Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Effect of Supernatant and Cell Lysate Extracts of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biofilm and Alginate Production by *Pseudomonas Aeruginosa*

Zahra Ghorbani, Parviz Owlia, Mahmoud Amin Marashi, Horieh Saderi

Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2017/10/07
Accepted: 2018/08/01
Available online: 2018/10/11

Article Subject:
Antimicrobial Substances

IJMM 2018; 12(3): 189-198

Corresponding author:

Parviz Oliya
Molecular Microbiology Research Center (MMRC), Faculty of Medicine, Shahed University, Tehran, Iran

Email:
Powlia @ gmail.com

Use your device to scan and read the article online

Abstract

Background and Aims: *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen for humans with multiple virulence factors. The aim of this study was to investigate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* lysates and supernatants on biofilm alginate factors.

Materials and Methods: The supernatant and lysate were extracted from the native strain of *Saccharomyces cerevisiae* and turned into dry powder. *P. aeruginosa* PAO1 and M 8821 strains were treated by supernatant and lysate extracts , and then production of biofilm and alginate by PAO1 and M 8821 strains , respectively, were evaluated. Supernatant with 1/2 MIC concentration in both experiments and all concentrations of lysates in biofilm test and the highest concentration of lysates in alginate test were used.

Results: Supernatant of *S. cerevisiae* at concentration of 1/2 MIC (0.512 mg / ml) significantly (P <0.05) reduced the production of alginate by *P. aeruginosa* 8821 M strain, but did not affect on biofilm production by *P. aeruginosa* PAO1 strain. All concentrations and the highest concentration of lysate extract (8.192 mg / ml), respectively, significantly (P<0.05) reduced the production of biofilms by PAO1 strain and alginate by 8821 M strain.

Conclusions: This study showed that *S. cerevisiae* has a good potential for inhibiting bacterial pathogenicity, but more studies are needed.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, Alginate, Biofilm, Inhibition

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ghorbani Z, Owlia P, Marashi M A, Saderi H. Effect of Supernatant Extract and Cell Lysate of Probiotic Yeast of Saccharomyces Cerevisiae on Biofilm and Alginate Production in Pseudomonas Aeruginosa . Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :189-198

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۳ – مرداد-شهریور ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

اثر عصارهٔ مایع رویی کشت و لیز سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید بیوفیلم و آلژینات توسط باکتری *سودوموناس آئروژینوزا*

زهرا قربانی، پرویز اولیاء، محمود امین مرعشی، حوریه صادری

مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچهٔ مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۱۵

پذیرش:۱۳۹۷/۰۵/۱۰

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹

موضوع:

مواد ضد میکروبی

IJMM1397;12(3): 189-198

نویسندهٔ مسئول:

پرویز اولیاء

مرکز تحقیقات میکروب شناسی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران

پست الکترونیک:

Powlia @ gmail.com

چکیده

زمینه و هدف: *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از عوامل بیماری‌زای متعدد، یک پاتوژن فرصت‌طلب برای انسان است. *سودوموناس آئروژینوزا* ظرفیت‌های چشمگیری به‌منظور مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد. در این مطالعه به بررسی اثر لیزات و مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید بیوفیلم و آلژینات پرداخته شده است.

مواد و روش کار: ابتدا عصارهٔ مایع رویی کشت و نیز محلول لیز سلولی از سویهٔ بومی *ساکارومایسس سرویزیه* تهیه و با دستگاه روتاری به پودر خشک تبدیل شد. سپس عصاره به کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1 و سویهٔ M 8821 اضافه شد و به‌ترتیب میزان تولید بیوفیلم با سویهٔ PAO1 و آلژینات از طریق سویهٔ M8821 با روش رنگ‌سنجی و از طریق خواندن OD اندازه‌گیری شد. برای این منظور از مایع رویی کشت با غلظت MIC ۱/۲ در هر دو آزمایش و از تمامی غلظت‌های تهیه‌شده از لیز سلولی در آزمایش تشکیل بیوفیلم و از بالاترین غلظت آن در آزمایش آلژینات استفاده شد.

یافته‌ها: مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه* در غلظت MIC ۱/۲ (۰/۵۱۲ mg/ml) به‌صورت معناداری ($P < ۰/۰۵$) منجر به کاهش تولید آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ M 8821 شد؛ اما بر بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1 اثری نداشت. همچنین محلول حاصل از لیز سلولی این مخمر در تمامی غلظت‌های تهیه‌شده به‌صورت معناداری ($P < ۰/۰۵$) منجر به کاهش میزان تولید بیوفیلم در *سودوموناس آئروژینوزا* سویه PAO1 شد. از سوی دیگر بالاترین غلظت (۸/۱۹۲۰ mg/ml) آن منجر به کاهش تولید آلژینات از طریق سویهٔ *سودوموناس آئروژینوزا* M8821 شد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که *ساکارومایسس سرویزیه* از پتانسیل مناسبی برای مهار فاکتورهای بیماری‌زای باکتریایی برخوردار است؛ اما به مطالعات بیشتری نیاز دارد.

کلمات کلیدی: *سودوموناس آئروژینوزا*، *ساکارومایسس سرویزیه*، آلژینات، بیوفیلم، مهار

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی و هوازی است؛ اگرچه این باکتری از طریق جایگزین‌کردن پذیرنده‌های الکترونی مثل نیترات نیز می‌تواند تنفس کند (۱). از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در مطالعات به‌عنوان میکروارگانیسم مدل استفاده می‌شود. از این جهت که عوامل بیماری‌زای متعدد و همچنین طیف میزبانی وسیعی دارد و با استفاده از یک زیرمجموعهٔ مشترک از فاکتورهای بیماری‌زا یک پاتوژن فرصت‌طلب برای انسان است (۲). سودوموناس آئروژینوزا ظرفیت‌های جالب‌توجهی به مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نشان می‌دهد که این مقاومت ممکن است به‌صورت ذاتی باشد؛ مثل وجود Efflux pump ها و یا به‌صورت اکتسابی مثل کسب ژن *بتالاکتاماز* یا کسب ژن آنزیم غیرفعال‌کنندهٔ آمینوگلیکوزیدازها (۳).

بیوفیلم یک ماتریکس پلیمری خارج سلولی است که یک مجموعه از سلول‌های میکروبی ترشح‌کننده آن را در خود محصور کرده است. این ماتریکس عمدتا از مولکول‌های زیستی، اگزوپلی ساکاریدها، DNA های خارج سلولی و پلی‌پپتیدها تشکیل شده

است که به‌صورت یک مخلوط قطبی بسیار هیدراته هستند. بیوفیلم ممکن است در طیف گسترده‌ای از سطوح تشکیل شود و یکی از عوامل مهم مقاوم‌سازی باکتری‌ها به ترکیبات ضدمیکروبی و ضدعفونی‌کننده است؛ لذا امروزه بیوفیلم‌ها به‌عنوان یک موضوع مهم در مدیریت بیماری‌های انسانی شناخته شده‌اند (۵، ۴).

سودوموناس آئروژینوزا حداقل تولید سه پلی‌ساکارید می‌کند که این پلی‌ساکاریدها برای ثبات ساختار بیوفیلم است. آلژینات یکی از این پلی‌ساکاریدها و یک پلیمر خطی است که متشکل از دی مانورونیک اسید و ال گلوکورونیک اسید است. این پلیمر در ثبات ساختاری و حفاظت از بیوفیلم و همچنین حفظ آب و موادغذایی نقش دارد (۶).

در حال حاضر روش‌های گوناگونی برای مقابله با باکتری‌های تولیدکنندهٔ بیوفیلم بررسی و مطالعه شده که یکی از آنها استفاده از عوامل پروبیوتیک است. طبق تعریف بین‌المللی، پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده‌ای هستند که اگر در مقادیر کافی و مناسب تجویز شوند به نفع سلامت میزبان خود عمل می‌کنند. برای ارزیابی پروبیوتیک‌ها، یک سری عملکردهای آنها باید بررسی شود که می‌توان به توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی، مقاومت به اسید معده و نمک‌های صفراوی، توانایی تعدیل پاسخ‌های سیستم ایمنی، توانایی اتصال به بافت روده و همچنین خواص ایمنی‌بخش آن از قبیل مقاومت به آنتی‌بیوتیک و تولید آمین‌های زیستی اشاره کرد. همچنین داشتن یک سری فعالیت‌های دیگر و نیز نبودِ فعالیت همولیتیک در مدل‌های حیوانی می‌بایست اثبات شود (۷). مخمر *ساکارومایسس* از جمله عوامل پروبیوتیک است که متعلق به گروه سلول‌های یوکاریوتی است و از پروبیوتیک‌های باکتریایی که منشأ پروکاریوتی دارند متفاوت است (۸). تفاوت‌هایی که این مخمر با پروبیوتیک‌های باکتریایی دارد شامل ساختارهای فیزیولوژیک متفاوت، اندازهٔ متفاوت (بزرگ‌بودن مخمرها)، کسب‌نکردن ژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است. همچنین این مخمر تحت‌تأثیر آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم باکتریایی قرار نمی‌گیرد (۹). مخمرهای پروبیوتیک از طریق مکانیسم‌های مختلفی در برابر عفونت‌های باکتریایی از میزبان حفاظت می‌کنند که از آن جمله می‌توان به تعدیل سیستم ایمنی بدن، حفاظت از مخاط کلون از طریق رسپتورهای حفاظت‌کننده اشاره کرد. تاکنون *ساکارومایسس بولاردی* تنها مخمری است که در سرتاسر جهان به‌عنوان یک پروبیوتیک برای انسان تأیید شده است و در صنایع به‌صورت تجاری استفاده می‌شود؛ اما برخی از محققین استفاده از سایر گونه‌های مخمری از جمله *ساکارومایسس سرویزیه* را نیز پیشنهاد داده‌اند (۱۰).

با توجه به این موضوع در این مطالعه پتانسیل مایع رویی کشت و همچنین لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* در کاهش تولید بیوفیلم و آلژینات از طریق باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

میکروارگانیسم‌ها و شرایط رشد

از سویهٔ استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* M8821 برای تولید آلژینات و از سویهٔ استاندارد *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 برای تولید بیوفیلم استفاده شد. این سویه‌ها در محیط BHA Agar (Brain Heart) (Merck - Germany) و در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس کشت داده شدند.

همچنین در این مطالعه از سویهٔ بومی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* تأییدشدهٔ مرکز ملی ذخایر ژنتیک ایران نیز استفاده شد. *ساکارومایسس سرویزیه* در محیط PDA (Potato Dextrose Agar) (Merck – Germany) و در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس کشت داده شد.

تهیهٔ مایع رویی کشت

به‌منظور تهیهٔ مایع رویی کشت از روش Krasowska و همکاران (۲۰۰۹) استفاده شد (۱۱). ابتدا مخمر *ساکارومیسس سروزیه* در محیط PDA در شرایط ۳۰ درجهٔ سلسیوس به‌مدت یک شبانه‌روز کشت داده شد. سپس تک‌کلنی مخمر در ۵ سی‌سی محیط PDB (Potato Dextrose broth) (ibresco - Iran) تلقیح شد و به‌مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. در ادامه سوسپانسیون مخمری آماده‌شده به ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDB تلقیح و به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس با چرخش ۱۲۰ rpm انکوبه شد.

سپس به‌منظور جداسازی محلول کشت سلولی از سلول‌های مخمر، سوسپانسیون آماده‌شده به‌مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی، مایع رویی کشت با استفاده از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. استخراج عصارهٔ کشت با استفاده از اتیل استات (Merck – Germany) به حجم یک‌پنجم مایع رویی کشت جداشده، به‌مدت سه ساعت انجام گرفت (با تغییر اتیل استات در هر نیم‌ساعت). اتیل استات با دستگاه Rotary evaporator(Hydolph – Germany) جدا شد (۱۱).

به عصارهٔ خشک به‌دست‌آمده حجم مناسبی از متانول اضافه شد تا غلظت نهایی آن ۳۲۷/۶۸mg/ml شود. از این غلظت به‌عنوان غلظت استاندارد اولیه و ذخیره استفاده شد.

تهیهٔ عصارهٔ لیز سلولی

ابتدا تک‌کلنی از مخمر *ساکارومیسس سرویزیه* سویه در ۵ میکرولیتر محیط PDB (Potato Dextrose broth -Ibresco) تلقیح شد و به‌مدت ۱۶ ساعت در انکوباتور شیکردار در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. سپس سوسپانسیون مخمری آماده شده در ۲۵۰ میکرولیتر محیط PDB تلقیح و یک شبانه‌روز در دمای ۳۰ درجهٔ سلسیوس با چرخش ۱۲۰ rpm انکوبه شد. در ادامه سوسپانسیون آماده‌شده برای ۱۰ دقیقه با دور ۳۰۰۰g سانتریفیوژ شد. پس از جداسازی مایع رویی، رسوب به‌دست‌آمده با آب‌مقطر استریل شست‌وشو داده شد و بار دیگر سانتریفوژ شد. به رسوب باقی‌مانده آب‌مقطر استریل اضافه گشت و لیز سلولی با استفاده از دستگاه سونیکاتور (Qsonica Q125-USA) انجام گرفت (۱۰puls off/۳۰puls on). مایع به‌دست‌آمده در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۱۵۰۰۰ g سانتریفوژ شد، سپس مایع رویی به‌وسیلهٔ فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر شد.

عصارهٔ خشک‌شده با اضافه‌کردن حجم مناسب از آب‌مقطر استریل برای رسیدن به حجم ۱۶۳/۸۴ mg/ml در نمونهٔ نهایی استانداردسازی شد. در ادامهٔ کار از این غلظت تهیه‌شده به‌عنوان ذخیره استفاده شد.

تعیین کمترین غلظت ممانعت‌کنندهٔ رشد (Minimum Inhibitory Concentration:MIC) و کمترین غلظت کشنده (Minimal Bactericidal Concentration:MBC) مایع رویی و لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* بر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا

ابتدا به روش میکرودایلوشن، MIC مایع رویی کشت و لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* علیه سویه‌ها M8821 و PAO1 در محیط BHB (Brain Heart Broth)(Merck – Germany) تعیین شد.

برای این منظور محلول اولیهٔ عصارهٔ مایع رویی کشت با غلظت ۳۲۷/۶۸mg/ml به‌میزان ۲۰ برابر با متانول رقیق شد. همچنین محلول اولیهٔ عصارهٔ لیز سلولی با غلظت ۱۶۳/۸۴ mg/ml به میزان ۱۰ برابر با آب رقیق شد و در دو میکروپلیت جداگانه در چاهک اول از نمونهٔ ذخیرهٔ ۲۰ برابر رقیق‌شدهٔ مایع رویی کشت و در میکروپلیت دیگر در چاهک اول نمونهٔ ذخیرهٔ ۱۰ برابر رقیق‌شدهٔ لیز سلولی به حجم ۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد و چاهک‌های دیگر حاوی ۵۰ میکرولیتر محیط BHB بود. سپس برای رقیق‌سازی ۵۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم، به همین ترتیب از چاهک دوم به سوم تا چاهک دهم انجام شد و از چاهک ۱۱ و ۱۲ به‌عنوان شاهد مثبت و منفی استفاده شد.

برای تلقیح باکتری، از کشت ۲۴ساعتهٔ باکتری در محیط BHA، تعدادی کلنی در سرم فیزیولوژی حل شد تا سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه شود. طبق دستورالعمل CLSI سوسپانسیون باکتری به نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد و به هریک از چاهک‌ها به‌جز شاهد منفی از این سوسپانسیون میکروبی ۵۰ میکرولیتر اضافه شد. در نتیجه حجم نهایی چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر شد. سپس برای ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس انکوبه شدند. آزمون تعیین MIC سه بار تکرار شد. در ادامه برای تعیین MBC از هریک از چاهک‌هایی که کدورتی در آن مشاهده نشده، مقداری نمونه از طریق لوپ در محیط BHA تلقیح شد و نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. اولین غلظتی که هیچ کلنی باکتریایی در آن مشاهده نشود معادل MBC است.

بررسی تأثیر مایع رویی *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* سویه PAO1

ابتدا باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 در محیط کشت BHB به‌مدت ۲۴ ساعت کشت داده شد. برای آزمون در پلیت ۹۶خانه، ۶ چاهک به‌عنوان شاهد مثبت، ۶ چاهک به‌عنوان آزمایش و ۶ چاهک به‌عنوان شاهد منفی در نظر گرفته شد. چاهک‌های شاهد مثبت، حاوی۱۰۰ میکرولیتر کشت باکتری PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳، چاهک‌های شاهد منفی، حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت BHB و مایع رویی کشت با غلظت ۱/۲MIC و چاهک‌های آزمایش حاوی کشت باکتری PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳ و مایع رویی کشت با غلظت ۱/۲ MIC هستند. در ادامه پلیت به‌مدت ۲۴ ساعت تحت دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس در داخل انکوبه شد. برای بررسی تولید بیوفیلم، بعد از ۲۴ ساعت محتویات داخل چاهک پلیت خالی شد و چاهک‌ها با آب‌مقطر سه دفعه شست‌وشو داده شدند و به هر چاهک رنگ کریستال ویوله ۰/۲۵٪ (Merck - Germany) اضافه شد. پس از ۱۵ دقیقه چاهک‌ها با آب به‌خوبی شست‌وشو و پس از خشک‌شدن به هریک استیک اسید ۳۳٪ (Merck - Germany) اضافه شد. سپس جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد (۱۲). تمامی آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

بررسی تأثیر لیزات *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1

فرایند انجام این آزمایش نیز مانند مراحل توضیح‌داده‌شده در بالا است؛ اما چاهک‌های شاهد و آزمایش به این صورت در نظر گرفته شد:

چاهک‌های شاهد مثبت، حاوی کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳؛ چاهک‌های شاهد منفی، حاوی محیط کشت BHB و لیز سلولی با بالاترین غلظت؛ چاهک‌های آزمایش شامل کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 با جذب نوری ۰/۰۳؛ اما غلظت عصارهٔ لیز سلولی در آنها تفاوت دارد که شامل غلظت‌های ۸/۱۹۲ mg/ml و ۴/۰۹۶ mg/ml و ۲/۰۴۸ mg/ml و ۱/۰۲۴ mg/ml و ۰/۵۱۲ mg/ml است. هر آزمایش ۳ بار تکرار شد.

بررسی اثر مهاری مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا*

برای بررسی اثر مهاری مایع رویی کشت بر تولید آلژینات از غلظت ۱/۲MIC مایع رویی استفاده شد و برای بررسی اثر مهاری لیز سلولی از بالاترین غلظت آن (۸/۱۹۲mg/ml) استفاده شد. بدین منظور ۳ ارلن که حاوی ۴ میلی‌لیتر از محیط BHB استریل هستند، به‌عنوان شاهد مثبت، شاهد منفی و آزمایش در نظر گرفته شدند. محتویات ارلن‌ها به شرح زیر است:

شاهد مثبت حاوی باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* M 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند، شاهد منفی حاوی محیط کشت BHB و مایع رویی کشت با غلظت ۰/۵۱۲ mg/ml و آزمایش حاوی کشت *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۸۲۱M با غلظت ۰/۵ مک فارلند و مایع رویی کشت با غلظت ۰/۵۱۲ mg/ml. ابتدا باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* ۸۸۲۱M در محیط BHA کشت داده شده و پس از ۲۴ ساعت از این کشت سوسپانسیونی معادل ۰/۵ مک فارلند تهیه و سوسپانسیون به ارلن‌های تست و شاهد مثبت اضافه شد. سپس نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار به‌مدت ۲۰ ساعت (۳۷ درجهٔ سلسیوس) قرار گرفتند. بعد از ۲۰ ساعت میزان آلژینات تولیدشده با بررسی جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۴۹۰ نانومتر و به روش توضیح داده‌شده در ادامه اندازه گرفته شد. برای سنجش میزان آلژینات مقدار ۶۰۰ میکرولیتر از محلول بورات ـ اسید سولفوریک در لوله‌آزمایش ریخته شد و سپس در حالی که در حمام یخ قرار داشت، به‌آرامی مقدار ۷۰ میکرولیتر از نمونهٔ بررسی‌شده به آن افزوده و به‌مدت ۴ ثانیه ورتکس شد و بار دیگر در حمام یخ قرار گرفت. در حالی که لوله در حمام یخ قرار داشت، مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول کاربازول (Merck - Germany) به آن اضافه شد و بعد از ورتکس‌کردن دوباره به‌مدت ۴ ثانیه، لوله آزمایش به‌مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت. سپس میزان جذب نوری اندازه‌گیری شد (۱۳).

بررسی اثر مهاری لیز سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید آلژینات *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ M8821

تمامی مراحل دقیقا مشابه بررسی مربوط به اثرات مایع رویی کشت مایع *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید آلژینات است؛ اما چاهک‌های شاهد و آزمون بدین شکل تعریف می‌شود: شاهد مثبت حاوی کشت باکتری *سودوموناس آئروژینوا* M 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند، شاهد منفی حاوی محیط کشت BHB و آزمون اصلی حاوی کشت باکتریM 8821 با غلظت ۰/۵ مک فارلند و محلول عصارهٔ لیز سلولی با غلظت 8821 mg/ml. تمامی آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شد.

جامعهٔ پژوهش

جامعهٔ آماری بررسی‌شده، سوسپانسیون باکتری‌های مطالعه‌شده بود که طی سه بار بررسی جداگانه، با مایع رویی کشت ساکارومیسس سرویزیه یا عصارهٔ لیز سلولی مجاور شده است؛ بنابراین حجم نمونه برای بررسی هریک از سؤالات تحقیق، نتیجهٔ سه بار آزمایش دوتایی خواهد بود (۱۴).

یافته‌ها

در این پژوهش میزان کمترین غلظت ممانعت‌کنندهٔ رشد (MIC) و کمترین غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. MIC مایع رویی کشت، برای سویهٔ PAO1 برابر است با ۲/۰۴۸ mg/ml و برای سویهٔ M8821 برابر است با ۱/۰۲۴ mg/ml.

MBC مایع رویی کشت برای هر دو سویه برابر با میزان MIC بود. لازم به توضیح است برای هر دو سویه در چاهک‌های شاهد مثبت کدورت مشاهده شد؛ اما در چاهک‌های شاهد منفی، هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد که این موضوع نشان‌دهندهٔ استریل‌بودن و عاری‌بودن عصارهٔ مایع رویی کشت از هرگونه آلودگی است.

در بررسی MIC و در عصارهٔ لیز سلولی برای هر دو سویهٔ *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 و M8821 در تمامی غلظت‌ها کدورت مشاهده شد. با توجه به این نتایج و افزایش احتمال بروز اثر مهارکنندگی شاید باید میزان بیشتری از عصارهٔ لیز سلولی استفاده شود. در چاهک شاهد مثبت، کدورت مشاهده شد و در

چاهک شاهد منفی، هیچ‌گونه کدورتی مشاهده نشد که این مسئله نشان‌دهندهٔ استریل‌بودن محلول لیز سلولی است.

نتایج حاصل از بررسی تأثیر مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم توسط *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1 در جدول شمارهٔ ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تشکیل بیوفیلم از طریق *سودوموناس آئروزینوزا* PAO1 تیمارشده با مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه*

میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر		
شاهد مثبت	آزمایش مایع رویی کشت (غلظت ۱/۲ MIC)	شاهد منفی
۰/۱۶۴ ± ۰/۰۱	۰/۱۶۵ ± ۰/۰۲۱	۰/۰۶۷۵ ± ۰/۰۰۷

همان‌گونه که نتایج نشان می‌دهد، در مقایسهٔ چاهک‌های آزمایش با شاهد مثبت، مایع رویی کشت تأثیری بر میزان تولید بیوفیلم از طریق باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 ندارد و از میزان تولید آن کاسته نشده است و حتی به نظر می‌رسد تا حدودی تشکیل بیوفیلم تحریک شده است. بررسی آماری نیز نشان داد که بین نتایج این دو گروه تفاوت معناداری وجود ندارد ($P = ۰/۴۲۲$).

نتایج حاصل از بررسی تأثیر عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم از طریق *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1 در جدول شمارهٔ ۲ نشان داده شده است.

همان‌گونه که مشاهده شد برخلاف مایع رویی کشت، عصارهٔ لیز سلولی بر میزان تشکیل بیوفیلم از طریق باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 اثر گذاشته است؛ به‌طوری که هرچه میزان غلظت لیز سلولی بیشتر شده، میزان تشکیل بیوفیلم کاهش یافته است. در بیشترین غلظت تهیه‌شده از عصارهٔ لیز سلولی یعنی ۸/۱۹۲ mg/ml میزان جذب نوری از تمامی غلظت‌ها کمتر است که نشان‌دهندهٔ تولید کمتر بیوفیلم است. بررسی آماری نیز نشان داد که اختلاف در میزان تولید بیوفیلم در نمونه‌های شاهد مثبت و آزمایش از نظر آماری معنادار است ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تولید آلژینات از طریق *سودوموناس آئروژینوزا* M8821 تیمارشده با مایع رویی کشت مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در جدول شمارهٔ ۳ نشان داده شده است.

جدول ۲. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تشکیل بیوفیلم از طریق *سودوموناس آئروزینوزا* PAO1 تیمارشده با عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه*

میزان جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر						
شاهد مثبت	۰/۵۱۲ mg/ml	۱/۰۲۴ mg/ml	mg/ml۲/۰۴۸	mg/ml۴/۰۹۶	mg/ml۸/۱۹۲	شاهد منفی
۰/۱۵۳ ± ۰/۰۰۷	۰/۱۲۹ ± ۰/۰۱	۰/۱۲۰ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۱۷ ± ۰/۰۰۳	۰/۱۰۸ ± ۰/۰۰۳	۰/۰۵۷ ± ۰/۰۰۳

جدول ۳. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون میزان تولید آلژینات از طریق *سودوموناس آئروزینوزا* M8821 تیمارشده با مایع رویی کشت *ساکارومایسس سرویزیه*

ردیف	نمونه	میانگین جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر
۱	شاهد مثبت	**۱/۱۱۸ ± ۰/۰۳**
۲	شاهد منفی	**۱/۰۰۴ ± ۰/۰۰۰۷**
۳	آزمایش	**۰/۱۹۲ ± ۰/۱**
۴	آزمایش پس از صفرکردن با شاهد منفی	**۰/۱۸۹ ± ۰/۰۱**

نتایج نشان داد که در مقایسه با نمونهٔ شاهد مثبت، میزان تولید آلژینات از طریق باکتری تحت‌تأثیر مایع رویی کشت مخمر کاهش یافته است. بررسی آماری نیز نشان داد که اختلاف در میزان تولید آلژینات در نمونه‌های شاهد مثبت و آزمایش از نظر آماری معنادار است ($P < ۰/۰۵$).

نتایج حاصل از بررسی جذب نوری نمونه‌ها در آزمون تولید آلژینات از طریق *سودوموناس آئروژینوزا* M8821 تیمارشده با عصارهٔ لیز سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در جدول شماره ۴ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که در مقایسه با نمونهٔ شاهد مثبت، میزان تولید آلژینات از سوی باکتری تحت عصارهٔ لیز سلولی مخمر کاهش یافته است. بررسی آماری نیز نشان داد که اختلاف در میزان تولید آلژینات در نمونه‌های شاهد مثبت و آزمایش از نظر آماری معنادار است ($P < ۰/۰۵$).

جدول ۴. میانگین جذب نوری نمونه‌ها در آزمون میزان تولید آلژینات از طریق *سودوموناس آئروزینوزا* M8821 تیمارشده با عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه*

ردیف	نمونه	میانگین جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر
۱	شاهد مثبت	۱/۱۱۸ ± ۰/۰۳
۲	شاهد منفی	۱/۲۴۴ ± ۰/۰۰۰۷
۳	آزمایش	۱/۷۳۸ ± ۰/۰۰۶
۴	آزمایش پس از صفرکردن با شاهد منفی	۰/۴۹۳۰ ± ۰/۰۰۶

بحث و نتیجه‌گیری

عفونت‌های بیمارستانی از جمله معضلات و مشکلات مهم پزشکی در کشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه محسوب می‌شود. *سودوموناس آئروژینوزا* سومین عامل عفونت‌های بیمارستانی بعد از *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* است. با مصرف گستردهٔ آنتی‌بیوتیک‌ها، سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزای* مقاوم به چند دارو در سراسر جهان به‌طور فزاینده‌ای افزایش یافته است. بالارفتن روزافزون مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی مشکلات زیادی برای بیماران ایجاد کرده که سبب دشواری‌های زیادی در درمان و افزایش مرگ‌ومیر شده است (۱۵).

استفاده از ترکیبات طبیعی تولیدشده از طریق سایر میکروارگانیسم‌ها مثل پروبیوتیک‌ها برای پیشگیری و مهار عفونت‌ها، می‌تواند به‌عنوان راه‌حلی برای این مشکل باشد (۱۱). مخمرهای پروبیوتیک از طریق مکانیسم‌های مختلفی در برابر عفونت‌های باکتریایی از میزبان حفاظت می‌کنند (۱۰). یکی از نقش‌های مهم مخمرهای پروبیوتیک، خواص آنتاگونیستی آنها در برابر سایر میکروارگانیسم‌ها است. *ساکارومایسس سرویزیه* از جمله مخمرهایی است که خواص پروبیوتیکی دارد (۱۶). قابلیت ضدباکتریایی *ساکارومایسس سرویزیه* ممکن است به‌علت تولید پروتئاز خارج سلولی، ترشح پروتئین‌های مهارکننده، تحریک ایمونوگلوبولین A، جذب و حذف سموم ترشحی، سموم قارچی، سولفور دی‌اکسید و غیره باشد. موادغذایی مانند شیر، غذاهای غنی‌شده، میوه‌ها و غیره منبع مهمی از پروبیوتیک ساکارومایسس سرویزیه هستند (۱۷). عملکرد عوامل ضدمیکروبی برای درمان عفونت‌ها، فقط به اثرات باکتریسیدال و باکتریواستاتیک آنها وابسته نیست؛ بلکه به توانایی آنها در مهار تولید فاکتورهای بیماری‌زایی باکتری‌ها نیز بستگی دارد (۱۸). در این مطالعه، اثر عصاره‌های مایع رویی کشت و لیزات مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید بیوفیلم و آلژینات در *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی شد. پژوهش در زمینهٔ تأثیر پروبیوتیک‌ها بر فاکتورهای ویرولانس، به‌تازگی شروع شده و فقط چند مقاله در این زمینه از سوی محققان خارج از کشور منتشر شده که در بیشتر آنها نیز اثر لاکتوباسیل‌های پروبیوتیک بررسی شده است. به‌عنوان مثال Alexandre و همکاران (۲۰۱۴)، در یک مطالعهٔ پژوهشی از ۸۷ سویهٔ لاکتوباسیل، برای کنترل فاکتورهای ویرولانس *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 به روش رنگ‌سنجی استفاده کردند. نتایج نشان داد که از میان سویه‌های بررسی‌شده ۵ سویه به‌طور چشمگیری باعث کاهش تولید بیوفیلم شده‌اند (۱۲). نتایج حاصل از این مطالعه، نشان‌دهندهٔ تأثیر مطلوب پروبیوتیک‌ها بر مهار بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* PAO1 است که این موضوع با نتایج حاصل از تأثیر عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* بر تولید بیوفیلم در مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد. Valdéz و همکاران (۲۰۰۵)، در یک مطالعهٔ پژوهشی تداخل *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* را با *سودوموناس آئروژینوزا* در شرایط *In vitro* و *In vivo* بررسی کردند. آنها در این مطالعه اثر این پروبیوتیک بر میزان تولید بیوفیلم از طریق سودوموناس را به روش رنگ‌سنجی بررسی کردند

که نشان‌دهندهٔ مهار تولید بیوفیلم بود. این نتایج با گزارش ما دربارهٔ تأثیرگذاری عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* مشابه است (۱۹).

Joshi و همکاران (۲۰۱۴) در یک مطالعهٔ پژوهشی اثر لاکتوناز سویهٔ وحشی و سویهٔ نوترکیب *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* NC8 را بر عوامل بیماری‌زای ۴ سویهٔ *سودوموناس آئروژینوزا*، به‌صورت کشت هم‌زمان بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* نوترکیب و تولیدات آن به‌صورت چشمگیری باعث کاهش تولید فاکتورهای بیماری‌زای باکتری می‌شود (۲۰). هرچند روش به‌کاررفته در مطالعهٔ حاضر با روش آنها متفاوت است، ولی در زمینهٔ کاهش فاکتورهای بیماری‌زا از طریق سویه‌های پروبیوتیک در برابر باکتری پاتوژن نتایجی به دست آمده است. نتایج این مطالعه با یافته‌های ما در زمینهٔ تأثیر عصارهٔ لیز سلولی بر کاهش تولید بیوفیلم و تأثیر مایع رویی کشت و لیز سلولی بر تولید آلژینات مشابهت دارد. Rybalchenko و همکاران (۲۰۱۵) در یک مطالعهٔ پژوهشی با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، تأثیر کشت هم‌زمان *لاکتوباسیلوس فرمنتوم* بر تشکیل بیوفیلم تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زا را مطالعه کردند. نتایج حاکی از تخریب و کاهش تراکم سلول‌ها در بیوفیلم بود (۲۱). تنها مطالعهٔ یافت‌شده در زمینهٔ تأثیر *ساکارومایسس سرویزیه* بر تشکیل بیوفیلم، مطالعه‌ای بود که Walencka و همکاران (۲۰۰۸) انجام دادند. در این تحقیق از مانوپروتئین استخراج‌شده از دیوارهٔ سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* برای مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* استفاده شده است. نتایج آنها نشان‌دهندهٔ کاهش تولید بیوفیلم و همچنین تسهیل جداشدن سلول‌ها از بیوفیلم بالغ بود (۲۲). این نتایج با مطالعهٔ ما در بخش اثرگذاری عصارهٔ لیز سلولی مخمر در کاهش تولید بیوفیلم مطابقت دارد. Srinivas و همکاران (۲۰۱۷)، فعالیت آنتاگونیستی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* OBS2 را در برابر چند باکتری بیماری‌زا با آزمون انتشار با چاهک، بررسی کردند. در این مطالعه هالهٔ رشدنیافتگی ناشی از مایع رویی کشت مخمر اندازه‌گیری شد که نتایج، نشان‌دهندهٔ اثر ضدمیکروبی این سویه علیه عوامل باکتریایی بود (۲۳). Christiane و همکاران (۲۰۰۸)، مطالعه‌ای را در یک واحد مراقبت‌های ویژه در فرانسه انجام دادند. در تحقیق آنها دو گروه از بیماران در نظر گرفته شدند که یک گروه از پروبیوتیک‌ها و گروه دوم از دارونما استفاده می‌کردند. سه روز پس از بستری‌شدن، با یک لولهٔ انتقال موادغذایی از طریق بینی، ۱۰۹ واحد کلنی *لاکتوباسیلوس کازئی* به گروه دریافت‌کنندهٔ پروبیوتیک داده شد. نتایج نشان داد که وقوع کلونیزاسیون تنفسی یا عفونت با *سودوموناس آئروژینوزا* به‌طور معناداری در گروه پروبیوتیک در مقایسه با گروه کنترل به تأخیر افتاده است. وقوع پنومونی در بیماران دریافت‌کنندهٔ پروبیوتیک ۹/۲٪ کمتر از گروه کنترل بود. هرچند میزان عفونت به‌طور قابل‌توجهی کاهش نیافته اما نتایج نشان داد که نبودِ پروبیوتیک باعث افزایش خطر کلونیزاسیون *سودوموناس آئروژینوزا* در دستگاه تنفسی می‌شود (۲۴). همچنین Sharma و همکاران (۲۰۱۴) از سوسپانسیون‌های پروبیوتیک محصولات تجاری‌شده استفاده کردند و فعالیت مهاری آنها را علیه باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* با استفاده از روش انتشار دیسک ارزیابی کردند. نتایج آنها نشان داد که در ۷۱/۸۷۵٪ از موارد میزان قطر هالهٔ عدم رشد آنتی‌بیوتیک‌ها با سویه‌های پروبیوتیک افزایش یافته است. این مطالعه نشان می‌دهد که سویه‌های پروبیوتیک می‌توانند علی‌رغم افزایش مقاومت دارویی *سودوموناس آئروژینوزا* بر آن غلبه داشته باشند (۲۵). هرچند روش‌های به‌کاررفته در مطالعهٔ حاضر و این مطالعات متفاوت بودند، ولی در زمینهٔ فعالیت ضدمیکروبی مواد ترشح‌شده از طریق سویه‌های پروبیوتیک علیه باکتری‌های بیماری‌زا، نتایج این مطالعات با بخش مهارکنندگی رشد مایع رویی کشت مطالعهٔ حاضر مطابقت دارند. در مطالعهٔ حاضر، عصارهٔ لیز سلولی مخمر محروم از اثر کشندگی و مهارکنندگی رشد بر *سودوموناس آئروژینوزا* بود که شاید این امر به‌دلیل تخریب احتمالی برخی متابولیت‌های موجود در لیز سلولی طی فرایند خشک‌کردن بوده باشد؛ اما اثر بیشتری در ممانعت از تولید بیوفیلم نسبت به مایع رویی کشت نشان داد.

اگرچه تابه‌حال مطالعه‌ای دربارهٔ اثر مخمرهای پروبیوتیک بر بیان عوامل بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* انجام نشده است اما مطالعات انجام‌شده همگی تأثیر مثبت کشت هم‌زمان و مایع رویی کشت پروبیوتیک‌ها را بر کاهش بیان عوامل بیماری‌زایی *سودوموناس آئروژینوزا* نشان می‌دهند که با نتایج حاصل از تأثیر عصارهٔ لیز سلولی مطالعهٔ حاضر مطابقت دارد.

مطالعهٔ حاضر، نخستین مطالعه‌ای است که تأثیر مایع رویی کشت و عصارهٔ لیز سلولی *ساکارومایسس سرویزیه* را بر تشکیل بیوفیلم و آلژینات سویه‌های PAO1 و M8821 *سودوموناس آئروژینوزا* بررسی کرده است. همچنین لازم به توضیح است که در هیچ مطالعه‌ای روی آلژینات به‌صورت فنوتیپی کار نشده و روش رنگ‌سنجیِ استفاده‌شده در این مطالعه، نخستین بار از سوی دکتر اولیاء ابداع شده است.

با توجه به نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق، عصارهٔ مایع رویی کشت به‌صورت معناداری باعث مهار تولید آلژینات در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* M8821 شده اما تولید بیوفیلم در باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* سویهٔ PAO1 نه‌تنها کاهش نیافته، بلکه تا حدودی افزایش نیز داشته است؛ درحالی‌که عصارهٔ لیز سلولی این مخمر بر هر دو فاکتور، اثر کاهندهٔ مطلوبی داشته است.

با تکیه بر اطلاعاتی که از این تحقیق به دست آمده است، می‌توان نتیجه گرفت که پروبیوتیک‌هایی مثل مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* از پتانسیل لازم برای استفاده علیه عوامل باکتریایی بیماری‌زا برخوردار هستند؛ اما برای تأیید نهایی به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم نیاز به آزمایش‌هایی متعدد در شرایط *In vivo* و *In vitro* است.

سپاسگزاری

نویسندگان از تمامی کسانی که آنها را در انجام این پژوهش یاری کرده‌اند، تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

1. Michalska M, Wolf P. Pseudomonas Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. Front Microbiol. 2015;6:963. https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmicb.2015.00963 PMID:26441897 PMCID:PMC4584936
2. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a Pseudomonas aeruginosa-Caenorhabditis elegans pathogenesis model. Cell. 1999;96(1):47-56. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80958-7 PMID:9989496
3. Mesaros N, Nordmann P, Ple´siat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. Pseudomonas aeruginosa: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clin Microbiol Infect. 2007;13(6):560-78. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x PMID:17266725
4. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):881-90. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063 PMID:12194761 PMCID:PMC2732559
5. Sousa AM, Pereira MO . Pseudomonas aeruginosa Diversification during Infection Development in Cystic Fibrosis Lungs—A Review. Pathogens. 2014;3(3):680-703. https://doi.org/10.3390/pathogens3030680 PMID:25438018 PMCID:PMC4243435
6. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P and El Jaziri M . The Formation of Biofilms by Pseudomonas aeruginosa: A Review of the Natural and Synthetic Compounds Interfering with Control Mechanisms. Biomed Res Int. 2015;2015:759348. https://doi.org/10.1155/2015/759348 PMID:25866808 PMCID:PMC4383298
7. Belicová A, Mikulášová M, Dušinský R. Probiotic Potential and Safety Properties of Lactobacillus plantarum from Slovak Bryndza Cheese. Biomed Res Int. 2013;2013:760298. https://doi.org/10.1155/2013/760298 PMID:24093103 PMCID:PMC3777194
8. Czerucka D, Piche T, Rampal P. Review article: yeast as probiotics – Saccharomyces boulardii. Aliment Pharmacol. 2007;26(6):767-78. https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03442.x PMID:17767461
9. McFarland LV. Systematic review and meta-analysis of Saccharomyces boulardii in adult patients. World J Gastroenterol. 2010;16(18):2202-22. https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i18.2202 PMID:20458757 PMCID:PMC2868213
10. Tiago FD, Martins FD, Souza EL, Pimenta PF, Araújo HR, Castro ID, et al. Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by Saccharomyces probiotics. J Med Microbiol. 2012;61(9):1194-207. https://doi.org/10.1099/jmm.0.042283-0 PMID:22580913
11. Krasowska A, Murzyn A, Dyjankiewicz A, Lukaszewicz M & Dziadkowiec D. The antagonistic effect of saccharomyces boulardii on Candida albicans filamentation, adhesion and biofilm formation. FEMS Yeast Res. 2009;9(8):1312-21. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00559.x PMID:19732158
12. Alexandre Y, Le Berre R, Barbier G, Le Blay G. Screening of Lactobacillus spp. for the prevention of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infections. BMC Microbiol. 2014;14(107):1-10. https://doi.org/10.1186/1471-2180-14-107
13. Owlia P, Rasooli I, Saderi H, Aliahmadi M. Retardation of biofilm formation with reduced productivity of alginate as a result of Pseudomonas aeruginosa exposure to Matricaria chamomilla essential oil. Phcog Mag. 2007;3(10):83-9.
14. Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7. J Microbiol Meth. 2008;73(2):125-32.

https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.01.014 PMID:18328583

15. Rajabpour M, Arabestani M R, Yousefi mashof R, Alikhani M Y. MIC determination of Pseudomonas aeruginosa strains were isolated from clinical specimens of patients admitted to educational hospitals in Hamedan (90-91). Iran J Med Microbiol. 2013;7(3):18-25. http://ijmm.ir/article-1-212-en.html

16. Hatoum R, Labrie S, Fliss I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: from fundamental to novel applications. Front Microbiol. 2012;3:421. https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00421 PMID:23267352 PMCID:PMC3525881

17. Fakruddin Md, Nur Hossain Md, Morshed Ahmed M. Antimicrobial and antioxidant activities of Saccharomyces cerevisiae IFST210260, a potential probiotic. BMC Complement Altern Med. 2017;17:64. https://dx.doi.org/10.1186%2Fs12906-017-1591-9 PMID:28109187 PMCID:PMC5251302

18. Rohinishree YS, Negi PS. Effect of licorice extract on cell viability, biofilm formation and exotoxin production by Staphylococcus aureus. J Food Sci Technol. 2016;53(2):1092-100. https://doi.org/10.1007/s13197-015-2131-6 PMID:27162389 PMCID:PMC4837708

19. Valdéz JC, Peral MC, Rachid M, Santana M, Perdigón G: Interference of Lactobacillus plantarum with Pseudomonas aeruginosa in vitro and in infected burns: the potential use of probiotics in wound treatment. Clin Microbiol Infect. 2005;11(6):472-9. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01142.x PMID:15882197

20. Joshi S, Kaur A, Sharma P, Harjai K, Capalash N. Lactonase-expressing Lactobacillus plantarum NC8 attenuates the virulence factors of multiple drug resistant Pseudomonas aeruginosa in co-culturing environment. World J Microbiol Biotechnol. 2014;30(8):2241-9. https://doi.org/10.1007/s11274-014-1645-9 PMID:24671300

21. Rybalchenko OV, Bondarenko VM, Orlova OG, Markov AG, Amasheh S. Inhibitory effects of Lactobacillus fermentum on microbial growth and biofilm formation. Arch Microbiol. 2015;197(8):1027-32. https://doi.org/10.1007/s00203-015-1140-1 PMID:26267163

22. Walencka E, Rozalska S, Sadowska B, Rozalska B. The influence of Lactobacillus acidophilus-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. Folia Microbiol (Praha). 2008;53(1):61-6. https://doi.org/10.1007/s12223-008-0009-y PMID:18481220

23. Srinivas B, Rani GS, Kumar BK, Chandrasekhar B, Krishna KV, Devi TA, et al. Evaluating the probiotic and therapeutic potentials of Saccharomyces cerevisiae strain (OBS2) isolated from fermented nectar of toddy palm. AMB Express. 2017;7(1):2. https://doi.org/10.1186/s13568-016-0301-1 PMID:28050843 PMCID:PMC5209330

24. Forestier C, Dominique C,Guelon D, Cluytens V, T Gillart, Sirot J, De Champs C. Oral probiotic and prevention of Pseudomonas aeruginosa infections: a randomized, double-blind, placebo-controlled pilot study in intensive care unit patients. Critical Care. 2008;12(3):1-10. https://doi.org/10.1186/cc6907 PMID:18489775 PMCID:PMC2481460

25. Sharma J, Chauhan DS. Inhibition of Pseudomonas aeruginosa by antibiotics and probiotics combinations- In vitro study. Euro J Exp Bio. 2014;4(6):10-4.