



بررسی اثر مهارى چند نمونه پست بیوتیک علیه باکتری های پاتوژن / استافیلوکوکوس اورئوس و

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

مطهره السادات کل العماد^۱، آرزو طهمورث پور^۲، فاطمه زارع^۳

^۱ دانشجوی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده دندان پزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه

آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

^۲ گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده دندان پزشکی، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران

^۳ مرکز تحقیقات ایمونولوژی تولید مثل، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۲۸

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۸

چاپ: پاییز ۱۴۰۴

DOI:

doi.org/10.82415/NACMS.1404.1225111

کلمات کلیدی: پروبیوتیک، پست

بیوتیک، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس

و استافیلوکوکوس اورئوس

* نویسنده مسئول: Email

(a.tahmoures.p@gmail.com)

چکیده

پست بیوتیک ها، محصولات متابولیکی پروبیوتیک ها، در تعدیل سیستم ایمنی، مهار عفونت ها و کاهش التهاب مؤثر هستند. به دلیل احتمال بالای مقاومت آنتی بیوتیکی و تحریک بیش از حد سیستم ایمنی توسط پروبیوتیک ها، پست بیوتیک ها جایگزین مناسبی با مزایای مشابه و عوارض کمتر محسوب می شوند. هدف این مطالعه بررسی ویژگی های ضد میکروبی چند نمونه پست بیوتیک حاصل از گونه های لاکتوباسیلوس و باسیلوس در برابر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس بود. پست بیوتیک های تهیه شده از لاکتوباسیلوس رامنوسوس، لاکتوباسیلوس پلانتروم و باسیلوس کواگولانس پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت انکوباسیون استفاده شدند. فعالیت ضد میکروبی پست بیوتیک های گروه A (باسیلوس کواگولانس)، گروه B (ترکیب لاکتوباسیلوس رامنوسوس و لاکتوباسیلوس پلانتروم) و گروه C (ترکیب هر سه گونه) با روش های دیسک دیفیوژن آگار و میکرودايلوشن براث و تعیین MIC ارزیابی شد. آنالیز آماری با آزمون Van der Waerden در SPSS-27 انجام شد و اثر بازدارندگی تمام گروه ها نسبت به کنترل منفی معنی دار بود ($p < 0.001$). پست بیوتیک گروه B به طور قابل توجهی رشد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس را مهار کرد، با میانگین قطر هاله عدم رشد ۱۳ و ۱۰ میلی متر و MIC₇₀ برابر ۶/۲۵ درصد و ۱۲/۵ درصد. گروه C میانگین هاله ۹ میلی متر و MIC₉₀ ۲۵ درصد را نشان داد. در غلظت ۱۰۰ درصد (V/V)، اثر مهارى گروه C (۸۷/۵ درصد و ۸۹/۵ درصد) بر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس بیشتر از گروه B (۸۶/۳ درصد و ۸۵/۳ درصد) بود. یافته ها نشان دهنده پتانسیل ضد میکروبی پست بیوتیک های ترکیبی و منفرد و برتری ترکیبی ها هستند و امید به توسعه داروهای جدید با کاهش خطر مقاومت آنتی بیوتیکی را تقویت می کنند.

مقدمه

استافیلوکوکوس ها کوکسی های خوشه ای گرم مثبت و فرصت طلبی هستند که به طور گسترده در محیط (هوا، آب و مواد غذایی) و به عنوان بخشی از فلور طبیعی بدن انسان حضور دارند. این باکتری ها معمولاً پوست و غشاهای مخاطی، به ویژه نواحی مرطوب مانند مجاری بینی، زیر بغل و کشاله ران را کلونیزه می کنند. در سال های اخیر، شیوع عفونت ها و اپیدمی های بیمارستانی ناشی از گونه های استافیلوکوک در نقاط مختلف جهان گزارش شده است (۱، ۲). در سال های اخیر، حضور استافیلوکوکوس ها، به ویژه سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، در محیط های بیمارستانی به یکی از چالش های اصلی کنترل عفونت های مرتبط با مراقبت های بهداشتی^۱ تبدیل شده است. از میان این عفونت ها، عفونت های محل جراحی از شایع ترین موارد محسوب می شوند و موجب افزایش عوارض پس از عمل، طول مدت بستری، هزینه های درمان و حتی مرگ و میر بیماران می گردند (۳). هم چنین، عفونت های پوست و بافت نرم^۲ از دیگر تظاهرات بالینی مهم ناشی از استافیلوکوک ها هستند که می توانند لایه های مختلف پوست، بافت زیرجلدی، فاسیا و عضله را درگیر کنند. شدت این عفونت ها از موارد سطحی و خفیف تا اشکال نکروزدهنده و تهاجمی متغیر است. به طور کلی، عفونت های پوستی مزمن یا طولانی مدت در سه گروه اصلی طبقه بندی می شوند: (۱) سلولیت/اریسپلاس، (۲) عفونت زخم، و (۳) آبسه های پوستی (۴).

عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس/پیدرمیدیس عمدتاً از نوع بیمارستانی هستند. این باکتری یکی از علل اصلی عفونت های مرتبط با تجهیزات پزشکی محسوب می شود. استفاده از وسایل خارجی مانند سوندهای ادراری، کاتترهای وریدی، پروتزها، ایمپلنت های دندان و درچه های مصنوعی قلب، خطر ابتلا به این عفونت را به طور قابل توجهی افزایش می دهد. علاوه بر این، شرایطی مانند پیوند درچه قلب، درمان های سرکوب کننده سیستم ایمنی، نارس بودن نوزادان و ابتلا به بدخیمی هایی نظیر لوسمی، افراد را در معرض خطر بالاتری قرار می دهد (۵). عفونت های ناشی از استافیلوکوکوس

اورئوس شامل باکتری می، سپتی سمی، پنومونی، استئومیلیت و عفونت های پوستی و بافت نرم هستند. گسترش این سویه ها یکی از مهم ترین چالش های درمانی در حوزه عفونت های بیمارستانی محسوب می شود (۶). یکی از ویژگی های مهم استافیلوکوکوس/اورئوس، توانایی آن در تشکیل بیوفیلم است. تشکیل بیوفیلم موجب افزایش قابل توجه مقاومت باکتری در برابر پاسخ ایمنی میزبان و آنتی بیوتیک ها می شود. باکتری های بیوفیلم ساز تا ۱۰ تا ۱۰۰۰ برابر مقاوم تر از باکتری های آزاد (پلانکتونی) در برابر آنتی بیوتیک ها هستند (۴).

توجه به معایب درمان های موجود، ضرورت توسعه درمان های جدید، ایمن، طبیعی و ارزان را افزایش داده است (۷). پروبیوتیک ها و محصولات آنها یا پست بیوتیک ها در دسته ترکیبات طبیعی ایمن قرار می گیرند که پتانسیل درمانی آنها اخیراً بسیار مورد توجه قرار گرفته است. پروبیوتیک ها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در صورت مصرف در مقادیر مناسب، اثرات مفیدی بر سلامت دارند. گونه های رایج آنها شامل لاکتوباسیلوس و بیفیدوباکتریوم است. این باکتری ها با حفظ تعادل میکروبی روده، تقویت ایمنی و کاهش التهاب به بهبود اختلالات گوارشی و سلامت عمومی کمک می کنند. در سال های اخیر، کاربرد پروبیوتیک ها به ویژه در صنایع غذایی، دارویی و مراقبت از پوست مورد توجه گسترده قرار گرفته است (۸، ۱۰). با وجود فواید پروبیوتیک ها، زنده بودن آنها نگرانی هایی در زمینه ایمنی ایجاد می کند. برخی سویه ها ممکن است با عوارضی مانند عفونت، باکتری می، انتقال ژن مقاومت آنتی بیوتیکی، تغییر الگوی کلونیزاسیون میکروبیوتای روده، اندوکاردیت و مننژیت همراه باشند، به ویژه در نوزادان و افراد با نقص ایمنی یا تحت درمان آنتی بیوتیکی. علاوه بر این، حفظ زنده ماندن پروبیوتیک ها در فرایند تولید، نگهداری و توزیع، انتخاب حامل مناسب و استانداردسازی دوز مصرفی چالش برانگیز است و حساسیت این میکروارگانیسم ها به دما، رطوبت و تهویه می تواند کیفیت محصولات را تحت تأثیر قرار دهد (۱۰). برای کاهش این نگرانی ها، اخیراً جایگزین هایی مانند پست بیوتیک ها معرفی شده اند. پست بیوتیک ها به دلیل

مواد و روش کار

کشت و آماده سازی باکتری ها

در این پژوهش، لاکتوباسیلوس پلانتروم (از کپسول (Pro.L.D.L)، لاکتوباسیلوس رامنوسوس (از کپسول Lactovag) و باسیلوس کوگولانس (از ساشه Parsilact) جهت تولید پست بیوتیک تهیه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. سویه های /استافیلوکوکوس اورئوس و /استافیلوکوکوس پیدرمیدیس با منشأ بیمارستانی از بانک میکروبی دانشکده پیراپزشکی یزد تهیه شدند. برای کشت لاکتوباسیلوس ها از محیط های MRS براث /آگار، برای باسیلوس کوگولانس از نوترینت براث /آگار و برای استافیلوکوکوس ها از بلاد آگار استفاده شد. همچنین جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی پست بیوتیک ها، از محیط های مولر هیلتون براث و آگار استفاده شد. تمام محیط ها طبق دستورالعمل سازنده تهیه و در ۱۲۱ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل شدند. در تهیه بلاد آگار، پس از سرد شدن محیط، ۵ درصد خون تازه به صورت استریل افزوده شد.

تهیه سوسپانسیون باکتری های پروبیوتیک

برای تهیه سوسپانسیون اولیه، کپسول های لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و نیم ساشه باسیلوس کوگولانس در ۳۰ میلی لیتر از محیط کشت اختصاصی هر سویه حل و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و شرایط CO₂ دار به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. سپس با لوپ استریل، کشت خطی روی محیط آگار انجام و پلیت ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر در همان شرایط انکوبه شدند تا کلنی های مجزا تشکیل شوند. در نهایت، کلنی های خالص در ۵۰ میلی لیتر محیط مایع اختصاصی تلقیح و در بازه های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای

پایداری طولانی در دما و pH مختلف، ترکیب شیمیایی مشخص، عدم انتقال مقاومت آنتی بیوتیکی و ایمنی در افراد با نقص سیستم ایمنی یا نوزادان، مزیت قابل توجهی نسبت به پروبیوتیک ها دارند. این ترکیبات نیازی به زنده ماندن ندارند و فرایند تولید، ذخیره سازی و حمل و نقل آن ها ساده تر و کم هزینه تر است. همچنین، پست بیوتیک ها امکان تولید انبوه با دقت عملکردی بالاتر و پاسخ های هدفمندتر را فراهم می کنند، هرچند هنوز به طور گسترده در دسترس نیستند (۷، ۱۱، ۱۲). بر همین اساس، استفاده از پست بیوتیک ها به عنوان یک شاخه نوظهور در این زمینه می تواند علاوه بردارای بودن اثرات مفید مشابه، در برطرف نمودن نگرانی های موجود از تولید و نگهداری تا کاهش عوارض احتمالی موثر واقع گردد. در سال های اخیر در گزارشات علمی از واژه هایی مانند «سوپرناتانت، بیوژنیک، ابیوتیک، متابیوتیک، گوشت پروبیوتیک، پاراپروبیوتیک و پست بیوتیک» برای توصیف سلول های غیرزنده و متابولیت آن ها استفاده کرده اند که از بین آن ها، واژه «پست بیوتیک» در مجامع علمی بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. پست بیوتیک ها شامل سه گروه عمده می باشند: ۱) سلول های میکروبی غیرفعال شده (پیکره سلول) ۲) فراکسیون های سلول (اسید تیکوئیک، موکوپتید های مشتق شده از پپتیدگلیکان، پروتئین های سطح سلول و اندو و اگزوپلی ساکارید) ۳) متابولیت های سلولی (اسیدهای چرب کوتاه زنجیر، آنزیم ها، ویتامین ها، باکتریوسین ها و اسیدهای آلی) که در زمان زنده بودن سلول های میکروبی ترشح شده یا پس از تجزیه شدن آن ها در محیط روده میزبان آزاد می شوند و چنانچه در مقدار کافی دریافت شوند، اثرات سلامت بخش از خود در میزبان بر جای می گذارند (۱۳).

با وجود افزایش توجهات اخیر به نقش پست بیوتیک ها در بهبود سلامت و کنترل عفونت های میکروبی، اطلاعات موجود درباره انواع مختلف پست بیوتیک ها و به ویژه ترکیب آن ها با یکدیگر هنوز محدود است. از این رو، هدف از مطالعه حاضر بررسی اثرات ضد میکروبی لیزات حاصل از باکتری های لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس کوگولانس علیه دو پاتوژن مهم انسانی، یعنی پاتوژن /استافیلوکوکوس اورئوس و /استافیلوکوکوس پیدرمیدیس، می باشد.

تکثیر و آماده سازی نهایی انکوبه شدند. سپس برای اطمینان از خلوص تست رنگ آمیزی گرم انجام شد.

تهیه پست بیوتیک

پس از کشت باکتری های پروبیوتیک به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط کشت های حاصل به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۶۰۰۰ g سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با فیلتر ۰/۲۲ استریل میکرون شد و رسوب سلولی (پلت) باکتری ها با فسفات بافر سالین^۴ مخلوط و اتوکلاو گردید. هر دو نمونه (سوپرناتانت فیلتر شده و پلت اتوکلاو شده) در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند تا برای آزمایش های بعدی بررسی فعالیت ضد میکروبی پست بیوتیک ها آماده باشند (۱۴، ۱۵).

روش انتشار دیسک بر آگار^۵

سویه های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس پیدرمیدیس ابتدا به صورت خطی روی بلاد آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. برای تهیه سوسپانسیون استاندارد، چند کلنی مشابه از سطح محیط کشت جمع آوری و در PBS حل شد. غلظت سلولی سوسپانسیون با اندازه گیری OD₆₀₀ و مطابق نیم مک فارلند طبق CLSI تنظیم گردید. کشت چمنی سویه های استافیلوکوکوس روی مولر هیلتون آگار انجام شد و دیسک های استریل آغشته (۱۰۰ میکرولیتر) با سوپرناتانت ها و پلت های باکتری های پروبیوتیک باسیلوس کوآگولانس (گروه A)، ترکیب پست بیوتیک دو لاکتوباسیلوس (گروه B) و ۳ گونه (گروه C) آماده شدند. دیسک های کنترل مثبت (نوبیوسین) و منفی (PBS) نیز آماده شدند. پس از قرار دادن دیسک ها روی محیط تلقیح شده، پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند و اثر ضد میکروبی با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت ثبت گردید (۱۷، ۱۶).

بررسی حداقل غلظت مهارکنندگی^۶

تعیین MIC سوپرناتانت های ترکیبی و تک علیه استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس پیدرمیدیس با استفاده از روش رقیق سازی سریالی دوبرابری در میکروپلیت ۹۶ خانه ته صاف انجام شد. در تمامی چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط مولر هیلتون برات ریخته شد. سوپرناتانت های ترکیبی در ۵ تکرار و سوپرناتانت باسیلوس کوآگولانس در ۳ تکرار آماده شدند. ردیف ها با رقیق سازی سریالی دوبرابری تا رقت ۱/۳۲ تهیه گردید. سوسپانسیون باکتری های پاتوژن مطابق نیم مک فارلند آماده و سپس ۱۰۰ برابر رقیق شد؛ به هر چاهک ۱۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون افزوده شد. کنترل مثبت شامل محیط کشت به همراه باکتری و کنترل منفی شامل محیط کشت به همراه سوپرناتانت بود. پس از انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، رشد باکتری ها با اندازه گیری OD₆₀₀ توسط میکروپلیت ریدر تعیین گردید (۱۸).

ملاحظات اخلاقی

این پژوهش با کد اخلاق شماره IR.IAU.KHUISF.REC.1404.539 در کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه آزاد اصفهان (خوراسگان) به تصویب رسیده است.

آنالیز های آماری

تمامی تحلیل های آماری با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۷) انجام شد. با توجه به نتایج، از آزمون Van der Waerden برای مقایسه بین گروه ها استفاده شد. نتایج به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (Mean $\pm$ SD) گزارش شده اند. سطح معنی داری برای تمام آزمون ها $p < 0.001$ در نظر گرفته شد. نمودارها و نمایش های تصویری با نرم افزار GraphPad Prism (نسخه ۹) تهیه شده اند.

تجزیه و تحلیل نتایج

نتایج حاصل از کشت خطی بر روی محیط کشت آگاردار و انکوباسیون در محیط مایع و تست رنگ آمیزی گرم، حاکی از رشد یکنواخت باکتری های پروبیوتیک بود که نشان دهنده خلوص و زنده مانگی سویه های به کار رفته در نمونه های ساشه و قرص تلقی می شود.

^۱ Minimum Inhibitory Concentration

^۴ Phosphate-Buffered Saline
^۵ Disc diffusion test

نتایج تست دیسک دیفیوژن

در تمامی کشت‌های ۲۴ ساعته، دیسک‌های حاوی سوپرناتانت و پلت سلولی هیچ‌گونه هاله عدم رشد علیه دو پاتوژن *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ایجاد نکردند. هم‌چنین، در کشت‌های ۴۸ ساعته

نیز، پلت‌ها فاقد هرگونه اثر بازدارندگی علیه این دو پاتوژن بودند. در حالی که سوپرناتانت‌های گروه B و C هاله عدم رشد خوبی نشان دادند. سوپرناتانت تک *باسیلوس کواگولانس* (گروه A) هاله عدم رشد کامل علیه دو پاتوژن نشان نداد. تصاویر حاصل از هاله و اندازه ناحیه‌های مهار رشد برای کشت ۲۴ و ۴۸ ساعته در زیر نمایش داده شده است.



شکل ۱. بررسی اثر ضد میکروبی پلت‌ها و سوپرناتانت‌های مخلوط در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بعد از ۲۴ ساعت با روش دیسک دیفیوژن: (۱) پلت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (گروه B؛ ۲) پلت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *باسیلوس کواگولانس* (گروه C؛ ۳) سوپرناتانت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (گروه B؛ ۴) سوپرناتانت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *باسیلوس کواگولانس* (گروه C؛ ۵) کنترل مثبت: نوویوسین؛ (۶) کنترل منفی: PBS



شکل ۲. بررسی اثر ضد میکروبی پلت‌ها و سوپرناتانت‌های مخلوط در برابر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بعد از ۲۴ ساعت با روش

دیسک دیفیوژن: (۱) پلت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (گروه B؛ ۲) پلت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم*، *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و *باسیلوس کواگولانس* (گروه C؛ ۳) سوپرناتانت ترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتروم* و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* (گروه

(B)؛ (۴) سوپرناتانت ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس کواگولانس (گروه C)؛ (۵) کنترل مثبت: نوویوسین؛

(۶) کنترل منفی: PBS

شکل ۳. بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت های تک و مخلوط در برابر استافیلوکوکوس اورئوس بعد از ۴۸ ساعت با روش دیسک دیفیوژن:

(۱)



سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنوسوس ؛ (۲) سوپرناتانت ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس کواگولانس (گروه C)؛ (۳) سوپرناتانت باسیلوس کواگولانس (گروه A)؛ (۴) سوپرناتانت ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس (گروه B)؛ (۵) سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتروم ؛ (۶) کنترل مثبت: نوویوسین؛ (۷) کنترل منفی: PBS



شکل ۴. بررسی اثر ضد میکروبی سوپرناتانت های تک و مخلوط در برابر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بعد از ۴۸ ساعت با روش دیسک دیفیوژن: (۱) سوپرناتانت لاکتوباسیلوس رامنوسوس ؛ (۲) سوپرناتانت ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس کواگولانس (گروه C)؛ (۳) سوپرناتانت باسیلوس کواگولانس (گروه A)؛ (۴) سوپرناتانت ترکیب لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس (گروه B)؛ (۵) سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتروم ؛ (۶) کنترل مثبت: نوویوسین؛ (۷) کنترل منفی: PBS

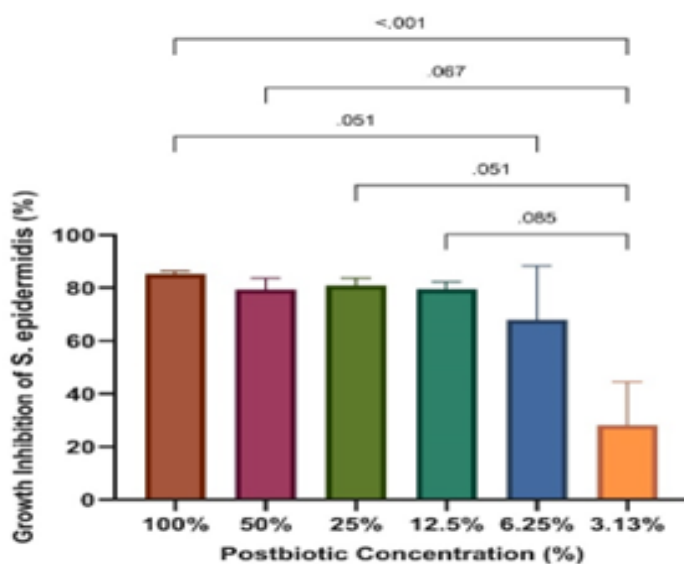
جدول ۱. قطر هاله عدم رشد (بعد از ۴۸ ساعت) میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر)

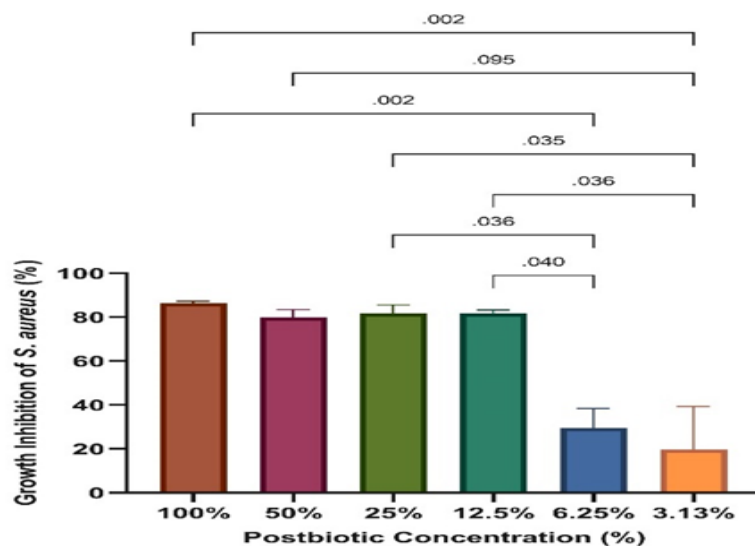
پاتوژن	گروه A	گروه B	گروه C
<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>	هاله عدم رشد کامل نیست	۱۰	۹
<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>	هاله عدم رشد کامل نیست	۱۳	۹

بررسی حداقل غلظت مهار کنندگی (MIC)

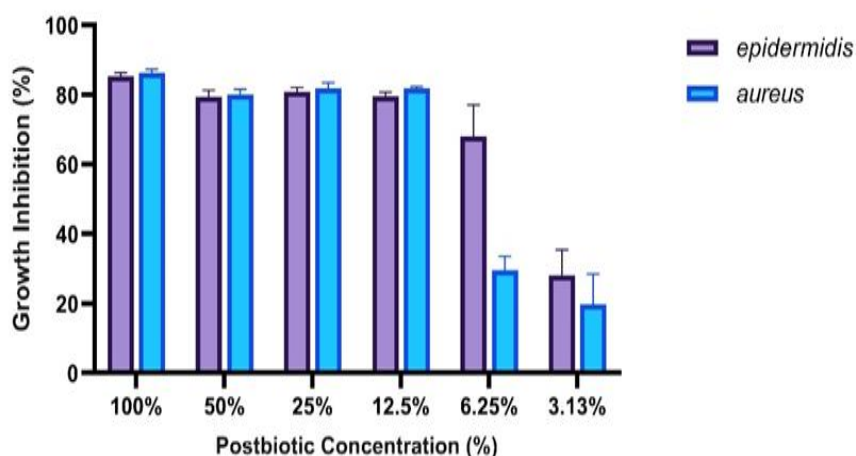
به منظور بررسی اثر پست بیوتیک ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس ها (گروه B) بر رشد باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* درصد مهار رشد در غلظت های مختلف پست بیوتیکی ارزیابی شد. به طور کلی، با افزایش غلظت پست بیوتیک، جذب نوری باکتری ها کاهش یافت که بیانگر مهار رشد قوی تر در غلظت های بالا است، در حالی که در غلظت های پایین تر، میزان جذب نوری افزایش یافته و درصد مهار کاهش یافته است. بر اساس نمودارهای ۱ و ۲، بررسی اثر ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس ها بر دو پاتوژن مورد مطالعه نشان داد که در غلظت های بالا (۱۰۰ و ۱۲/۵ درصد V/V) تفاوت معنی داری در اثر ضد میکروبی مشاهده نشد ($p < 0.001$) و فعالیت

بازدارندگی در هر دو غلظت تقریباً مشابه بود. درصد مهار رشد برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ترتیب ۸۵/۳ درصد و ۷۹/۵ درصد و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۸۶/۳ درصد و ۸۱/۷ درصد محاسبه شد. این نتایج بیانگر آن است که افزایش غلظت از ۱۲/۵ درصد به ۱۰۰ درصد موجب بهبود معنی داری در اثر مهاری نمی شود و ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس ها در هر دو غلظت اثر ضد باکتریایی قابل ملاحظه ای دارد. با کاهش غلظت به ۶/۲۵ و ۳/۱۳ درصد V/V، اختلاف معناداری نسبت به غلظت های بالاتر ظاهر شد، که نشان دهنده کاهش کارایی ضد میکروبی در سطوح پایین تر است. بر اساس داده ها، MIC70 برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* برابر ۶/۲۵ درصد و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر ۱۲/۵ درصد V/V محاسبه شد.


 نمودار ۱. اثر پست بیوتیک ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس (گروه B) بر مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در غلظت های مختلف



نمودار ۲. اثر پست بیوتیک ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس (گروه B) بر مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف



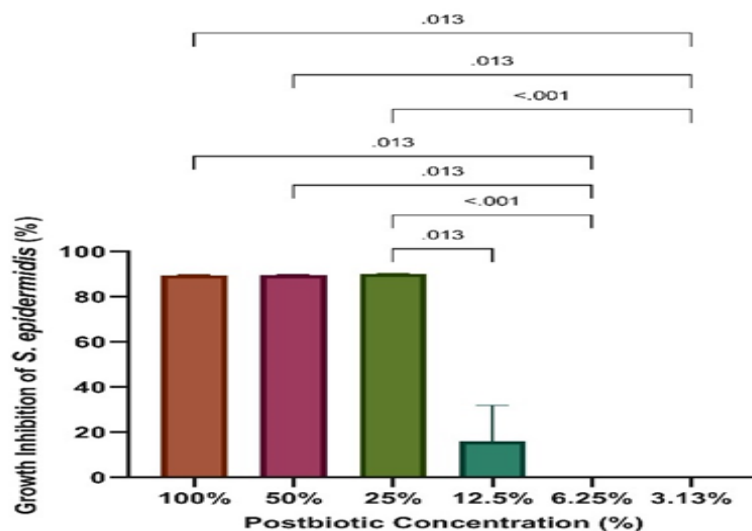
نمودار ۳. مقایسه تاثیر مهاری پست بیوتیک دوتایی لاکتوباسیلوس (گروه B) بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

تقریباً مشابه بود. درصد مهار رشد برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به ترتیب ۸۹/۵ درصد و ۹۰/۱ درصد و برای *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۸۷/۵ درصد و ۸۷/۲ درصد محاسبه شد. این نتایج بیانگر آن است که افزایش غلظت از ۲۵ درصد به ۱۰۰ درصد موجب بهبود معنی داری در اثر مهاری نمی شود و ترکیب دوتایی لاکتوباسیلوس‌ها در هر دو غلظت اثر ضدباکتریایی قابل ملاحظه‌ای دارد. تاثیر مهاری پست بیوتیک C در مقایسه با نوع B در غلظت ۱۰۰ درصد

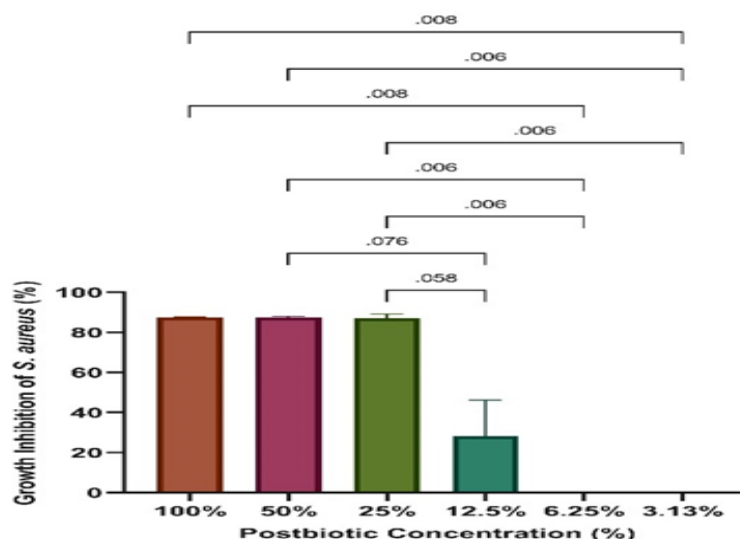
به منظور بررسی اثر پست بیوتیک ترکیب سه تایی (گروه C) بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، درصد مهار رشد در غلظت‌های مختلف پست بیوتیکی ارزیابی شد. بر اساس نمودارهای ۴ و ۵، بررسی اثر ترکیب سه تایی بر دو پاتوژن مورد مطالعه نشان داد که در غلظت‌های بالا (۱۰۰ و ۲۵ درصد V/V) تفاوت معنی داری در اثر ضد میکروبی مشاهده نشد ($p < 0.001$) و فعالیت بازدارندگی در هر دو غلظت

هیچ اثر ضد میکروبی مشاهده نشد و درصد مهار صفر در نظر گرفته شد. بر اساس داده‌ها، MIC₉₀ برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* برابر ۲۵ درصد V/V محاسبه شد.

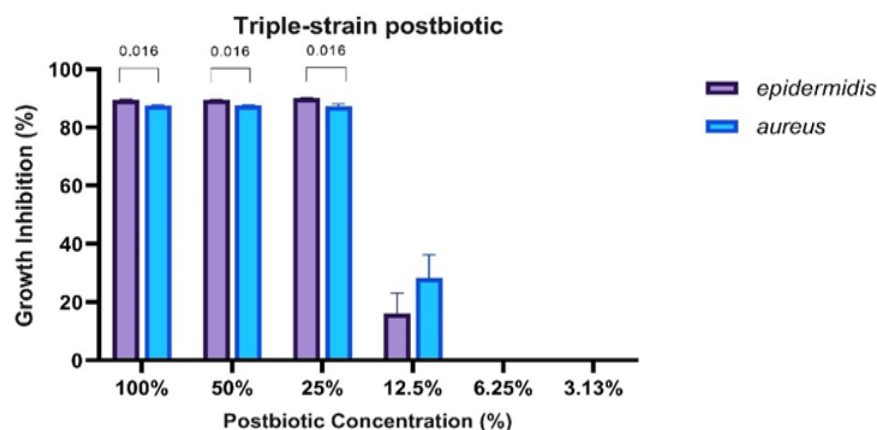
(V/V) در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بیشتر بود. با کاهش غلظت به ۶/۲۵ و ۳/۱۳ درصد V/V، اختلاف معناداری نسبت به غلظت‌های بالاتر ظاهر شد، که نشان‌دهنده کاهش کارایی ضد میکروبی در سطوح پایین‌تر است. به طوری که در غلظت‌های ذکر شده



نمودار ۴. اثر پستیوتیک ترکیب سه تایی (گروه C) بر مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در غلظت‌های مختلف



نمودار ۵. اثر پستیوتیک ترکیب سه تایی (گروه C) بر مهار رشد باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف



نمودار ۶. مقایسه تاثیر مهاري پست بیوتیک سه تایی (گروه C) بر *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نشان داد. مقایسه درصد مهار رشد و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در غلظت‌های مختلف پست‌بیوتیک‌های تک‌سویه و ترکیبی در جدول ۲ ارائه شده است. به طور کلی نتایج نشان داد که در غلظت‌های بالا (۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ درصد)، ترکیب سه تایی (گروه C) بیشترین اثر بازدارندگی را بر هر دو باکتری داشت، در حالی که در غلظت‌های پایین‌تر (۱۲/۵، ۶/۲۵ و ۳/۱۳ درصد)، ترکیب دوتایی (گروه B) عملکرد مهاري بهتری نسبت به سایر گروه‌ها نشان داد.

به‌منظور ارزیابی تأثیر پست‌بیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* (گروه A) بر رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، درصد مهار رشد این باکتری‌ها در غلظت‌های مختلف پست‌بیوتیکی مورد سنجش قرار گرفت. نتایج نشان داد که در غلظت‌های پایین‌تر، میزان مهار رشد قابل توجهی مشاهده نشد و درصد مهار رشد به صفر نزدیک بود؛ از این‌رو، شاخص مهار رشد تنها در غلظت ۱۰۰ درصد مورد تحلیل و مقایسه قرار گرفت. در این غلظت، پست‌بیوتیک *باسیلوس کوآگولانس* اثر مهاري قوی‌تری بر

جدول ۲. مقایسه درصد مهار رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در غلظت‌های مختلف پست بیوتیک‌های تک‌سویه و ترکیبی

غلظت (%)	نتیجه
۱۰۰٪	(<i>استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس</i>) ترکیب ۳ تایی < ترکیب ۲ تایی < تک‌سویه / (<i>استافیلوکوکوس اورئوس</i>) فقط (ترکیب ۳ تایی < تک‌سویه) سایر مقایسه‌ها غیرمعنادار
۵۰٪	ترکیب ۳ تایی < ترکیب ۲ تایی
۲۵٪	ترکیب ۳ تایی < ترکیب ۲ تایی
۱۲/۵ ٪	ترکیب ۳ تایی > ترکیب ۲ تایی
۶/۲۵ ٪	ترکیب ۳ تایی > ترکیب ۲ تایی
۳/۱۳٪	ترکیب ۳ تایی > ترکیب ۲ تایی

بحث

گونه‌های جنس استافیلوکوکوس از شایع‌ترین عوامل بروز عفونت‌های بیمارستانی در سطح جهان هستند. شیوع این عفونت‌ها در سال‌های اخیر به دلیل انتشار سویه‌های مقاوم به دارو، افزایش تعداد بیماران با ضعف ایمنی و کاربرد گسترده وسایل پزشکی مانند کاتترها افزایش یافته است. در میان گونه‌های استافیلوکوکوسی، استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین توانایی بیماری‌زایی را دارد، در حالی که استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به‌عنوان بخشی از فلور طبیعی پوست و غشاهای مخاطی، یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به شمار می‌رود. یکی از مکانیسم‌های اصلی توسعه این عفونت‌ها، توانایی تشکیل بیوفیلم است که چسبندگی باکتری‌ها به سطوح مختلف وسایل پزشکی، از جمله کاتترها و دریچه‌های مصنوعی قلب، را تسهیل می‌کند. توانایی تشکیل بیوفیلم در سویه‌های مختلف استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس متفاوت است و این ساختار، نقش کلیدی در پایداری باکتری و مقاومت آن‌ها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و پاسخ ایمنی میزبان دارد. به نظر می‌رسد شیوع بیماری‌های مرتبط با بیوفیلم در سال‌های اخیر رو به افزایش است (۱۹). پست‌بیوتیک‌ها ترکیبات زیست‌فعال هستند که از متابولیت‌ها و اجزای ساختاری میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک حاصل می‌شوند و بدون نیاز به حضور سلول‌های زنده، اثرات سودمندی بر سلامت دارند. این ترکیبات شامل اسیدهای چرب کوتاه‌زنجیره، پپتیدها، پلی‌ساکاریدها و اجزای دیواره سلولی بوده و نسبت به پروبیوتیک‌ها از پایداری، ایمنی و قابلیت استانداردسازی بالاتری برخوردارند. پست‌بیوتیک‌ها کمتر تحت تأثیر شرایط محیطی قرار گرفته و به دلیل ایمنی بیشتر، به‌ویژه برای افراد دارای نقص ایمنی، در صنایع غذایی و دارویی کاربرد گسترده‌تری دارند (۲۰). نتایج بررسی اثر مهار پست‌بیوتیک‌های دوتایی (لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس) و سه‌تایی (لاکتوباسیلوس پلانتروم، لاکتوباسیلوس رامنوسوس و باسیلوس کواگولانس) بر استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس نشان داد که با کاهش غلظت پست‌بیوتیک، جذب نوری افزایش یافته و اثر مهار کاهش می‌یابد. برای پست‌بیوتیک

دوتایی، در غلظت ۱۰۰ درصد، بیشترین درصد مهار رشد استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حدود ۸۵ درصد و ۸۶ درصد (فاقد تفاوت آماری معنی دار با تاثیر مهار غلظت‌های ۵۰، ۲۵ و ۱۲/۵) و در غلظت ۳/۱۳ درصد حدود ۲۸ درصد و ۱۹/۷ درصد گزارش شد. تفاوت معنی داری بین تاثیر مهار بر دو پاتوژن مشاهده نشد، به جز در غلظت ۶/۲۵ درصد که اثر کمی به نفع استافیلوکوکوس اورئوس بود. در مورد پست‌بیوتیک سه‌تایی، در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰ و ۲۵ درصد برای هر دو پاتوژن جذب نوری بسیار پایین و مهار رشد بسیار بالا بود (برای استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس حدود ۹۰ درصد و برای استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۸۷ درصد)، در حالی که در غلظت‌های ۶/۲۵ درصد و ۳/۱۳ درصد، جذب نوری افزایش یافته و رشد تقریباً ۱۰۰ درصد و مهار صفر بود. مقایسه بین دو پاتوژن نشان داد که در غلظت‌های بالاتر، اثر مهار به نفع استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بود، اما در غلظت‌های پایین‌تر تفاوت معناداری مشاهده نشد. میتوان نتیجه گرفت که پست بیوتیک دوتایی بر خلاف سه تایی در غلظت های پایین تر نیز اثر مهاري دارد. پست بیوتیک تک هم در غلظت ۱۰۰ تفاوت معناداری بین دو پاتوژن نداشت.

در پژوهش سیلاتو و همکاران (۲۰۲۱)، فعالیت ضد میکروبی سه سویه لاکتوباسیلوس لاکتوباسیلوس گاسری، لاکتوباسیلوس فرمنتوم و لاکتوباسیلوس کریسپاتوس به‌صورت منفرد و ترکیبی (۱:۱:۱) بررسی شد. سوپرناتانت‌ها در آزمون لکه آگار علیه استافیلوکوکوس اورئوس هاله بازدارندگی ۶-۱۰ میلی‌متر ایجاد کردند. در آزمون میکروپلیت ۹۶ خانه، مخلوط سه‌تایی و سوپرناتانت لاکتوباسیلوس گاسری کاهش قابل توجه جمعیت پاتوژن تا حدود 10^4 CFU/mL نشان دادند، در حالی که دو سویه دیگر تنها کاهش محدودی (تا حدود 10^4 CFU/mL) داشتند (۲۱). این نتایج نشان می‌دهد ترکیب سه‌گانه لاکتوباسیلوس اثر هم‌افزای قوی بر مهار استافیلوکوکوس اورئوس دارد و با یافته‌های تحقیق حاضر همسو است، هر چند تفاوت‌های جزئی ناشی از نوع سویه و روش آزمایش و نقش pH محیط است.

تأیید نقش کلیدی غلظت در کارایی پست‌بیوتیک‌ها، نشان‌دهنده‌ی اثر هم‌افزایی متابولیت‌های باکتریایی و ظرفیت بالقوه‌ی پست‌بیوتیک‌های چندسویه در توسعه‌ی راهبردهای نوین برای کنترل پاتوژن‌های مقاوم به دارو می‌باشد (۹).

بر اساس گزارش محمد مجید و همکاران (۲۰۲۰)، پست‌بیوتیک حاصل از *باسیلوس کوگولانس* علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* دارای MIC₅₀ معادل ۲ درصد (V/V) بوده است. در مقابل، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که در غلظت ۱۰۰ درصد (V/V)، میزان مهار رشد برای *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۷۸/۷۴ درصد و برای *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* حدود ۶۰/۱۳ درصد می‌باشد و در غلظت‌های پایین‌تر نیز اثر مهاری رشد به طور قابل توجهی کاهش یافت. بنابراین، احتمال می‌رود که ترکیبات فعال موجود در سوپرناتانت مطالعه حاضر از نظر غلظت و پایداری در سطح پایین‌تری قرار داشته باشند. افزون بر این، تفاوت در نوع ترکیب به‌کاررفته میان دو مطالعه نیز می‌تواند توجیه‌کننده نتایج باشد. در حالی که در پژوهش محمد مجید و همکاران از یک ترکیب خالص‌شده حاصل از سوپرناتانت *باسیلوس کوگولانس* و مشخص به نام لاکتواسپورین به‌عنوان نماینده اصلی ترکیبات ضدباکتریایی استفاده گردید، در تحقیق حاضر از سوپرناتانت تام بهره‌گیری شد که حاوی مجموعه‌ای متنوع از متابولیت‌ها با فعالیت‌های متفاوت است. این تفاوت در ماهیت نمونه‌ها می‌تواند به‌طور مستقیم بر میزان کارایی ضدباکتریایی مشاهده‌شده اثرگذار باشد. افزون بر این، در مطالعه یادشده گزارش گردید که پست‌بیوتیک مذکور در شرایط اسیدی پایدار و فعال باقی می‌ماند؛ حال آنکه در محیط‌هایی با pH بالاتر از ۶ هیچ‌گونه هاله بازدارندگی مشاهده نشد. همچنین نتایج نشان داد که این ترکیب از پایداری حرارتی مطلوبی برخوردار است، به‌گونه‌ای که حتی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳۰ دقیقه، توانست اثرات مهاری خود را حفظ نماید (۲۳).

در مطالعه‌ی کمپوس سودره و همکاران در سال ۲۰۲۳، فعالیت ضد میکروبی چند پروبیوتیک از جمله لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس علیه *استافیلوکوکوس*

گوتیرس پرییتو و همکاران (۲۰۲۰) به بررسی فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک حاصل از لاکتوباسیلوس پلانتروم پرداختند که با بهره‌گیری از روش‌های متفاوت، تیمار اولتراسونیک و اولتراسونیک همراه با فریز-دفریز تهیه شده بود. نتایج حاصل از آزمون‌های آنتاگونیستی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد که در هر دو روش یادشده، هاله مهاری با قطر میانگین حدود ۱۶/۸ میلی‌متر تشکیل گردید و تفاوت معناداری میان دو روش مشاهده نشد. افزون بر این، بررسی اثر pH نشان داد که در شرایط خنثی (pH = ۷) هیچ‌گونه فعالیت بازدارندگی قابل‌ملاحظه‌ای ظاهر نگردید، در حالی که در محیط اسیدی تر (pH=۳/۸) تشکیل هاله مهاری چشمگیر مؤید بروز فعالیت ضدباکتریایی بود. در مقایسه با این مطالعه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قطر هاله بازدارندگی پست‌بیوتیک در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* حدود ۱۲ میلی‌متر به‌دست آمد. این اختلاف اندازه می‌تواند ناشی از تفاوت در شرایط آزمون، از جمله غلظت متابولیت‌های زیستی ترشح‌شده، ویژگی‌های سویه باکتریایی مورد استفاده، یا حتی شرایط فیزیکی و شیمیایی محیط کشت باشد. به‌طور کلی، یافته‌ها تأیید می‌کنند که فعالیت ضد میکروبی پست‌بیوتیک‌ها به شدت وابسته به عوامل محیطی به‌ویژه pH و نوع تیمار فرآیند است و همین امر ضرورت استانداردسازی شرایط تولید و آزمون را برای مقایسه‌پذیری نتایج برجسته می‌سازد (۲۲).

نتایج مطالعه‌ی هیئوک جین چونگ و همکاران (۲۰۲۲) نشان داد که پست‌بیوتیک ترکیبی حاصل از لاکتوباسیلوس لاکتیس و لاکتوباسیلوس هلوئیکوس که به‌وسیله‌ی دستگاه روتاری اوپراتور تهیه شده بود، اثر ضدباکتریایی قوی‌تری بر *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به پست‌بیوتیک تک‌سویه لاکتوباسیلوس لاکتیس دارد. این ترکیب در غلظت ۱۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانست رشد باکتری را تا حدود ۵۰٪ مهار نماید. در مقایسه، نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پست‌بیوتیک دوتایی در همین غلظت توانست اثر مهاری قابل توجهی معادل ۸۱/۷ درصد علیه این پاتوژن اعمال کند، در حالی که پست‌بیوتیک سه‌تایی در همین غلظت تنها ۲۸/۲ درصد مهار را نشان داد، اما در غلظت ۲۵ درصد میزان مهار آن به ۸۷/۲ درصد افزایش یافت. این یافته‌ها علاوه بر

این پژوهش با بهره‌گیری از تجهیزات و امکانات آزمایشگاهی «بخش علوم تحقیقات علوم تولیدمثل، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد» انجام شد. بدین‌وسیله از مسئولان محترم آن بخش به‌دلیل حمایت‌های فنی و فراهم آوردن فرصت انجام آزمایش‌ها در این مرکز قدردانی می‌گردد.

اورئوس به‌وسیله‌ی آزمون روش هم‌پوشانی نقطه‌ای^۷ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تلقیح ۱۰ میلی‌لیتر از هر یک از سوسپانسیون‌های باکتریایی (لاکتوباسیلوس پلانتروم و لاکتوباسیلوس رامنوسوس) منجر به ایجاد هاله‌های بازدارندگی با قطر متفاوت شد؛ به‌طوری‌که لاکتوباسیلوس پلانتروم هاله‌ای به قطر تقریبی ۱۸ میلی‌متر و لاکتوباسیلوس رامنوسوس هاله‌ای به قطر حدود ۸/۷۵ میلی‌متر ایجاد کرد. علاوه بر این، بررسی اثر سوپرناتانت‌های حاصل از کشت لاکتوباسیلوس پلانتروم نشان داد که pH محیط نقش تعیین‌کننده‌ای در میزان فعالیت ضد میکروبی این سویه دارد. به‌طور مشخص، سوپرناتانت‌های حاصل از کشت لاکتوباسیلوس پلانتروم در شرایط اسیدی (pH=۵) در غلظت‌های ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ میلی‌لیتر، علیه استافیلوکوکوس اورئوس (۱۰ میکرولیتر معادل ۱۰^۸ CFU/ml) فعالیت ضد میکروبی نشان داد و در این محدوده غلظتی، اثر آن باکتریواستاتیک (مهارکننده رشد) بود. همچنین، در شرایط خنثی (pH=۷) نیز این سوپرناتانت‌ها در هیچ‌یک از غلظت‌های آزمایش‌شده، هیچ‌گونه خاصیت مهارکنندگی علیه میکروارگانیسم پاتوژن نشان ندادند. این یافته‌ها بیانگر آن است pH محیط یکی از عوامل تعیین‌کننده در شدت این فعالیت به شمار می‌رود (۲۴).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این پژوهش نشان داد که پست‌بیوتیک‌های دوتایی و سه‌تایی دارای اثرات ضد میکروبی قابل توجهی هستند. پست‌بیوتیک‌های مورد بررسی توانستند رشد دو باکتری بیماری‌زای استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس پیدرمیدیس را به‌طور مؤثری مهار کنند؛ به‌طوری‌که در غلظت‌های بالا، میزان مهار رشد هر دو پاتوژن بیش از ۸۵ درصد بود. در میان نمونه‌ها، پست‌بیوتیک سه‌تایی بیشترین اثر بازدارندگی را در غلظت‌های بالا نشان داد، در حالی‌که پست‌بیوتیک دوتایی حتی در غلظت‌های پایین‌تر نیز فعالیت ضد میکروبی قابل توجهی داشت.

تشکر و قدردانی

مراجع

1. aez H, Ghazi Saeidi K, Moradi A, Tabaraei A, Khodabakhshi B, Bazouri M, Golriz N, Ghaemi E. Antibiotic resistance pattern of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Health-educational centers of Gorgan, Iran, 2008-2009. Iran J Med Microbiol. 2010;3(4):31-6.
2. Cunha, Calsolari R. Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Insights. 2008;1:MBI. S796.
3. Mellinohoff SC, Bruns C, Albertsmeier M, Ankert J, Bernard L, Budin S, Bataille C, Classen AY, Cornely FB, Couvé-Deacon E. *Staphylococcus aureus* surgical site infection rates in 5 European countries. Antimicrob Resist Infect Control. 2023;12(1):104.
4. Mariani F, Galvan E. *Staphylococcus aureus* in polymicrobial skin and soft tissue infections: impact of inter-species interactions in disease outcome. Antibiotics. 2023; 12: 1164.
5. Danesh M R-FS, Arabestani MR. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from a referral hospital in Isfahan. Iran J Infect Dis Trop Med. 2015;20(71):25-31.
6. Tabaei S, Kouhi Noghondar M, Mohammadzadeh M, Ataei L, Amel Jamehdar S. Pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains isolated from clinical specimens: Imam Reza hospital in Mashhad. Med J Mashhad Univ Med Sci. 2016;59(2):64-70.
7. da Silva Vale A, de Melo Pereira G, de Oliveira A, de Carvalho Neto D, Herrmann L, Karp S, Soccol C, Soccol C. Production, Formulation, and Application of Postbiotics in the Treatment of Skin Conditions. Fermentation, 9, 264. 2023.
8. Patil E, Rawtal B, Sakharwade S. Magical approach of probiotics in cosmetics. World J Pharm Res. 2020;9(11):404-16.
9. Chung H-J, Lee H, Kim M, Lee JW, Saeed M, Lee H, Jung S-H, Shim J-J, Lee J-L, Heo K. Development and metabolic profiling of a postbiotic complex exhibiting antibacterial activity against skin microorganisms and anti-inflammatory effect on human keratinocytes. Food Sci Biotechnol. 2022;31(10):1325-34.
10. Homayouni-Rad A, Fathi-Zavoshti H, Douroud N, Shahbazi N, Abbasi A. Evaluating the role of postbiotics as a new generation of probiotics in health and diseases. J Ardabil Univ Med Sci. 2020;19(4):381-99.
11. De Almeida CV, Antiga E, Lulli M. Oral and topical probiotics and postbiotics in skincare and dermatological therapy: A concise review. Microorganisms. 2023;11(6):1420.
12. Aggarwal S, Sabharwal V, Kaushik P, Joshi A, Aayushi A, Suri M. Postbiotics: from emerging concept to application. Front Sustain Food Syst. ۲۰۲۲ ۸۸۷۶۴۲ :۶
13. Moazzen N, Ahanchian H, Golmohammadzadeh S, Delaram K, Sadeghi T, Masroor AH, Khameneh B. Development and clinical assessment of new topical cream containing postbiotic in the treatment of pediatric atopic dermatitis. Research Square [Preprint]. 2023.
14. El Far MS, Zakaria AS, Kassem MA, Edward EA. Characterization of probiotics isolated from dietary supplements and evaluation of metabiotic-antibiotic combinations as promising therapeutic options against antibiotic-resistant pathogens using time-kill assay. BMC Complement Med Ther. 2024;24(1):303.
15. Drumond MM, Tapia-Costa AP, Neumann E, Nunes AC, Barbosa JW, Kassuha DE, Mancha-Agresti P. Cell-free supernatant of probiotic bacteria exerted antibiofilm and antibacterial activities against *Pseudomonas aeruginosa*: A novel biotic therapy. Front Pharmacol. 2023;14:1152588.
16. Frickmann H, Klenk C, Warnke P, Redanz S, Podbielski A. Influence of probiotic

culture supernatants on in vitro biofilm formation of staphylococci. Eur J Microbiol Immunol. 2018;8(4):119-27.

17. Elughi GN, Oniha MI, Obafemi YD, Akinyosoye AD, Ahuekwe EF, Akinduti PA. Antibacterial Activity of Cell-Free Supernatants of Probiotic *Lactobacillus* against Bacterial Pathogens Associated with Vaginal Infections. J Pure Appl Microbiol. 2024;18.(۱)

18. Ostad E, Ataee N, Shokouhfard M. Antimicrobial Activity of *Bacillus Coagulans* Supernatant Against Human Enteric Pathogens. Shiraz E-Med J. 25.(۱۰)

19. Shahkarami F, Rashki A. Prevalence of ica operon related genes in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. Iran J Med Microbiol: Volume. 2016;9.(۴)

20. Zhang Y, Wang X, Liu J, Yang F, Chen T, Li Q. Postbiotics formulation and therapeutic effect in inflammation: current evidence and future directions. Nutrients. 2024;17(2187):10.3390.

21. Scillato M, Spitale A, Mongelli G, Privitera GF, Mangano K, Cianci A, Stefani S, Santagati M. Antimicrobial properties of *Lactobacillus* cell-free supernatants against multidrug-resistant urogenital pathogens. Microbiologyopen. 2021;10(2):e1173.

22. Gutiérrez Prieto B. Postbiotic effect evaluation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus plantarum* 299v lysates obtained through ultrasonication against common skin pathogenic bacteria. Preprint. 2021.

23. Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Mundkur L, Rajalakshmi H, Shah K, Beede K. Novel topical application of a postbiotic, LactoSporin®, in mild to moderate acne: a randomized, comparative clinical study to evaluate its efficacy, tolerability and safety. Cosmetics. 2020;7(3):70.

24. Sodré MTC, Ferraz FA, Alencar AKV, Silva KF, Silva DHdS, Silva LdS, Araújo Carneiro JSdS, Monteiro CA, Silva LCN, Monteiro AdS. The Potential of *Lactiplantibacillus plantarum* ATCC 14917 in

the Development of Alginate-Based Gel Formulations with Anti-*Staphylococcus aureus* Properties. Pharmaceuticals. 2023;16(8):1112.

Investigation of the inhibitory effect of several postbiotic samples against pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

Motahare sadat kollolema¹, Arezoo Tahmourespour^{2*}, Fateme zare³

1 Master's student in Medical Biotechnology, Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Isf C, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2 Department of Basic Medical Sciences, Faculty of Dentistry, Isf.C, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

3 Reproductive Immunology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Corresponding author: atahmoures@iau.ac.ir

Abstract

Postbiotics, the metabolic products of probiotics, are effective in modulating the immune system, inhibiting infections, and reducing inflammation. Due to the high potential for antibiotic resistance and excessive immune stimulation caused by probiotics, postbiotics are considered a suitable alternative with similar benefits and fewer side effects. This study aimed to investigate the antimicrobial properties of several postbiotic samples derived from *Lactobacillus* and *Bacillus* species against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. Postbiotics prepared from *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus plantarum*, and *Bacillus coagulans* after 24 and 48 hours of incubation were used. The antimicrobial activity of postbiotics from Group A (*B. coagulans*), Group B (a combination of *L. rhamnosus* and *L. plantarum*), and Group C (a combination of all three species) was evaluated using agar disk diffusion and broth microdilution methods, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. Statistical analysis was performed using the Van der Waerden test in SPSS-27, and the inhibitory effect of all groups was significant compared to the negative control ($P < 0.001$). Postbiotic Group B significantly inhibited the growth of *S. epidermidis* and *S. aureus*, with mean inhibition zone diameters of 13 mm and 10 mm and MIC₇₀ values of 6.25% and 12.5%, respectively. Group C showed a mean inhibition zone of 9 mm and an MIC₉₀ of 25%. At 100% (v/v) concentration, the inhibitory effect of Group C (87.5% and 89.5%) on *S. epidermidis* and *S. aureus* was higher than that of Group B (86.3% and 85.3%). These findings highlight the antimicrobial potential of both combined and individual postbiotics and the superiority of combined formulations, supporting the development of new antimicrobial agents with a reduced risk of antibiotic resistance.

Keywords: Probiotic, Postbiotic, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*