تولید کننده مطالعه اثر باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر *استافیلوکوکوس اورئوس* اسلایم

نازیلا ارباب سلیمانی[1*]، مریم مهدوی[1]

۱-گروه میکروب شناسی، واحد دامغان، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان،ایران.

***نویسنده مسئول:** *nazilaarbab@yahoo.co.uk*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۰۱

چکیده

امروزه محققین معتقدند که با جلوگیری ازمرحله اتصال باکتری های بیماریزا به سلول میزبان می توان از ایجاد بیماری ممانعت کرد. یکی از راه های موثر در این امر استفاده از میکروارگانیسم های مفید بومی محصولات لبنی نظیر *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی است. هدف از این مطالعه بررسی اثر با کتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده اسلایم بود. ۳۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* از نظر تولید اسلایم و و وجود ژن های *icaA* و*icaB* موثر در تولید آن به ترتیب با روش های کنگو رد آگار اصلاح شده و PCR بررسی شدند. بررسی قدرت تولید بیوفیلم باکتری های بیماریزا با روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای انجام شد. اثر ضدمیکروبی کشت کامل *لاکتوباسیلوس* پروبیوتیکی با استفاده از روش کشت دو لایه اصلاح شده بررسی شد. تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باباکتری پاتوژن با استفاده از روش کواگریگیشن انجام شد. اثر ضد اتصالی باکتری پروبیوتیک بر *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای بررسی شد. نتایج نشان داد که ۹۰درصد از سویه ها اسلایم قوی و ۶۰درصد آن ها بیوفیلم قوی تولید کردند .درصد فراوانی *icaA* و *icaB* به ترتیب برابر ۶۰درصد و ۵۰درصد بود. میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور باکتری پروبیوتیک حدود ۳۵ میلیمتر بدست آمد. میانگین درصد تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و اثر ضد اتصالی سوپرناتانت آن با *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۴۳ درصد و ۵۷ درصد بدست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده، *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در جلوگیری از اتصال، تشکیل بیوفیلم و بیماریزایی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای اثرات چشمگیری است و می تواند کاندید درمانی مناسبی باشد.

کلید واژه ها: کلمات کلیدی: *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، اسلایم، *استافیلوکوکوس اورئوس*

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از باکتری های فرصت طلب است که شیوع فراوان آن در محیط و مقاومت بالای آن در سطوح خشک سبب شده تا به عنوان یک معیار آلودگی در بیمارستان در نظر گرفته شود . ازعواملی که در بیماری-زایی این باکتری نقش اساسی دارد می توان به قدرت تولید اسلایم و بیوفیلم اشاره کرد (Azera et al;2017) .اسلایم ماده ای خارج سلولی از جنس پلی‌ساکارید است و سلول باکتری را قادر می‌سازد که بیوفیلم لایه لایه تولید کرده و سیستم ایمنی میزبان آن را تشخیص ندهد. (Otto;2018). زمانیکه باکتری ها بیوفیلم تشکیل می دهند مقاومت آنها نسبت به شرایط نامساعد محیطی و بیوسایدها زیاد می شود و از طرف دیگردر بیوفیلم مواد را نگه داری و تغلیظ می نمایند واز مواد متابولیکی یکدیگر مصرف و در نتیجه ظرفیت کلونیزاسیون بالاتری نسبت به

گونه هایی که فاقد بیوفیلم هستند، دارند (Bouvet er al;2017). ژنهای کد کننده مهمترین مواد و پروتئین ها ، به خصوص ادهسین پلی ساکاریدی که در تشکیل اسلایم و به دنبال آن بیوفیلم این باکتری شرکت دارند متعلق به اپرون *ica* هستند (Szweda et al;2012). این اپرون شامل ژنهای *ica*ADBC و ژن تنظیم کننده *icaR* است که این ژن برخلاف جهت اپرون *ica* رونویسی می شود. هنگامیکه این اپرون فعال می شود ، اگزوپلی ساکارید و پلی سوکسینیل گلوکز آمین سنتز می شود و تماس سلول به سلول را از طریق بیوفیلم چند لایه پشتیبانی می کند (Diemond et al,2010.Figueiredo et al,2017). فلور لاکتیکی با توان پروبیوتیکی محصولات لبنی نقش مهمی را در تغذیه و سلامتی مردم ایفا می‌کنند . پروبیوتیک به میکروارگانیسم زنده ای گفته می شود که می تواند ضمن عبور از دستگاه گوارش زنده بماند و اثرات مفید و سودمند بر روی میزبان بر جا گذارد. *لاکتوباسیلوس*ها به دلیل توانایی‌شان در تخمیر و نیز اهمیت‌شان در سلامتی انسان به عنوان پروبیوتیک مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند (Sabina;2014). این باکتری ها ترکیباتی مانند اسیدهای آلی، دی استیل، پراکسید هیدروژن و نیز باکتریوسین‌ها را در طی تخمیر لاکتیکی تولید می‌کنند که اثر حفاظتی آنها در مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Colombo et al;2018). *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی قادر به مهار کلونیزاسیون عامل بیماری‌زا هستند و از مکانیزم های مختلفی در مهار عوامل بیماری زا استفاده می کنند، از جمله رقابت مستقیم برای محل اتصال در سلول‌های اپی‌تلیال و رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا برای موادغذایی (Shaaban et al;2020). گونه های *لاکتوباسیلوس* با داشتن خاصیت تجمع پذیری سلولی (Co-aggregation)، با میکروبهای بیماری زا تجمیع شده و با اعمال اثرات ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتریهای عفونت زا به سلول هدف در میزبان شده و در نهایت مانع از شروع بیماری و گسترش عفونت می شوند. امروزه قدرت تجمع پذیری گونه های *لاکتوباسیلوس* با باکتری های بیماریزا را به علت پروتئین های اغلب سطحی موجود در سوپرناتانت می دانند (Cheraghi et al,2019.Anna et al,2022). هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد اتصالی و مهاری باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* تولید کننده اسلایم بود.

مواد و روش کار

تهیه نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس*

۳۰ نمونه تایید شده باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* از دانشگاه علوم پزشکی تهران تهیه شد. به منظور اطمینان از خالص بودن نمونه ها، ابتدا هر نمونه بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار با استفاده از روش کشت خطی، کشت داده شدند و باکتری های خالص شده با استفاده از تست های متداول بیوشیمیایی از قبیل کاتالاز ، کوآگولاز ، تخمیر قند مانیتول و از نظر آنزیم DNase بروی محیط DNase آگار بررسی شدند. لازم به ذکر است که تمام محیط های کشت استفاده شده در این مطالعه مربوط به شرکت مرک آلمان بود.

بررسی تولید اسلایم *استافیلوکوکوس اورئوس*

به منظور بررسی وجود اسلایم که یکی از فاکتورهای مهم در اتصال و تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* است، ابتدا کشت تازه از نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* در محیط *تریپتیک سوی آگار* ((TSA)) Tryptic Soy Agar) تهیه شد. سپس از کلنی خالص شده هر باکتری بطور جداگانه برروی پلیت حاوی کنگورد آگار (Congo red agar)کشت خطی تهیه شد. پلیت ها ابتدا به مدت ۲۴ ساعت با منظور تولید اسلایم در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند . سپس به مدت ۴۸ و۷۲ ساعت به منظوربررسی ماندگاری و تکمیل تولید اسلایم در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند. در صورتیکه باکتری فاقد قدرت تولید اسلایم باشد رنگ نگرفتن کلنی یا صورتی رنگ شدن کلنی نشان دهنده عدم تولید اسلایم خواهد بود (Murugan et al;2010).

بررسی تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*

به منظور بررسی قدرت تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* که ناشی از اتصال این باکتری به سطوح است از میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه ای پلی استیرنی استفاده شد. از کلنی باکتری به ۵ میلی لیتر محیط *کشت* (TSA) تلقیح شد. پس از ۱۸ الی ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷ درجه سلسیوس، ۱میلی لیتر از سوسپانسیون به ۱۰ میلی لیتر محیط کشت (TSA) منتقل شد . ۲۰۰ میکرولیتر از این محیط حاوی باکتری به داخل چاهک میکروتیتر پلیت تلقیح و در چاهک شاهد محیط کشت استریل فاقد باکتری ریخته شد. میکروتیتر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرما گذاری شد. سپس محتویات چاهک ها خالی و چاهک ها سه بار با سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. ۲۰۰میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به چاهک ها اضافه و بعد از گذشت ۱۵ دقیقه محتویات چاهک ها تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک شد. هر یک از چاهک ها به مدت ۵ دقیقه با رنگ کریستال ویوله ۲ درصد رنگ و پس از گذشت این زمان چاهک ها شستشو داده شد.۲۰۰میکرولیتر اسید استیک۳۳ درصد به چاهک ها اضافه ومیکروتیتر پلیت به مدت ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. جذب نوری چاهک ها در طول موج های۴۹۲ نانومتر با دستگاه الایزا ریدر (Stat Fax 3200 Microplate Reader) خوانده شد. سویه هایی که قابلیت اتصال به سطح و تشکیل بیوفیلم را داشتند به سه دسته قوی ، متوسط و ضعیف دسته بندی شدند (Hiva et al,2020).

۱)فاقد بیوفیلم: ۰/۱۰۰> جذب

۲)بیوفیلم قوی : ۰/۳۰۰≥ جذب

۳)بیوفیلم متوسط: ۰/۳۰۰ > جذب ≥۰/۲۰۰

۴) بیوفیلم ضعیف:۰/۲۰۰ > جذب ≥۰/۱۰۰

آزمون Multiplex PCR

استخراج DNA با کیت (PGA DNA Extraction شرکت پویاژن آزما با شماره PD100-050- ایران) بر اساس دستور عمل کیت انجام شد. واکنش PCR Multiplexبا حجم نهایی ۴۰ میکرولیتر شامل ۸/۳ میکرولیتراز Master Mix (حاوی۴ میکرولیتر PCR بافر،۳ میکرولیتر $MgCl_2$، ۱ میکرولیتر مخلوط dNTP و۰/۳ میکرولیتر آنزیم DNA Taq Polymerase)، ۲ میکرولیتر DNAی الگو، ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرهای (Forward و Reverse) *icaA* و*icaB* (طراحی شده با نرم افزار Oligo7) و ۲۵/۷ میکرولیتر آب مقطر استریل، با چرخه های واسرشته سازی اولیه (Initial Denaturation) در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ سیکل شامل ۳ مرحله انکوباسیون در ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال (Annealing) در۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله بسط (Extension) در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط نهایی (Final Extension) در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه انجام گرفت. در نهایت الکتروفورز محصولات تکثیر یافته در ژل آگارز ۱ درصد انجام شد. سویه استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس*(ATCC 25923) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

جدول۱- توالی پرایمر

ژن	توالی پرایمر	اندازه محصول
icaA(F)	5’-TAAAGCCAACGCACTCAATC-3’	342bp
icaA(R)	5’-TCTTCGGTAATCATATCAGTATCC-3’	
icaB(F)	5’-GAGGAAGAGAATCGTGAAGTATAG-3’	719bp
icaB(R)	5’-CGTCATTCATCAAGCCATAAGG-3’	

بررسی اثر ضدباکتریایی کشت کامل باکتری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با روش کشت دولایه اصلاح شده

ابتدا ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* PTCC8014، خریداری شده از کلکسیون میکروبی سازمان علمی صنعتی ایران، در محیط MRS براث (deMan, Rogosa, and Sharpe (MRS)) با استفاده از سواب استریل در مرکز پلیت MRS آگار قرار داده شد و بعد از جذب رطوبت محیط به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس و در جار بی‌هوازی گرماگذاری شد. سپس محیط کشت MHA آگار تازه مذاب که به دمای محیط رسیده بود بر روی محیط حاوی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به عنوان لایه دوم ریخته شد. بعد از بستن محیط، از کشت شبانه‌ی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* معادل استاندارد نیم مک فارلند بصورت متراکم با کمک سواب استریل کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. نمونه‌ها از نظر قطر هاله عدم رشد در حضور باکتری پروبیوتیک بررسی شدند. آزمایش سه بار تکرار شد و محیط کشت MRS آگار فاقد تلقیح میکروبی به عنوان شاهد در نظر گرفته شد (Ershadian et al;2015)

بررسی اثر ضداتصالی سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با استفاده از میکروتیترپلیت

ابتدا باکتری پروبیوتیک در محیط MRS براث کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ گرماگذاری شد. کشت شبانه از باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز در محیط مولرهینتون براث تهیه شد. سپس نمونه ها ی *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۲۰ درجه سلسیوس، به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شد و نمونه ی *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ و دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. به منظور بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک ها از میکروتیترپلیت پلی استیرنی ۹۶ خانه استفاده شد. ابتدا ۸۵ میکرولیتر از سوپرناتانت پروبیوتیک و سپس ۸۵ میکرولیتر از سوپرناتانت نمونه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به چاهک ها اضافه شد ومیکروتیتر پلیت به مدت ۲۴ ساعت در شرایط دمایی ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. در چاهک های شاهد باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* و محیط کشت استریل ریخته شد. بعداز ۲۴ ساعت گرماگذاری محتویات چاهک ها خارج و هر چاهک سه بار توسط بافرفسفات (PBS) شستشو داده شد. ۲۰۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۱۵ دقیقه اضافه و سلول ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به مدت ۱۰ دقیقه رنگ آمیزی شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک درصد به عنوان حلال به چاهک ها اضافه و میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۲ نانومتر برای هر چاهک اندازه گیری شد. در نهایت میزان کاهش اتصال از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد کاهش اتصال} = \frac{ODa - ODb}{ODa} \times 100$$

ODa *بیانگر* جذب نوری چاهک کنترل و *ODb* جذب نوری چاهک مورد آزمایش است (Sadri et al; 2016).

بررسی تجمع پذیری پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

در این آزمایش میزان قدرت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در اتصال به *استافیلوکوکوس اورئوس* و مهار عملکرد آن ها مشخص شد. باکتری پروبیوتیک در محیط MRS براث کشت و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شد. کشت شبانه از باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* نیز در محیط *برین هارت براث* (BHI) تحت شرایط ۳۷ درجه سلسیوس بدست آمد. سپس باکتری پروبیوتیک و نمونه ی *استافیلوکوکوس اورئوس* در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ و رسوب حاصل توسط بافر فسفات شستشو داده شد. از رسوب باقی مانده در انتهای لوله سوسپانسیون باکتریایی تهیه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون پروبیوتیک و باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* با یکدیگر مخلوط و بلافاصله جذب نوری آن در طول موج ۶۶۰ نانومتر اندازه گیری شد. سپس مخلوط

باکتری ها بـه مـدت ۴ سـاعت در ۳۷ درجـه سلسـیوس گرماگذاری شدند. پس از مدت زمان ذکر شده سـانتریفیوژ شدند. درنهایت سوپرناتانت ها (مایع رویی) از نظر میزان جذب نوری در طـول مـوج ۶۰۰ نـانومتر بررسـی شـدند و میزان تجمع یافتن براساس فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد تجمع یافتن} = \frac{A1 - A2}{A1} \times 100$$

A1 بیانگر جذب نـوری بلافاصـله پـس از مخلـوط کـردن باکتری‌ها و A2 میزان جذب نوری پس از ۴ سـاعت اسـت (Ershadian et al, 2015).

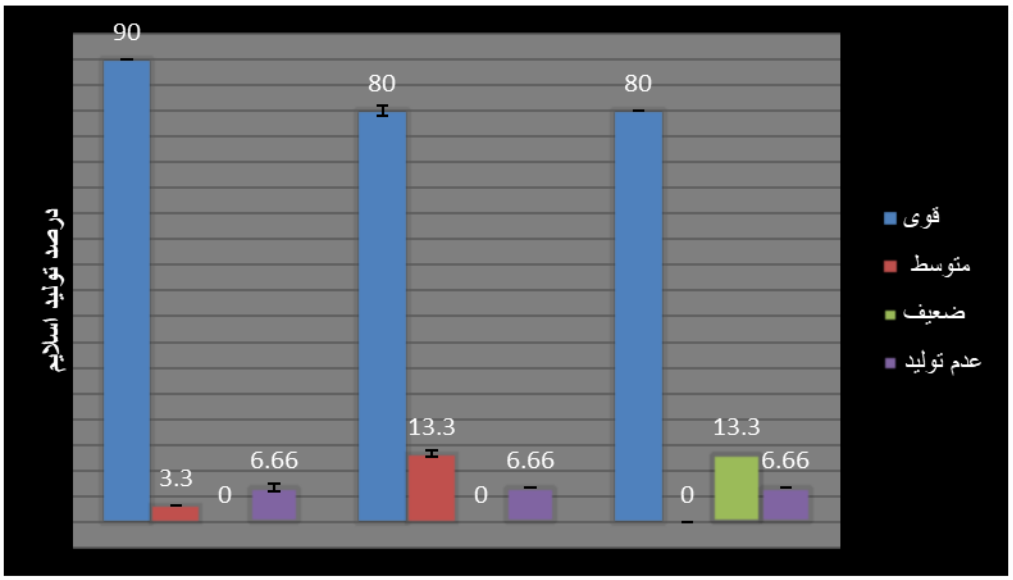
آنالیز آماری

در این مطالعه آزمایشات با سه تکرار انجام شـد و بـرای آنالیز داده ها از آزمـون آمـاری واریـانس (ANOVA) و بسته نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ استفاده شد و با اسـتفاده از نرم افزار Excel نمودارها رسم شدند.

نتایج

تولید اسلایم *استافیلوکوکوس اورئوس*

نتایج نشان داد کـه در ۲۴ سـاعت اولیـه از ۳۰ نمونـه بـه ترتیب ۹۰ درصد و ۳/۳ درصد سویه هـا بـه صـورت قـوی (کلنی های سیاه ،خشک و خشن) و متوسط (کلنـی هـای خاکستری تیره) تولید اسلایم کردنـد، بعـد از گذشـت ۴۸ ساعت به ترتیب ۸۰ درصد و ۱۳/۳ درصد نمونه ها به طـور قوی و متوسط، و بعد از گذشت ۷۲ ساعت به ترتیـب ۸۰ درصد و ۱۳/۳ درصد نمونـه هـا بـه طـور قـوی و ضـعیف اسلایم تولیدکردند (شکل ۱).



شکل ۱- مقایسه تولید اسلایم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* در سه روز

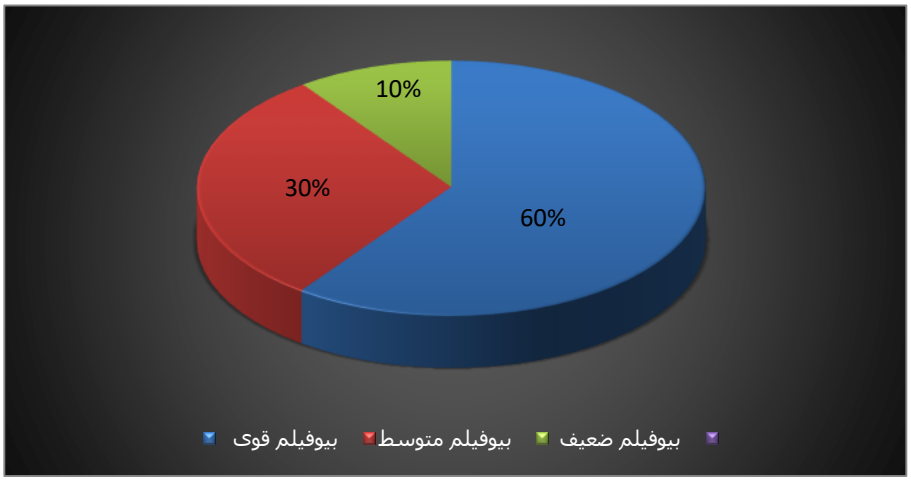
تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئـوس* و ارتبـاط آن بـا تولید اسلایم

بر طبق نتایج بدست آمده ۱۸ نمونه (۶۰ درصد) بیـوفیلم قوی، ۹ نمونه (۳۰ درصد بیـوفیلم متوسـط، ۳ نمونـه (۱۰ درصد) بیوفیلم ضعیف تولیـد کردنـد (شـکل۲). همچنـین مشخص شد که درصـد نمونـه هـا تولیـد بیـوفیلم قـوی و ۸۵/۴ درصد تولید اسـلایم قـوی کـرده بودنـد.۳۰ درصـد نمونه ها تولید بیوفیلم متوسط و۸/۳ درصد تولیـد اسـلایم متوسط کرده بودند. ۱۳ درصـد نمونـه هـا تولیـد بیـوفیلم ضعیف و۶/۷ درصد نمونه ها تولید اسلایم نکردند. بـه ایـن ترتیب می توان نتیجه گرفت که تشکیل بیـوفیلم و تولیـد اسلایم در این باکتری با یکدیگر رابطـه مسـتقیم داشـته و ژن های دخیل در تشکیل آن ها نیز مـی تواننـد مـرتبط باشند.

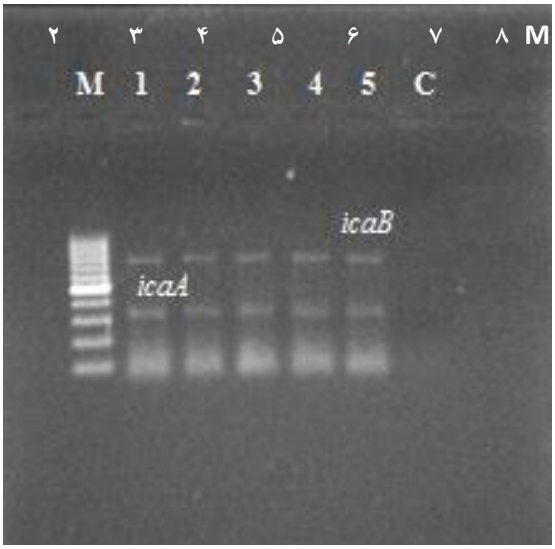
وجود همزمان ژن های *icaA* و *icaB* در *استافیلوکوکوس اورئوس*

با انجام واکنش PCR بر روی DNA ی استخراج شـده از بین باکتری هـای *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* کـه بهتـرین

نتایج را از نظر تولید بیوفیلم و اسلایم داشتند، درصد فراوانی *icaA* و *icaB* به ترتیب برابر ۶۰ درصد و ۵۰ درصد بود. لذا با توجه به این یافته ها بیان این دو ژن در تشکیل بیوفیلم و اسلایم این باکتری دارای ارتباط قوی هستند (شکل۳).



شکل ۲- نتایج کیفیت تشکیل بیوفیلم در نمونه ها ی *استافیلوکوکوس اورئوس*



شکل۳- محصول الکتروفورز Multiplex-PCR برروی ژن های *icaA*(342bp) و*icaB* (719bp) نمونه های *استافیلوکوکوس اورئوس* ، ستون M مارکر(۱ kb) ، ستون ۵(کنترل مثبت) و ستون C (کنترل منفی) هستند.

بر اساس این آزمایش مشخص شد که کشت کامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای اثر ضدباکتریایی چشمگیری علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* است و بطور میانگین قطر هاله عدم رشد ۳۰ نمونه *استافیلوکوکوس اورئوس* در حضور باکتری پروبیوتیک حدود ۳۵ میلیمتر بدست آمد(شکل۴).

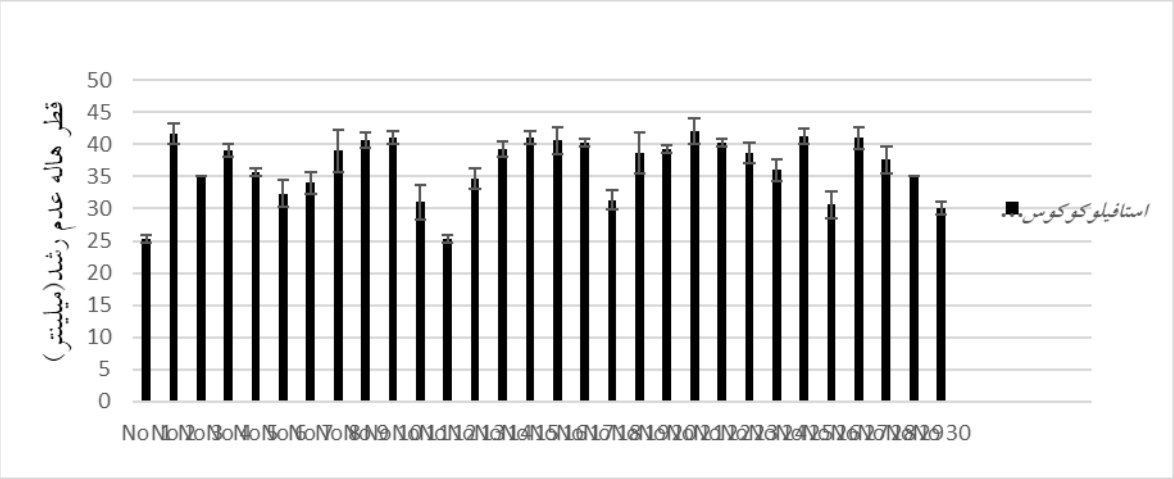
تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با *استافیلوکوکوس اورئوس*

پروبیوتیک ها با قابلیت تجمع پذیری قادر به دام انداختن باکتری های پاتوژن و مهار عملکرد آن ها هستند. نتایج این آزمایش نشان داد که باکتری پروبیوتیک قادر به تجمع با باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس* با درصد قابل توجهی بودند (شکل ۵).

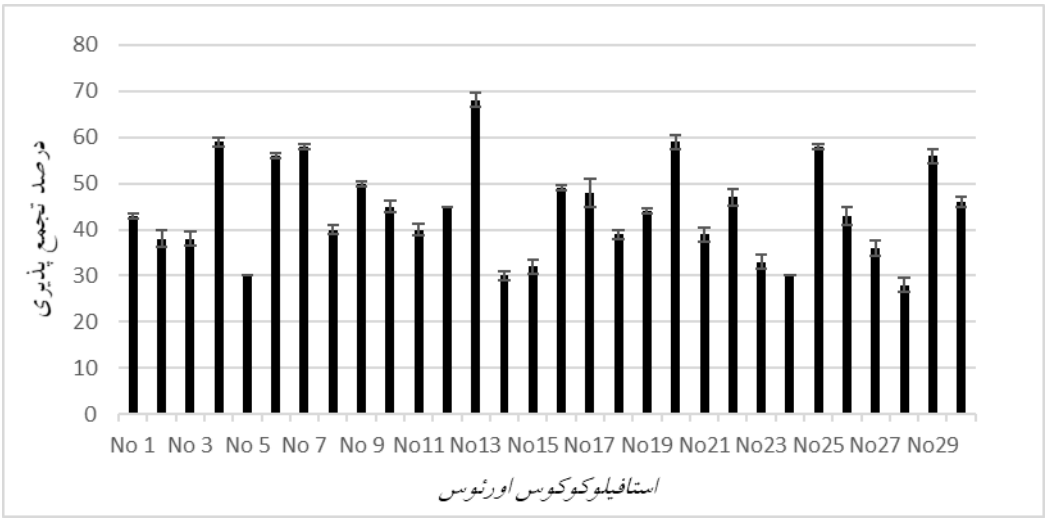
اثر ضد اتصالی سوپرناتانت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* بر علیه باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس*

بررسی اثر ضد اتصالی پروبیوتیک ها بر روی باکتری های بیماریزا، از این جهت که سبب جلوگیری از شروع بیماری

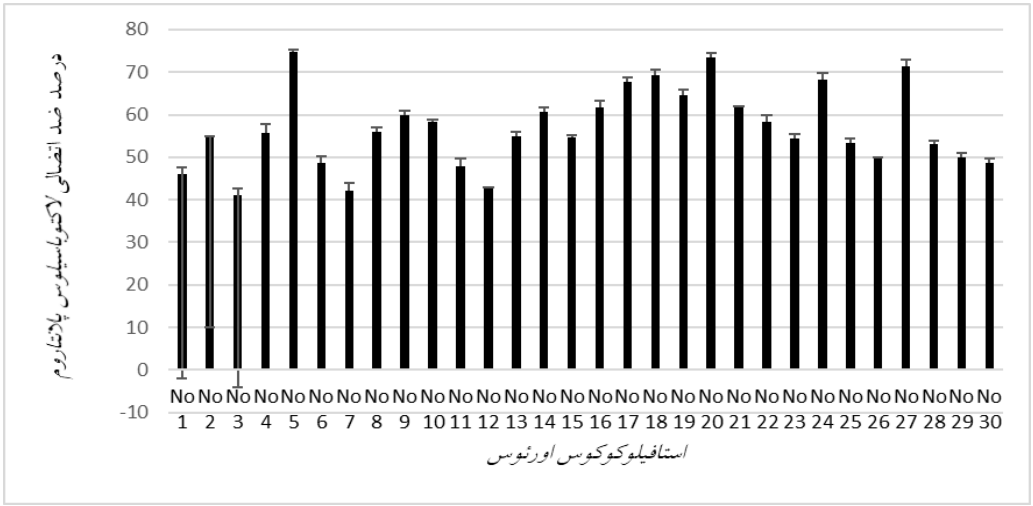
می شود حائز اهمیت است. نتایج نشان داد که سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با میـانگین ۵۷ درصـد دارای اثـر ضد اتصالی بالایی بـر روی *اسـتافیلوکوکوس اورئـوس* بـود (شکل ۶).



شکل ۴- قطر هاله عدم رشد *استافیلوکوکوس اورئوس در حضور لاکتوباسیلوس پلانتاروم*



شکل ۵- درصد تجمع پذیری لاکتوباسیلوس پلانتاروم با استافیلوکوکوس اورئوس



شکل ۶- اثر ضد اتصالی سوپرناتانت لاکتوباسیلوس پلانتاروم بروی باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس

بحث

استافیلوکوکوس اورئوس از باکتری های مهم عامل عفونت های شایع انسانی نظیر فولیکولیت، آبسه های سطحی و عمقی پوست،ز خم های عمیق، سندروم پوست، ذات الریه و مسمومیت های غذایی است. امروزه عوامل متعددی در بیماریزایی و قدرت مقابله این باکتری با مواد ضدمیکروبی گزارش شده است که قدرت تولید بیوفیلم و اسلایم از شایع ترین آن ها است. در تحقیق حاضر قدرت تشکیل بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب ۶۰ ٪ قوی، ۳۰٪ متوسط و ۱۰٪ ضعیف بدست آمد. نوربخش و همکاران در سال ۲۰۱۶ قدرت تشکیل بیوفیلم قوی، و ضعیف را به ترتیب ۷۳/۵ درصد ،۵/۳۳ درصد و۱۵/۴ درصد گزارش کردند (Nourbakhsh and Momtaz;2016). گوریشانکار و همکاران در سال ۲۰۱۶ نشان دادند که ایزوله های بالینی *استافیلوکوکوس اورئوس* دارای توانایی متفاوت در تولید بیوفیلم هستند که این تفاوت ممکن است در ارتباط با بیان ژن بیوفیلم ، آرایش ژنتیکی و یا شرایط فیزیولوژیکی باشد (Gowrishankar et al;2016). اسلایم پلی ساکاریدی است که در اتصال و کلونیزاسیون برخی از میکروارگانیسم ها نظیر *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش ویژه ای دارد. تولید اسلایم و بیوفیلم این باکتری تحت کنترل ژن های *icaA* و *icaD* است که بر روی اپرون ica واقع شده است .لوکوس ica شامل ژن های *icaC* ، *icaB* ، *icaD* ، *icaA* است که واسطه های پروتئینی را کد می کند و در سنتز پلی ساکارید بین سلولی و کپسول پلی ساکاریدی در *استافیلوکوکوس اورئوس* نقش دارد (Arciola et al,2015). درمطالعه حاضر از نظر تولید اسلایم ۸۰ درصد نمونه ها قوی ،۱۳/۳ درصد متوسط و ۶/۶ درصد فاقد قدرت تولید اسلایم بودند و درصد فراوانی ژن های *icaA* و *icaB* به ترتیب برابر ۶۰ درصد و ۵۰ درصد بدست آمد.در تحقیقی که هوآی و همکاران در سال ۲۰۲۰ بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* های تولید کننده بیوفیلم انجام دادند فراوانی ژن *icaA* ۱۱/۱۱ درصد بود و هیچ یک حاوی ژن *icaB* نبودند (Hoai et al,2020). قاسمی و همکاران در سال ۲۰۱۵ فراوانی ژن *icaA* و *icaB* را به ترتیب ۷۳ درصد و۶۳/۳ درصد گزارش کردند و نشان دادند که این فراوانی در سویه های مقاوم به متی سیلین *استافیلوکوکوس اورئوس به* مراتب بیشتر از سویه های عادی است. قادری و همکاران در سال ۲۰۲۰ فراوانی ژن های *icaA* و *icaB* را به ترتیب ۶۷/۴ درصد و ۶۰/۲ درصد گزارش کردند. از دلایلی که می تواند برحضور و فراوانی این ژن ها اثر گذارد، می توان به تغییرات اپیدمیولوژیکی و زمان های نمونه گیری اشاره کرد (Ghaderi et al,2020).

در این مطالعه کشت کامل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* اثر ضد باکتریایی قابل توجهی بر علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت. ارشادیان و همکاران در سال ۲۰۱۵ اثر ضد باکتریایی کشت کامل *لاکتوباسیلوس کازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* علیه باکتری های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس آئروژینوزا* را اثبات کردند و در این میان بیشترین اثر ضدباکتریایی را *لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر علیه استافیلوکوکوس اورئوس* نشان داد (Ershadian et al,2016). گومز و همکاران، در سال ۲۰۱۶طی تحقیقی گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس* های پروبیوتیکی دارای خاصیت ضد باکتریایی علیه باکتری‌های پاتوژن مانند *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *لیستریا مونوسیتوژنز* بودند. ژولیو و همکاران در سال ۲۰۱۹ و رجب و همکاران در سال ۲۰۲۰ عنوان کردند که باکتری‌های اسید لاکتیک به ویژه سویه‌های پروبیوتیکی با مکانیزم‌های مختلف از جمله رقابت بر سر گیرنده‌های سلولی و تولید مواد ضد میکروبی نظیر باکتریوسین‌ها، تولید اسیدهای لاکتیک و اسید استیک، پراکسید هیدروژن، دی استیل، استالدئید و آمونیاک قادرند متابولیسم باکتری‌ها یا تولید سموم توسط آنها را نیز تحت تأثیر قرار دهند و اثرات بازدارندگی روی بسیاری از میکروارگانیسم‌ها داشته باشند. از دیگر ویژگی های بارز *لاکتوباسیلوس* ها که امروزه مورد توجه قرار

گرفته است، توانایی تجمع پذیری آن ها با باکتری بیماریزا است که با به دام انداختن آن ها همانند شمشیر دولبه عمل کرده و از یک طرف سبب مهار رشد باکتری های بیماریزا و از طرف دیگر مانع اتصال آن ها به سطوح می شود (Julio et al,2019.Rajab et al;2020). در این تحقیق درصد تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* با *استافیلوکوکوس اورئوس* با میانگین حدود ۴۳/۵ درصد بدست آمد. در سال ۲۰۱۳ دایانگ رن این درصد را حدود ۴۹/۵ درصد گزارش کرد. زاویستوسکا و همکاران در سال ۲۰۲۲ دلیل تفاوت در نتایج تحقیقات تجمع پذیری *لاکتوباسیلوس* ها با باکتری های بیماریزا را پتانسیل متفاوت گونه های لاکتیکی و الگوهای متفاوت مقاومتی و شرایط جغرافیایی باکتری های بیماریزا گزارش کردند (Zawistowska et al,2022).

از آنجا که اتصال اولین مرحله در ارتباط باکتری و سلول هدف است و مهمترین مرحله شروع بیماری و تولید بیوفیلم محسوب می شود، اگر بتوان از اتصال باکتری ها به سلول هدف جلوگیری نمود می توان براحتی بر بیماری غلبه کرد. در کشت کامل اثر ضد اتصالی پروبیوتیک می تواند به دلیل تولید متابولیت های ضدمیکروبی و در برخی موارد به واسطه ی رقابت مستقیم با پاتوژن برای جایگاه اتصال، علاوه بر ایجاد شرایط اسیدی است (Shaaban et al;2020). در تحقیق حاضر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* حدود ۵۷ درصد از اتصال *استافیلوکوکوس اورئوس* ممانعت کرد. ایت و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر ضد بیوفیلمی سوپرناتانت *لاکتوباسیلوس پنتوسوس* را علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش کردند (It et al,2014). زین و همکاران در سال ۲۰۱۹ عملکرد سوپرناتانت *لاکتوباسلوس پلانتاروم* و*پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی* را بر بیان ژن های دخیل در تشکیل بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و ارتباط آن با مولکول پیام رسان خودالقاگر در سیستم کروم سنسینگ را عامل مهمی برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم این باکتری عنوان کردند که به این ترتیب قدرت بیماریزایی باکتری کاهش می یابد. بر اساس این یافته ها با حذف مرحله اول بیماریزایی یعنی اتصال تا حد زیادی می توان عفونت زایی را کنترل کرد (Xin et al,2019).

نتیجه گیری کلی

بر اساس یافته های این تحقیق می توان گفت که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* دارای اثرات ضد میکروبی و به ویژه ضداتصالی چشمگیری بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* است، لذا استفاده از آنها در درمان و نیز پیشگیری عفونت های *استافیلوکوکی* بسیار مثمر ثمر خواهد بود.

منابع

1. Arciola CR., Campoccia D., and Ravaioli S (2015). Polysaccharise intercellular olandn in biofilm: structural and regulatory aspects.Front.Cell.Infect.Microbiol. 5-7.
2. Azara E., Longheu C., Sanna G., Tola S. (2017). .Biofilm formation and virulence factor analysis of Staphylococcus aureus isolates collected from ovine mastitis. J. Appl. Microbiol. 123:372–379.
3. Bouvet C., Gjoni S., Zenelaj B., Lipsky BA., Hakko E., and Uçkay I (2017). Staphylococcus aureus soft tissue infection may increase the risk of subsequent staphylococcal soft tissue infections. Int J Infect Dis. 60: 44-48.
4. Cheraghi Saray S., Hosseinkhani A., Taghizadeh A., and Mohammadzadeh H (2019). Evaluation of Co-aggregation and Anti-Adhesive Effects of Selenium Nanoparticles and Selected Probiotic Strains on Clinical and StandardStrains of Index Pathogens. Jundishapur Sci Med J. 17(6): 583-595.
5. Colombo M., Castilho N., Todorov S. D., and Nero, LA (2018). Beneficial properties of lactic acid bacteria naturally present in dairy production. BMC microbiology.8 (1): 1-12.
6. Diemond-Hernández B., Solórzano-Santos F., LeañosMiranda B., Peregrino-Bejarano

7. L., and Miranda-Novales G (2010). Production of icaADBC encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in paediatric patients with staphylococcal device-related infections. BMC Infect Dis.10 (1): 68
8. Ershadian.M., Arbab Soleimani. N., Ajoudanifar H., and Vaezi Khakhki MR (2015).The Antimicrobial and Co-aggregation effects of probiotic lactobacilli against some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol. 993: 14-22.
9. Figueiredo AMS., Ferreira FA., Beltrame CO., and Cortes MF (2017). The role of biofilms in persistent infections and factors involved in ica-independent biofilm development and gene regulation in Staphylococcus aureus. Crit. Rev. Microbiol. 43: 602–620.
10. Ghaderi H., Shiri Malekabad Vahid., and Dadashi A (2020). Evaluation of Genotypic and Phenotypic Biofilm Formation by Staphylococcus Aureus Isolated from Clinical Samples and Their Association with Antimicrobial Resistance. Iran J Med Microbiol. 14(5): 441-459.
11. Ghasemian A. , NajarPeerayeh SH., Bakhsh i B., and Mirzaee M (2015). High Prevalence of icaABCD Genes Responsible for Biofilm Formation in Clinical Isolates of Staphylococcus Aureus from Hospitalized Children. Arch. Pediatr. Infect. Dis.3.
12. Gowrishankar S., Kamaladevi A., Balamurugan K., and Pandian SK (2016). In Vitro and In Vivo biofilm characterization of methicillin-resistant staphylococcus aureus from patients associated with pharyngitis infection.;Biomed Res Int. 19(109): 69-79 .
13. Kadkhoda H., Ghalavand Z., Nikmanesh B, Kodori M, Taghizadeh D, and Eslami G (2020). Characterization of biofilm formation and virulence factors of Staphylococcus aureus isolates from
14. paediatric patients in Tehran, Iran. Iran J Basic Med Sci. 23(5).
15. Hoai TT., NguyenThuan H., and NguyenMichael Otto (2020). The staphylococcal exopolysaccharide PIA – Biosynthesis and role in biofilm formation, colonization, and infection. Comput. Struct. Biotechnol. J. 3324–3334.
16. It Ouali F., Al Kassaa I., Cudennec B., Abdallah M., Bendali F., and Sadoun D (2014). Identification of lactobacilli with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. Int J Food Microbiol. 191:116–24.
17. Plaza-Diaz J., Ruiz-Ojeda FJ., Gil-Campos M., Gil A (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. Advances in Nutrition. 10(4):1054-1066.
18. Kim Y-G K., Lee J-H., Raorane CJ., Oh ST., Park JG., and Lee J (2018). Herring oil and omega fatty acids inhibit Staphylococcus aureus biofilm. Formation and virulence. Front Microbiol. 9:1241.
19. Murugan K., Usha M., Malathi P., Saleh Al Sohaibani A, and Chandrasekaran M (2010). Biofilm forming multi drug resistant Staphylococcus spp among patient with conjunctivitis. Poland Journal of Microbiology. 59: 233-239.
20. Nourbakhsh F., and Momtaz H (2016). Evaluation of Phenotypic and Genotypic Biofilm Formation in Staphylococcus Aureus Isolates Isolated from Hospital Infections in Shahrekord, 2016.Arak Medical University Journal. 19(109): 69-79.
21. Otto, M (2018). Staphylococcal biofilms. Microbiol.
22. Rajab S., Tabandeh F., Shahrky MK., and Alahyaribeik S (2020). The effect of Lactobacillus cell size on its probiotic characteristics. Anaerobe.62:1–9.
23. Shaaban M., Abd El-Rahman O.A., Al-Qaidi B., and Ashour HM (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activities of Probiotic Lactobacilli on Antibiotic-

Resistant Proteus mirabilis. Microorganisms.8: 960.
24. Sabina Fijan (2014). Microorganisms with Claimed Probiotic Properties:An Overview of Recent Literature**.** Int J Environ Res Public Health. 11(5): 4745-4767.
25. Sadri M., Arbab Soleimani N., and Forghanifard MM (2016). The study of Antimicrobial and Anti-adhesive effect of Lactobacilli on uropathogenic Escherichia coli (UPEC). Iran J Med Microbiol. 10(6).
26. Szweda P., Schiel MM., Milewski S., Farankowska A., and Jakubczak A (2012). Biofilm production and presence of ica and bap genes in staphylococcus aureus strains isolated from cows with mastitis in the eastern part of Poland. Polish Journal of Microbiology.61:65–69.
27. XinYan Sh., Gu Xingyang., CuiYunjiaShi., ShanshanWen Hongyan Chen., and Junwei Ge (2019). Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from Pediococcus acidilactici and Lactobacillus plantarum against Staphylococcus aureus CMCC26003. Microbial Pathogenesis.127:12-20.
Zawistowska-Rojek A., KośmiderA., Karolina S., and Stefan T (2022). Adhesion and aggregation properties of Lactobacillaceae strains as protection ways against enteropathogenic bacteria. Arch. Microbiol. 204:285.

The study of probiotic *Lactobacillus plantarum* on slime- producing *Staphylococcus aureus*

Arbab Soleimani N[1*], Mahdavi M[1]

1-Department of Microbiology, Damghan Branch, Islamic Azad University, Damghan, Iran.

***Corresponding author**: nazilaarbab@yahoo.co.uk*

Received: 03 November 2022 Accepted: 23 July 2023

Abstract

The present study was conducted with the aim of evaluating the antibiotic resistance pattern of *Bacillus* cereus in ice cream, cake, cheese, and infant formula. For this purpose, 600 samples were prepared from food sales centers in Tehran and transferred to the quality control laboratory of the Faculty of Veterinary Medicine of Tehran University of Medical Sciences and cultured on the special culture medium of *Bacillus* cereus, MYP, which contained polymyxin B supplement and egg yolk. Then, from the pink colonies, gram staining and catalase test were performed and the sensitivity of the isolated bacteria to ampicillin, penicillin, vancomycin, cefazolin, methicillin, cefixime, sulfamethoxazole, trimethoprim, chloramphenicol, cefepime and tetracycline was evaluated based on the disc diffusion method. According to the results, no contamination with B. cereus was observed in any of the cake, cheese and ice cream samples. However, out of 150 infant formula samples, 30 samples were infected with B. cereus (18 samples < 10 CFU/g, 7 samples had 10-102 CFU/g, and 5 samples>102 CFU/g). B. cereus isolated from infant formula has the highest sensitivity to vancomycin (67.76%), tetracycline (70%), and chloramphenicol (33.63%) antibiotics and had the highest level of resistance to penicillin (100%), cefixime antibiotics (100%) and ampicillin (67.96%). The general results indicated a significant prevalence of B. cereus in the tested milk, which due to the growing trend of using milk powder and more importance to the quality and health evaluation of milk powders for consumption, contamination investigation and preventive approaches should be given more attention.

Key words: infant formula, food, *Bacillus cereus*, antibiotic.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/). Non-commercial uses of the work are permitted, provided the original work is properly cited.

Copyright © 2023 Shahrekord Branch, Islamic Azad University.