتر کاهش داد و به حالت ضعیف رسید، که نشان دهنده تعامل هم‌افزایی است که اثرات مهاری آنها را افزایش می‌دهد. سنجش پراکندگی بیوفیلیم این یافته‌ها را تأیید کرد، جایی که کولیستین به تنهایی حضور بیوفیلیم را به حالت ضعیف کاهش داد و توانایی‌های پراکندگی قوی را نشان داد. این نتایج هم‌راستا با مطالعه Bayatinejad به پتانسیل این عوامل به عنوان عوامل موثر در کاهش تشکیل بیوفیلیم و به عنوان یک استراتژی در درمان عفونت با کلبسیلا پنومونیه دلالت دارد (۱۹). تحقیقات نشان داده‌اند که برخی متابولیت‌های تولیدشده توسط پروبیوتیک‌ها، مانند اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و ترکیبات ضد میکروبی دیگر، قادرند بیوفیلیم‌های باکتریایی را به طور مستقیم یا غیرمستقیم مختل کنند. این اختلال می‌تواند شامل تغییر در چسبندگی سلولی، کاهش تولید پلی‌ساکاریدهای ماتریکس یا تخریب کامل ساختار بیوفیلیم باشد (۲۰). نتایج سنجش CSH نشان می‌دهد که کلبسیلا پنومونیه تیمار نشده سطح آبریزی بالایی را نشان می‌دهد که ارتباط نزدیکی با ظرفیت آن برای افزایش چسبندگی و تشکیل بیوفیلیم دارد. تیمار با کولیستین به طور قابل توجهی CSH را کاهش داد، که نشان می‌دهد کولیستین به طور مؤثر ماهیت آبریز سطح سلول را مختل می‌کند و به طور بالقوه توانایی باکتری‌ها را برای چسبیدن و تشکیل بیوفیلیم مختل می‌کند. در همین حال، تیمار با سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم به تنهایی CSH به طور متوسطی کاهش داد. با این حال، ترکیب کولیستین و سوپرناتانت اثر افزایشی بر CSH نشان داد، اگرچه به اندازه کولیستین به تنهایی مؤثر نیست. این کاهش متوسط نشان می‌دهد که تیمار ترکیبی ممکن است مزایای بیشتری در کاهش چسبندگی باکتری در مقایسه با مایع رویی به تنهایی ارائه دهد.

علاوه بر این، تجزیه و تحلیل تولید پلی‌ساکارید خارج سلولی نشان داد که کلبسیلا پنومونیه تیمار نشده ۴۷۳ میلی‌گرم EPS در ۱۰۰ میلی‌لیتر کشت تولید می‌کند، که بر ظرفیت قوی سنتز EPS آن تأکید می‌کند، که برای توسعه بیوفیلیم و حدت بسیار مهم است. تیمار با کولیستین به تنهایی منجر به کاهش چشمگیر تولید EPS به ۶۸/۹٪ شد، که نشان دهنده توانایی قوی

آن در مهار سنتز EPS است. در مقابل، تیمار با مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم محتوای EPS را به ۳۶/۴٪ کاهش داد، که نشان می‌دهد مایع رویی حاوی عواملی است که به طور متوسط تولید EPS را مهار می‌کنند. هنگامی که کولیستین و مایع رویی با هم ترکیب شدند، تولید EPS را به ۴۸/۸٪ کاهش دادند، این نتیجه نشان دهنده تعامل هم‌افزایی بین دو عامل در کاهش تولید EPS است، اگرچه این اثر کاملاً افزایشی نیست. Das و همکاران (۲۰۲۲) در مطالعه خود بر روی اثر ویتکسین مشاهده کردند که این ترکیب موجب کاهش ۳۵ درصدی آبریزی سطح سلول و کاهش ۴۵ درصدی میزان EPS شد، به گونه‌ای که تشکیل بیوفیلیم به طور قابل توجهی کاهش یافت (۲۱)؛ افزون بر این، Pimentel-Filho و همکاران (۲۰۱۴) با به کارگیری ترکیباتی مانند Bovicin و HCO و نینیس نشان دادند که کاهش ۶۰ درصدی در چسبندگی سلولی و تغییر قابل توجهی در انرژی آزاد گیبس، به ویژه کاهش ۲۰ درصدی انرژی چسبندگی، می‌تواند زمینه‌ساز مهار موفقیت‌آمیز تشکیل بیوفیلیم شود (۲۲) در مطالعه دیگر Gladysheva نشان داد CFS استخراج‌شده از سویه‌های واژینال *Corynebacterium amycolatum* کاهش قابل توجه در تولید آگروپلی‌ساکارید (EPS) که یکی از اجزای کلیدی ماتریکس بیوفیلیم محسوب می‌شود، ایجاد می‌کند که مؤید نقش فعال ترکیبات موجود در CFS در مهار سنتز یا ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی است. همچنین تیمار با CFS باعث تغییر در هیدروفوبیسیتة سطحی باکتری‌ها شده است. این تغییرات احتمالاً منجر به کاهش توان چسبندگی باکتری به سطح‌های زنده یا غیرزنده و در نتیجه مهار اولیه تشکیل بیوفیلیم می‌گردد (۲۳). مکانیسم‌های بالقوه‌ای که زیربنای این نتایج هستند، می‌توانند به تعاملات پیچیده بین کولیستین و مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم با ساختار پوشش سلولی باکتری و ماتریکس بیوفیلیم مرتبط باشند. کولیستین، به عنوان یک آنتی‌بیوتیک پلی‌کاتیونی، از طریق اتصال به لیپوپلی‌ساکاریدهای موجود در غشای خارجی باکتری‌های گرم منفی عمل می‌کند. این اتصال باعث تغییر ساختار غشا، اختلال در یکپارچگی آن، و در نهایت افزایش نفوذپذیری غشا می‌شود. این فرایند تخریبی می‌تواند منجر به نشت محتوای سلولی و متعاقباً مرگ سلولی شود. از سوی دیگر، مایع رویی لاکتوباسیلوس پلانتاروم ممکن است با تولید ترکیبات زیست‌فعال ساختار بیوفیلیم و غشای سلولی باکتری ر

هدف قرار دهد. این ترکیبات می‌توانند ماتریکس بیوفیلم را تضعیف کرده و باعث تخریب بخش‌هایی از آن شوند که معمولاً به‌عنوان یک سد حفاظتی برای باکتری عمل می‌کنند. چنین تغییری نه تنها اثربخشی

کولیستین را افزایش می‌دهد بلکه ممکن است حساسیت سلول‌های باکتریایی نسبت به سایر عوامل ضد میکروبی را نیز تقویت کند (۲۴).

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه بر پتانسیل چندوجهی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم در مختل کردن مراحل مختلف بیماری‌زایی کلبسیلا پنومونیه تأکید می‌کند. با تداخل در چسبندگی باکتری‌ها، تشکیل بیوفیلم و تولید عوامل حدت، سوپرناتانت می‌تواند به طور بالقوه اثربخشی

کولیستین را افزایش داده و از ظهور مقاومت جلوگیری کند. این تعامل هم‌افزایی یا افزایشی می‌تواند امکان دوزهای کمتر کولیستین را فراهم کند و به طور بالقوه خطر سمیت مرتبط را در حالی که اثربخشی درمانی را حفظ می‌کند، کاهش دهد

References

1. Abbas R, Chakkour M, Zein El Dine H, Obaseki EF, Obeid ST, Jezzini A, et al. General Overview of *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and the Role of Siderophores in Its Pathogenicity. *Biol (Basel)*. 2024;13(2). doi:10.3390/biology13020112
2. Riwu KHP, Effendi MH, Rantam FA, Khairullah AR, Widodo A. A review: Virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* as emerging infection on the food chain. *Vet World*. 2022;15(9):2172-9. doi:10.14202/vetworld.2022.2172-2179
3. Krasowska A, Sigler K. How microorganisms use hydrophobicity and what does this mean for human needs? *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:112. doi:10.3389/fcimb.2014.00112
4. Singh S, Datta S, Narayanan KB, Rajnish KN. Bacterial exo-polysaccharides in biofilms: role in antimicrobial resistance and treatments. *J Genet Eng Biotechnol*. 2021;19(1):1-9. doi:10.1186/s43141-021-00242-y
5. Geladari A, Simitsopoulou M, Antachopoulos C, Roilides E. Immunomodulatory effects of colistin on host responses against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Int J Antimicrob Agents*. 2020;56(6):106182. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106182
6. Narimisa N, Goodarzi F, Bavari S. Prevalence of colistin resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2022;21(1):1-9. doi:10.1186/s12941-022-00541-3
7. El-Mokhtar MA, Hassanein KM, Ahmed AS, Gad GF, Amin MM, Hassanein OF. Antagonistic activities of cell-free supernatants of lactobacilli against extended-spectrum β lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Drug Resist*. 2020;13:543-52. doi:10.2147/IDR.S238588
8. Yan R, Lu Y, Wu X, Yu P, Lan P, Wu X, et al. Anticolonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus plantarum* LP1812 through accumulated acetic acid in mice intestinal. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021;11:1276. doi:10.3389/fcimb.2021.804177
9. Jin F, Yang H. Effects of *Lactobacillus salivarius* LN12 in combination with amoxicillin and clarithromycin on *Helicobacter pylori* biofilm in vitro. *Microorganisms*. 2021;9(8):1611. doi:10.3390/microorganisms9081611
10. Mirani ZA, Aziz M, Khan MN, Lal I, Hassan NU, Khan SI. Biofilm formation and dispersal of *Staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. *Microb Pathog*. 2013;61-62:66-72. doi:10.1016/j.micpath.2013.05.002
11. Haroun MF, Al-Kayali RS. Synergistic effect of *Thymra spicata* L. extracts with antibiotics against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Iran J Basic Med Sci*. 2016;19(11):1193. doi:10.22038/IJBMS.2016.7633
12. Saidi N, Sadari H, Owlia P, Soleimani M. Anti-biofilm potential of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* cell-free supernatant extracts against *Staphylococcus aureus*. *Adv Biomed Res*. 2023;12(1):50. doi:10.4103/abr.abr_268_22

13. Mu Y, Zeng H, Chen W. Quercetin inhibits biofilm formation by decreasing the production of EPS and altering the composition of EPS in *Staphylococcus epidermidis*. *Front Microbiol*. 2021;12:631058. doi:10.3389/fmicb.2021.631058
14. Li M, Xu X, Jia Y, Yuan Y, Na G, Zhu L, et al. Transformation of mulberry polyphenols by *Lactobacillus plantarum* SC-5: Increasing phenolic acids and enhancement of anti-aging effect. *Food Res Int*. 2024;192:114778. doi:10.1016/j.foodres.2024.114778
15. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5:643. doi:10.3389/fmicb.2014.00643
16. Nation RL, Li J. Colistin in the 21st century. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(6):517-25. doi:10.1097/QCO.0000000000000207
17. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H. Klebsiella pneumonia and Its Antibiotic Resistance: A Bibliometric Analysis. *Biomed Res Int*. 2022;2022:1668789. doi:10.1155/2022/1668789
18. Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions -- A review. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(1):57-62. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.005
19. Gao Y, Li D, Liu J. Antimicrobial potential of *Lactobacillus plantarum* ZP11 by producing bacteriocins against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*. 2019;98:274-9. doi:10.1016/j.foodcont.2018.11.023
20. Izhar MZ, Nawaz M, Yaqub T, Avais M, Anjum AA. In vitro characterization of probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* CM49 against selected cattle mastitogens. *BMC Microbiol*. 2024;24(1):310. doi:10.1186/s12866-024-03459-2
21. Das MC, Samaddar S, Jawed JJ, Ghosh C, Acharjee S, Sandhu P, et al. Vitexin alters *Staphylococcus aureus* surface hydrophobicity to obstruct biofilm formation. *Microbiol Res*. 2022;263:127126. doi:10.1016/j.micres.2022.127126
22. Pimentel-Filho N, Martins MCF, Nogueira GB, Mantovani HC, Vanetti MCD. Bovicin HC5 and nisin reduce *Staphylococcus aureus* adhesion to polystyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free energy of adhesion. *Int J Food Microbiol*. 2014;190:1-8. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.08.029
23. Gladysheva IV, Cherkasov SV. Antibiofilm activity of cell-free supernatants of vaginal isolates of *Corynebacterium amycolatum* against *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *Arch Microbiol*. 2023;205:158. doi:10.1007/s00203-023-03499-w
24. Elkashef SMM, Sahloul NS, Mowafy HL. Exploring the antibacterial potential of probiotics against colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*: An in vitro study. *Microbes Infect Dis*. 2025. doi:10.21608/mid.2024.301152.1883