مقاله پژوهشی

بررسی اثر بازدارندگی پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر باکتری‌های بیماریزای *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشرشیا کلی*

پریسا نوربخش[1]، تقی زهرایی صالحی [2]، سامان حسینخانی[3]، جلیل مهرزاد*[2]

۱- دانشجوی دکتری ایمنی شناسی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران
۲- گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.22, No.2, Summer 2024

چکیده

مقدمه: مقاومت آنتی بیوتیکی به طور نگران کننده ای در حال افزایش است. اخیراً استفاده از پست بیوتیک ها علیه عوامل میکروبی پاتوژن برای فرموله کردن داروهای جدید همراه یا جایگزین آنتی بیوتیک ها مد نظر قرار گرفته است. به این ترتیب، پژوهش حاضر با هدف بررسی اثرات بازدارندگی پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر رایج ترین پاتوژن های استافیلوکوکی و کلی فرمی انجام گرفت.

روش کار: سویه استاندارد باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در محیط MRS کشت داده شد. سپس اثر مهاری پست بیوتیک های بدست آمده و کنترل‌های منفی (بدون تیمار) و مثبت (تیمار با آنتی بیوتیک بر دو باکتری پاتوژن *استافیلوکوک اورئوس* و *اشرشیا کلی* توسط تست MIC به روش رقیق سازی در پلیت های ۹۶ چاهکی ارزیابی شد. نتایج در طول موج ۶۳۰ نانومتر خوانش شد.

یافته‌ها: اثر همه پست بیوتیک ها به جز گروه C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون- شوک حرارتی) نسبت به کنترل منفی (بدون تیمار) معنادار بود (p<۰/۰۵). پست بیوتیک گروهD (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون - شوک حرارتی- فریز و دفریز) بطور چشمگیری مثل کنترل مثبت (تیمار با آنتی‌بیوتیک مروپنم) رشد *استافیلوکوکوس اورئوس* (P=۰/۰۰۰۶) و *اشریشیا کلی* (P=۰/۰۰۰۳) را مهار کرد. همچنین گروه‌های مختلف پست بیوتیک تأثیر تقریبا مشابه غیر معنا داری بر پاتوژنهای استافیلوکوکی در مقایسه با کلی فرمی داشتند.

نتیجه‌گیری: یافته‌های این پژوهش بر پتانسیل ضد باکتریای پست‌بیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* علیه پاتوژن‌های رایج تأکید می‌کند، و آنها را برای توسعه و کاربردهای بیشتر زیست پزشکی و دارویی نامزدهای امیدوارکننده ای مینماید.

واژگان کلیدی: *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی*، پست بیوتیک، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی*، مقاومت آنتی بیوتیکی

Pars J Med Sci 2024;22(2):58-67

مقدمه

دستگاه گوارش یک اکوسیستم پیچیده است که در آن تریلیون‌ها باکتری ضروری برای حفظ سلامت و ایمنی انسان و حیوانات فعالیت می‌کنند [۱]. بررسی قابلیت‌های درمانی این میکروارگانیسم‌ها به دلیل توانایی آنها در تأثیرگذاری بر فرآیندهای فیزیولوژیکی متنوع، توجه فراوانی را به خود جلب کرده است. در این میان پروبیوتیک ها از اهمیت بسیار بالایی برخوردار هستند [۲].

پروبیوتیک‌ها در حقیقت باکتری‌های مفید زنده در دستگاه گوارش هستند که دارای قابلیت‌های مختلف جهت ارتقاء سلامتی، درمان و پیشگیری از بیماری‌ها می‌باشند. برخی از سویه‌های پروبیوتیک باکتریوسین‌هایی تولید می‌کنند که می‌توانند باکتری‌های بیماری‌زای را از بین ببرند. امروزه لاکتوباسیلوس ها و بیفیدوباکتریوم ها بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک شناخته می‌شوند [۳]. با این حال، شواهد جدید نشان می‌دهد که اثرات مفیدی که به پروبیوتیک‌ها نسبت داده می‌شود ممکن است صرفاً از حضور خود این میکروب‌های زنده ناشی نشود بلکه بخش قابل‌توجهی از تأثیر درمانی آنها توسط متابولیت‌هایی که تولید

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
تلفن تماس: ۶۱۱۱۷۰۵۳ -۰۲۱ پست الکترونیک:mehrzad@ut.ac.ir
دریافت:۱۴۰۳/۰۴/۳۰ اصلاح: ۱۴۰۳/۰۵/۲۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۳۰

می‌کنند انجام می‌شود. به این متابولیت‌ها پست بیوتیک گفته می‌شود [۴].

اخیرا ترکیبات پست بیوتیک مورد توجه محققین قرار گرفته است. پست بیوتیک‌ها مجموعه ای از ریز مولکول ها و ماکرومولکول‌ها مانند سلول‌های میکروبی غیرفعال (سلول‌های غیرزنده)، بخش‌های سلولی (موروپپتیدها، اسیدهای تئی‌کوئیک، اندو و اگزوپلی ساکاریدها و پروتئین‌های سطحی) و یا متابولیت های سلولی (اسیدهای چرب زنجیره کوتاه یا SCFAs)، اسیدهای آلی، باکتریوسین ها و آنزیم‌ها) هستند که به طور طبیعی توسط سلول‌های پروبیوتیک زنده در فرآیند تخمیر تولید می‌شوند [۶،۵]. همچنین در شرایط آزمایشگاهی میتوان پست بیوتیک‌ها را توسط غیرفعال‌سازی سلول‌های باکتریایی با روش‌های فیزیکی (تخریب مکانیکی، سونیکاسیون، فشار هیدرواستاتیک بالا، تابش γ یا UV، عملیات حرارتی، خشک کردن انجمادی، فراصوت) یا روش‌های شیمیایی (غیرفعال‌سازی اسید) به دست آورد [۷]. پست‌بیوتیک‌ها دارای عملکردهای ضد باکتری، ضد التهاب، ضد سرطان، تنظیم کننده سیستم ایمنی، ضد فشار خون، آنتی اکسیدان، ضد دیابت و ضد چاقی هستند [۸].

طبق اعلام سازمان بهداشت جهانی (WHO) مقاومت آنتی‌بیوتیکی به طور فزاینده‌ای در حال افزایش است. ظهور مقاومت ضد میکروبی (AMR) به علت مصرف بیش از حد و یا بدون نسخه آنتی بیوتیک ها به یک نگرانی بزرگ برای سیستم های بهداشت عمومی در سراسر جهان تبدیل شده است، و منجر به افزایش خطر شکست درمان، بستری طولانی‌تر در بیمارستان، عود بیماری و هزینه‌های بیشتر برای سیستم مراقبت های بهداشتی می‌شود [۹]. همچنین، اگرچه آنتی‌بیوتیک‌ها نقش مهمی در درمان بیماری‌های مختلف دارند، اما عوارض جانبی نامطلوبی مانند واکنش‌های آلرژیک، عوارض گوارشی (حالت تهوع، کاهش اشتها، نفخ، استفراغ، درد شکم، اسهال) دارند [۱۰]. عوارض جانبی دارویی مرتبط با آنتی‌بیوتیک‌ها (ADEs) که معمولاً توسط بیماران بستری تحت آنتی‌بیوتیک تجربه می‌شود، شامل ناهنجاری‌های گوارشی، هماتولوژیک کلیه و غیره است [۱۲،۱۱].

استافیلوکوکوس اورئوس یک پاتوژن گسترده و خطرناک انسانی است که می‌تواند باعث بیماری‌های مختلفی از جمله عفونت‌های پوستی نسبتاً شدید گرفته تا ذات‌الریه کشنده و سپسیس شود. درمان عفونت های این باکتری به دلیل مقاومت آنتی بیوتیکی مانند مقاومت به متی سیلین (MRSA) به شدت پیچیده است و هیچ واکسن موثری برای آن وجود ندارد. بنابراین، راهبردهای جایگزین شونده با آنتی بیوتیک، برای مبارزه با عفونت این باکتری ضروری است و مشتاقانه دنبال می‌شود [۱۳].

پژوهش‌ها نشانگر آنست که استفاده از برخی اجزای طبیعی زیستی مانند پست بیوتیک ها علیه عوامل میکروبی مختلف برای فرموله کردن داروهای جدید در کنار آنتی بیوتیک های موجود یا حتی برای جایگزین کردن آنها، می‌تواند به عنوان راهکار درمانی جدید و موثر مدنظر قرار گیرد [۱۲،۱۰]. همچنین مطالعات نشان داده است که تعامل پروبیوتیک‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالاً می‌تواند بیماری‌های باکتریایی گسترده را با افزایش فاکتورهای مفید برای میزبان به طور موثر کاهش دهد [۱۵،۱۴].

طی پژوهش‌های قبلی بر فعالیت ضدمیکروبی پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های آنها (پست بیوتیک‌ها) در برابر بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیا کولی، سودوموناس آئروژینوزا و سالمونلا تیفی* تاکید شده است [۱۶]. به عنوان مثال مشخص شده است که مایع رویی بدون سلول کشت‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* باعث مهار رشد *اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود [۱۷].

علیرغم اثربخشی محصولات پروبیوتیک این محصولات می‌توانند در برخی از افراد با سیستم ایمنی نامتعادل یا ضعیف به خاطر مصرف باکتری زنده باعث خطر ابتلا به باکتریمی، عفونت و یا افزایش پاسخ های التهابی شوند. همچنین محدودیت‌های حمل و نقل به جهت استفاده از دستگاههای پیشرفته برای زنده مانی این باکتری‌ها و هزینه بالای تولید تجاری از نقاط ضعف آنها می‌باشد. به همین خاطر محققان پست بیوتیک‌ها را برای رفع مشکلات یاد شده به عنوان یک جایگزین ایمن نسبت به پروبیوتیک‌ها معرفی کرده‌اند که می‌توانند در قالب سیستم دارویی یا غذاهای فراسودمند در آینده به عنوان ابزارهای امیدوار کننده‌ای برای مقاصد درمانی و پیشگیری مورد استفاده قرار گیرند [۸،۳].

مطالعات انجام شده قبلی همچون مطالعه‌ای که توسط Shunan Ren در زمینه اثر مهاری پست بیوتیک باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (بدست آمده از محصول تخمیر شده شیر اسب) بر روی *E. coli* و بهبود اسهال انجام شد، بیانگر نقش مهاری پست بیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر روی این باکتری مهاجم روده است [۱۸]. هدف پژوهش حاضر، بررسی اثر بازدارندگی پست‌بیوتیک‌های گرفته شده از *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* با روش‌های مختلف استخراج بر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی* توسط تست MIC به روش میکرودایلوشن روی پلیت است.

روش کار

در این مطالعه‌ی تجربی- مداخله‌ای که از آذرماه ۱۴۰۲ به مدت ۶ ماه در آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران انجام شد از سویه استاندارد باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی ATCC55544* تأیید شده در مرکز ملی ذخایر ژنتیک

ایران برای تهیه پست بیوتیک و همچنین جهت بررسی اثر ضد میکروبی آن از سویه‌های استاندارد *استافیلوکوک اورئوس ATCC25923* و *اشرشیا کلی ATCC25922* تهیه شده از انیستیتو پاستور ایران استفاده شد. پست بیوتیکهای به دست آمده از *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* تحت عنوان ۴ گروه همراه با گروه‌های کنترل مثبت (Pos ctrl) و کنترل منفی (Neg ctrl) تیمار شدند که شامل: A (سوسپانسیون بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز)، B (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون)، C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی) و D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز)، کنترل مثبت (محیط کشت، باکتری و آنتی بیوتیک مروپنم) و کنترل منفی (محیط کشت و باکتری) بودند.

کشت باکتری لاکتو باسیلوس پاراکازئی

ابتدا باکتری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی ATCC55544* پس از دو بار تعویض محیط کشت (MRS, Man-Rogosa-Sharpe) مایع در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و میزان کدورت، که ناشی از رشد باکتری بود، مورد بررسی قرار گرفت. سپس توسط لوپ استریل از محیط کشت حاوی باکتری برداشت و روی پلیت MRS آگار پخش شد و مجددا به مدت ۷۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد و کلونی کانت باکتری (CFU) محاسبه گردید که ۱۰ × ۳/۲ به دست آمد. سپس از تک کلنی‌های رشد کرده، یک کلنی با آنس استریل به درون محیط کشت تازه MRS مایع داخل ارلن منتقل شد و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه انکوبه شد.

تهیه پست بیوتیک

محیط کشت مایع MRS حاوی باکتری پس از انکوباسیون به مدت یک شبانه روز در ۳۷ درجه در دور rpm ۱۴۰۰ به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مایع رویی آن جمع‌آوری و پس از عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرون در لوله جداگانه‌ای انتقال یافت. در ادامه، رسوب ته لوله به کمک ۳ میلی‌لیتر PBS استریل به سوسپانسیون هموژن تبدیل شد و از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. بر روی مایع رویی و سوسپانسیون, تیمارهای لازم شامل سونیکاسیون توسط دستگاه سونیکاتور(Qsonica Q125-USA) به صورت puls on 30 / puls off 10 انجام گرفت. همچنین سایر تیمارها شامل شوک گرمایی (در دمای ۱۰۰ درجه به مدت نیم ساعت)، فریز–دفریز (در دمای ۴- درجه به مدت دو ساعت) نیز انجام شد [۱۹].

تست MIC

از کشت تازه *استافیلوکوک اورئوس* و *اشرشیا کلی* 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 در پلیت ۹۶ خانه پلی استایرن به هریک از چاهک‌ها به جز چاهک کنترل منفی از این سوسپانسیون میکروبی۱۰۰ میکرولیتر اضافه شد. سپس داخل هر چاهک A تا H از پست بیوتیک مشخص آماده شده ۱۰۰ میکرولیتر اضافه گردید و جداگانه روی هر چاهک (A تا H) حاوی پست بیوتیک با روش میکرودایلوشن به صورت افقی از چاهک ۱تا ۱۲ رقت سازی انجام شد به این صورت که ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک اول به چاهک دوم و ۱۰۰ میکرولیتر از چاهک دوم به سوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۲ ادامه یافت. سپس به همه چاهک ها ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB Broth اضافه شد. در پایان حجم نهایی هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر بود. چاهک‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB و باکتری به عنوان کنترل منفی و چاهک‌های حاوی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت LB و باکتری و آنتی بیوتیک استاندارد مروپنم (۱۰ میکروگرم) به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس سطح پلیت ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از ۲۴ ساعت کدورت در طول موج ۶۳۰ نانومتر توسط دستگاه الایزا ریدر (STAT FAX 2100) خوانش گردید. برای هر باکتری سه بار تکرار در نظر گرفته شد. MIC به عنوان کمترین غلظتی از پست بیوتیک که باعث کاهش ۹۰ درصدی کدورت در مقایسه با گروه کنترل مثبت شده بود در نظر گرفته شد [۲۰].

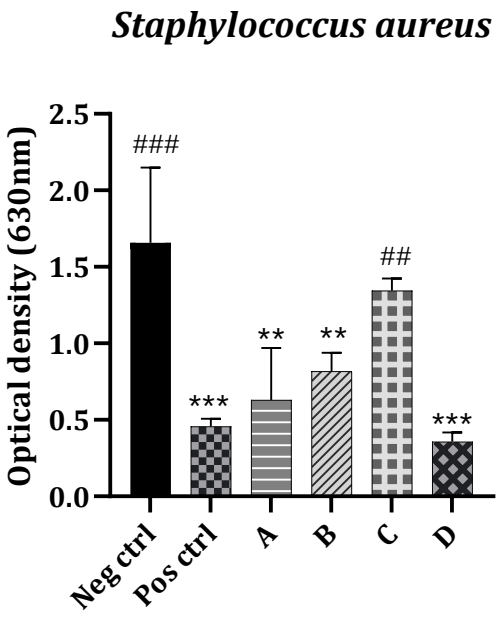
تحلیل داده‌ها

در این مطالعه از نرم‌افزار Graph pad prism ورژن ۹ استفاده شد. تست‌ها به صورت سه بار تکرار انجام شد. جهت بررسی آماری داده ها از آزمون One way ANOVA استفاده شد. سطح معناداری زیر ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج تأثیر پست بیوتیک (مایع رویی و سوسپانسیون های تیمار شده) بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس* در نمودار ۱ آورده شده است. طبق نمودار تأثیر همه ی پست بیوتیک ها در غلظت MIC به جز گروه C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی) نسبت به نمونه‌ی کنترل منفی (باکتری *استافیلوکوک اورئوس* بدون تیمار) از نظر آماری معنادار بود و اثر پست بیوتیک گروه D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز) بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس* در مقایسه با اثر بقیه گروه‌ها نسبت به

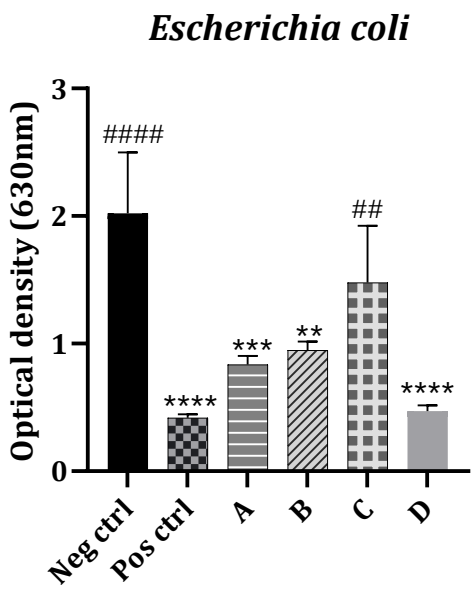
نمونه‌ی کنترل منفی دارای تأثیر چشمگیرتری بود (P= ۰/۰۰۰۲). همچنین تأثیر همه‌ی پست‌بیوتیک‌ها در غلظت MIC به جز گروه C نسبت به نمونه ی کنترل مثبت (باکتری *استافیلوکوک اورئوس* تیمار شده با آنتی بیوتیک مروپنم) از نظر آماری معنادار نبود.



نمودار ۱: تأثیر پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (مایع رویی و سوسپانسیون تیمار شده) بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس*.

نمودار بر اساس داده ها Mean±SD رسم شده است. گروه ها شامل ۶ گروه (n=6) : A (سوسپانسیون بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز)، B (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون)، C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی)، D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز). Neg ctrl: گروه کنترل منفی شامل محیط کشت و باکتری، Pos ctrl :گروه کنترل مثبت شامل محیط کشت و باکتری و آنتی بیوتیک مروپنم. * نشان دهنده اختلاف آماری معنادار بین گروه های مختلف با گروه کنترل منفی است.
(* p<0.05, ** p<0.01 *** p<0.001) و # نشان دهنده ی اختلاف آماری بین گروه های مختلف با گروه کنترل مثبت است. (## p<0.01, ###p<0.001).

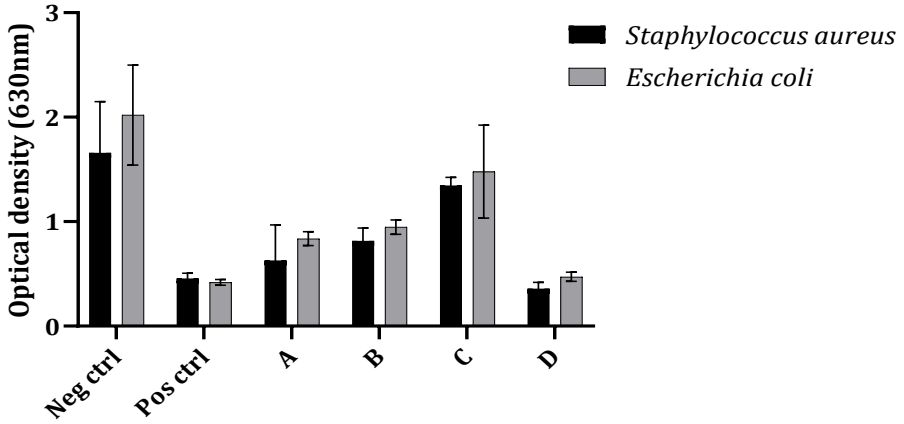
نتایج تأثیر پست بیوتیک (مایع رویی و سوسپانسیون تیمار شده) بر باکتری *اشرشیا کلی* در نمودار ۲ آورده شده است. طبق نمودار تأثیر همه ی پست بیوتیک ها در غلظت MIC به جز گروه C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی) نسبت به نمونه‌ی کنترل منفی (محیط کشت و باکتری اشرشیا کلی) از نظر آماری معنادار بود. پست بیوتیک گروه D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز) بر باکتری *اشرشیا کلی* در مقایسه با بقیه گروه ها نسبت به نمونه‌ی کنترل منفی تأثیر چشمگیرتری داشت(P<۰/۰۰۰۱). همچنین تأثیر همه‌ی پست بیوتیک‌ها در غلظت MIC به جز گروه C نسبت به نمونه‌ی کنترل مثبت از نظر آماری معنادار نبود.



نمودار ۲. تأثیر پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (مایع رویی و سوسپانسیون تیمار شده) بر باکتری *اشریشیا کلی*.

نمودار بر اساس داده ها Mean±SD رسم شده است. گروه ها شامل ۶ گروه(n=6) : A (سوسپانسیون بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز)، B (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون)، C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی)، D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز). Neg ctrl: گروه کنترل منفی شامل محیط کشت و باکتری، Pos ctrl :گروه کنترل مثبت شامل محیط کشت و باکتری و انتی بیوتیک مروپنم. * نشان دهنده ی اختلاف آماری معنادار بین گروه های مختلف با گروه کنترل منفی است.
(** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001) و # نشان دهنده اختلاف آماری بین گروه های مختلف با گروه کنترل مثبت است. (## p<0.01 ####p<0.0001)

در نمودار ۳ تأثیر مایع رویی و سوسپانسیون تیمار شده بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس* و *اشرشیا کلی* مقایسه شده است. از نظر آماری هیچ تفاوت آماری از تأثیر پست بیوتیک‌ها بر روی باکتری‌ها مشاهده نشد (p>۰/۰۵). در واقع گروه‌های مختلف پست بیوتیک تأثیر تقریباً مشابهی بر هر دو باکتری داشته است.



نمودار ۳. تأثیر پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* (مایع رویی و سوسپانسیون تیمار شده) بر باکتری *استافیلوکوک اورئوس* و *اشرشیا کلی*

نمودار بر اساس داده ها Mean±SD رسم شده است. گروه ها شامل ۶ گروه(n=6) : A (سوسپانسیون بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز)، B (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون)، C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون– شوک حرارتی)، D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون – شوک حرارتی– فریز و دفریز). Neg ctrl: گروه کنترل منفی شامل محیط کشت و باکتری، Pos ctrl :گروه کنترل مثبت شامل محیط کشت و باکتری و آنتی بیوتیک مروپنم. هیچ اختلاف آماری بین گروه ها مشاهده نشد.

بحث

مقاومت آنتی‌بیوتیکی یک مسئله جهانی حیاتی است که در آن باکتری‌ها برای مقاومت در برابر اثرات آنتی‌بیوتیک‌ها تکامل می‌یابند که منجر به شکست درمان و افزایش هزینه‌های مراقبت‌های بهداشتی می‌شود [۲۲،۲۱]. این مقاومت می‌تواند هم از جهش‌های ژنتیکی در باکتری‌ها و هم از کسب ژن‌های مقاومت از محیط یا سایر گونه‌ها ناشی شود [۲۳]. استفاده بیش از حد و سوء استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در بخش های مختلف، از جمله پزشکی انسانی و تولید غذای حیوان، به طور قابل توجهی به توسعه و گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک کمک می‌کند [۲۴]. مقاومت آنتی بیوتیکی نه تنها سیستم‌های مراقبت‌های بهداشتی را با طولانی کردن بیماری‌ها و افزایش میزان مرگ و میر تحت تأثیر قرار می‌دهد، بلکه چالش‌هایی را در درمان عفونت‌های بیمارستانی ایجاد می‌کند و بر نیاز فوری به مداخله و کمپین‌های آگاهی برای مبارزه با این تهدید رو به رشد تاکید می‌کند.

پست‌بیوتیک‌ها محصولات باکتری‌های پروبیوتیکی هستند که فعالیت بیولوژیکی در میزبان دارند و شامل متابولیت‌ها، بخش‌هایی از سلول‌های میکروبی، اسیدهای چرب، پروتئین‌ها، پلی‌ساکاریدها، لیزات‌های سلولی، پپتیدهای مشتق شده از پپتیدوگلیکان و ساختارهای مسئول چسبندگی مانند پیلی هستند [۲۶،۲۵]. Romero-Luna و همکاران نشان دادند که مایع رویی بدون سلول *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* دارای ظرفیت ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی اکسیدانی در دانه‌های کفیر است [۲۷]. در یک مطالعه، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه *استافیلوکوکوس اورئوس* بالای ۱۹ میلی‌متر بود [۲۸]. پست بیوتیک ها میتوانند از طرق مختلف علیه باکتریهای بیماریزا در روده عمل کنند. در پژوهش ما عملکرد پست بیوتیک جدا شده اگرچه باعث کشته شدن یا حذف باکتری بیماری‌زا نمی‌شود اما از رشد آن ممانعت به عمل می‌آورد و به نوعی بازدارنده بیماری‌زایی باکتری خواهد بود.

این مطالعه با استفاده از آزمون حداقل غلظت مهاری (MIC) به بررسی اثرات بازدارندگی پست‌بیوتیکی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر روی دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* پرداخت. تمامی تیمارهای پست بیوتیک به جز گروه C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون- شوک حرارتی) اثر مهاری معنی داری بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به شاهد نشان دادند. پست بیوتیک گروه D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون - شوک حرارتی- فریز و دفریز) با P-value= ۰/۰۰۰۶ بارزترین اثر بازدارندگی را داشت. مشابه نتایج برای *استافیلوکوکوس اورئوس*، تمامی تیمارهای پست بیوتیک به جز گروه C (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون- شوک حرارتی) به طور قابل توجهی رشد *اشریشیا کلی* را نسبت به شاهد مهار کردند. گروه پست بیوتیک گروه D (مایع رویی بدست آمده دارای تیمار سونیکاسیون - شوک حرارتی- فریز و دفریز) بالاترین اثر بازدارندگی را روی *اشریشیا کلی* با ۰/۰۰۰۳ P-value نشان داد. در مقایسه اثر پست بیوتیک مورد مطالعه ما بر روی هر دو باکتری، تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد ($p< ۰/۰۵$). این نشان می دهد که تیمارهای مختلف پست بیوتیک اثر بازدارندگی مشابهی بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* داشتند. به طور کلی، یافته‌ها نشان می‌دهند که پست‌بیوتیک های تولید شده توسط *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در مهار رشد هر دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس و اشریشیا کلی* موثر هستند و البته درمان با پست بیوتیک گروه D بیشترین تأثیر را نشان می‌دهد. عدم وجود تفاوت معنی‌دار در اثرات پست بیوتیکی بین دو باکتری نشان‌دهنده پتانسیل ضد میکروبی وسیع الطیف این تیمارها است.

در مطالعه خانی و همکاران، خواص ضد باکتریایی پست بیوتیک های جدا شده از *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*، *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت. پست بیوتیک‌ها فعالیت آنتی اکسیدانی قوی نشان دادند. حداقل غلظت موثر کمتر پست بیوتیک در مدل غذایی تغییر یافت و به طور قابل ملاحظه‌ای، شاخص غلظت حداقل مؤثر (MEC) پایین (۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) برای پست بیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* شناسایی شد. مطابق با نتایج این مطالعه پست بیوتیک لاکتوباسیل‌ها، به ویژه *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، ممکن است ویژگی‌های عملکردی مفیدی (آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانی احتمالی) در مدل آزمایشگاهی و غذایی داشته باشد [۲۹]. با وجود تفاوت در گونه‌های باکتریایی تولید کننده پست بیوتیک بررسی شده در این مطالعه و مطالعه حاضر، اما نتایج دو مطالعه با هم همسو بوده است.

هدف مطالعه Rossoni و همکاران، بررسی اثرات ضد قارچی پروبیوتیک 28.4 *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* و فعالیت پست بیوتیکی عصاره خام (LPCE) و فرکشن ۱ (LPF1) به دست آمده از مایع رویی 28.4 *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بود. هر دو سلول زنده و مایع رویی بدون سلول *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* توانستند قارچ C. auris را مهار کنند که نشان‌دهنده اثرات پروبیوتیکی و پست بیوتیکی است. حداقل غلظت بازدارنده برای LPCE 15 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود و برای LPF1 بین ۳/۷۵ تا ۷/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر متغیر بود. در این مطالعه کینتیک نشان داده شد که پس از ۲۴ ساعت درمان با LPCE یا LPF1، تعداد سلول‌های زنده C. auris به طور کامل کاهش یافت، در حالی که فلوکونازول تنها

توانست تعداد سلول‌ها را در همان دوره زمانی به اندازه ۱- logCFU کاهش دهد. LPCE و LPF1 به طور قابل توجهی زیست‌توده (P=۰/۰۰۰۱) و فعالیت متابولیک (P=۰/۰۰۰۱) بیوفیلم C. auris را کاهش دادند. همچنین کاهش قابل توجهی در زنده مانی قارچ C. auris پس از درمان با عناصر پست‌بیوتیکی مشاهده شد (P<۰/۰۰۰۱) [۳۰]. نتایج این مطالعه و مطالعه حاضر، با هم همسو بوده است.

همچنین مطابق نتایج مشاهده شده در مطالعه Bendali و همکاران این سویه قادر به تولید ماده ای شبیه باکتریوسین فعال در برابر سویه های استافیلوکوک بود. کاهش لگاریتمی در تعداد سلول‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* در کشت همزمان با *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* در شیر تخمیر شده ثبت شد. تجویز شیر بدون چربی حاوی *استافیلوکوکوس اورئوس* (10^7 سلول در میلی لیتر) به خرگوش های سالم باعث ایجاد حالت اسهال پایدار ۵ روز پس از چالش شد. تشریح خرگوش‌ها و مشاهدات بافت‌شناسی متعاقب آن آسیب و آتروفی مخاط روده و کولون خرگوش‌های اسهالی را نشان داد. در مقابل، توقف اسهال همراه با بهبود پرزهای روده و کریپت های کولون در خرگوش‌های تحت درمان با شیر تخمیر شده *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* مشاهده شد [۳۱].

علاوه بر این، طی ارزیابی خواص آنتاگونیستی در مطالعه شاه‌وردی و همکاران، نشان داده شد که *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* دارای استعداد ضد باکتریایی علیه *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* است [۳۲]. در مطالعه دیگری توسط Nie و همکاران، اثر مهاری *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر عفونت *هلیکوباکتر پیلوری* مورد بررسی قرارگرفت. نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس* پاراکازئی اثرات مهاری قوی بر روی *هلیکوباکتر پیلوری* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارد [۳۳]. در یک مطالعه متفاوت تر سویه *لاکتوباسیلوس کازئی* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که *لاکتوباسیلوس کازئی* یک اثر بازدارندگی بر باکتری‌های بیماری‌زا مانند *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* داشت [۳۴] که نشان‌دهنده اثر کلی خانواده *لاکتوباسیلوس‌ها* است.

علیرغم این نتایج مثبت، محدودیت‌هایی در این مطالعه وجود دارد که باید مورد توجه قرار گیرد. اولاً، مطالعه حاضر به‌صورت آزمایشگاهی (in vitro) انجام شده است و لازم است که تحقیقات بیشتری در مدل‌های حیوانی و انسانی انجام شود تا کارایی این پست‌بیوتیک‌ها در شرایط واقعی بررسی شود. همچنین، مکانیسم‌های مولکولی دقیق که منجر به فعالیت ضدباکتریایی پست‌بیوتیک‌ها می‌شوند، هنوز به‌خوبی شناخته نشده است و پژوهش‌های بیشتری برای روشن کردن این مکانیسم‌ها نیاز است.

در نهایت، مطالعه حاضر به‌طور موفقیت‌آمیز اثربخشی پست‌بیوتیک‌های *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* را در مهار باکتری‌های بیماری‌زا نشان می‌دهد. این یافته‌ها نه تنها تأیید می‌کنند که پست‌بیوتیک‌ها می‌توانند جایگزینی ایمن‌تر و موثرتر برای آنتی‌بیوتیک‌ها باشند، بلکه پتانسیل گسترده آن‌ها برای توسعه داروهای ضدباکتریایی نوین و غذاهای فراسودمند را برجسته می‌سازد. تحقیقات آینده باید بر بررسی کارایی پست‌بیوتیک‌ها در محیط‌های بالینی و بررسی مکانیسم‌های زیربنایی این اثرات متمرکز شود.

نتیجه گیری

یافته‌های مطالعه حاضر اثر ضد میکروبی پست‌بیوتیک های استخراج شده از *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* را بر روی *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کلی* نشان می دهد. اثرات مهاری پست بیوتیک حاصل از مایع رویی *لاکتوباسیلوس پاراکازئی* بر پاتوژنهای رایج استافیلوکوکی و کلی فرمی چشمگیرتر از پست بیوتیک حاصل از سوسپاسیون آن می باشد. اثرات ضد باکتریایی این پست بیوتیک‌ها می‌تواند آنها را به عنوان نامزدهای امیدوار کننده‌ای برای توسعه بیشتر در کاربردهای زیست پزشکی و دارویی مطرح کند. در این زمینه به تحقیقات گسترده تر و ارزیابی مکانیسم های اساسی اثرات پست بیوتیک‌ها و کارایی آنها در محیط های بالینی نیاز می‌باشد.

ملاحظات اخلاقی

مقاله حاضر قسمتی از پژوهش دانشجوی مقطع دکتری ایمنی شناسی با شناسه اخلاق IR.UT.VETMED.REC.1403.020 می‌باشد.

تضاد منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه تهران و دانشکده دامپزشکی جهت تأمین اعتبار و امکانات مطالعه حاضر سپاسگزارند.

References

1. Kho ZY, Lal SK. The human gut microbiome–a potential controller of wellness and disease. Front. Microbiol. 2018;9:356589.
2. Thursby E, Juge N. Introduction to the human gut microbiota. Biochem. J. 2017;474(11):1823-36.
3. Vaghef-Mehrabani E, Homayouni-Rad A, Alipour B, Vaghef-Mehrabany L, Saghafi-Asl M. Formulation and design of probiotic supplements for rheumatoid arthritis patients. Pharm Sci. 2018;24(1):44-51.
4. Prajapati N, Patel J, Singh S, Yadav VK, Joshi C, Patani A, et al. Postbiotic production: harnessing the power of microbial metabolites for health applications. Front. Microbiol.2023;14:1306192.
5. Tan CK, Said S, Rajandram R, Wang Z, Roslani AC, Chin KF. Pre-surgical administration of microbial cell preparation in colorectal cancer patients: a randomized controlled trial. World J Surg 2016;40:1985-92.
6. Penchuk Y, Savytska M, Kobyliak N, Ostapchenko D, Kolodiy I, Onysenko S, et al. Antimicrobial activity of dietary supplements based on bacterial lysate of Lactobacillus rhamnosus DV. Front. Cell Infect Microbiol. 2023;13.
7. Schwartz DJ, Rebeck ON, Dantas G. Complex interactions between the microbiome and cancer immune therapy. Crit Rev Clin Lab Sci. 2019;56(8):567-85.
8. Puccetti M, Xiroudaki S, Ricci M, Giovagnoli S. Postbiotic-enabled targeting of the host-microbiota-pathogen interface: Hints of antibiotic decline? Pharm. 2020;12(7):624.
9. Heta S, Robo I. The side effects of the most commonly used group of antibiotics in periodontal treatments. Med Sci. 2018;6(1):6.
10. Acharjee M, Hasan F, Islam T, Nur IT, Begum N, Mazumder C, et al. In-vitro antibacterial activity of commercially available probiotics on food-borne pathogens along with their synergistic effects with synthetic drugs. Metabolism Open. 2022;14:100187.
11. Tamma PD, Avdic E, Li DX, Dzintars K, Cosgrove SE. Association of adverse events with antibiotic use in hospitalized patients. JAMA Intern. Med 2017;177(9):1308-15.
12. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest. 2003;111(9):1265-73.
13. Piewngam P, Zheng Y, Nguyen TH, Dickey SW, Joo H-S, Villaruz AE, et al. Pathogen elimination by probiotic Bacillus via signalling interference. Nature. 2018;562(7728):532-7.
14. Abreu AC, Coqueiro A, Sultan AR, Lemmens N, Kim HK, Verpoorte R, et al. Looking to nature for a new concept in antimicrobial treatments: Iso flavonoids from Cytisus striatus as antibiotic adjuvants against MRSA. Sci Rep. 2017;7(1):3777.
15. Kim SW, Kang SI, Shin DH, Oh SY, Lee CW, Yang Y, et al. Potential of cell-free supernatant from Lactobacillus plantarum NIBR97, including novel bacteriocins, as a natural alternative to chemical disinfectants. Pharmaceuticals. 2020;13(10):266.
16. Rajasekharan SK, Shemesh M. The bacillary postbiotics, including 2-undecanone, suppress the virulence of pathogenic microorganisms. Pharm. 2022;14(5):962.
17. Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D. Use of Lactobacillus plantarum strains as a bio-control strategy against food-borne pathogenic microorganisms. Front. Microbiol. 2016;7:464.
18. Shunan Ren,Chunjie Wang,Chunjie Wang1. The Probiotic Lactobacillus paracasei Ameliorates Diarrhea Cause by Escherichia coli O8 via Gut Microbiota Modulation. Front. Nutr.2022 ;10.3389.
19. Moradi M, Molaei R, Guimarães JT. A review on preparation and chemical analysis of postbiotics from lactic acid bacteria. EMT. 2021;143:109722.
20. Gudiña EJ, Rocha V, Teixeira JA, Rodrigues LR. Antimicrobial and antiadhesive properties of a biosurfactant isolated from Lactobacillus paracasei ssp. paracasei A20. LAM. 2010;50(4):419-24.
21. Ezeonu IM, Iroha I, Esiobu ND. Antibiotic Resistance: Global Trends, Impact and Mitigation. Medical Biotechnology, Biopharmaceutics, Forensic Science and Bioinformatics. CRC Press. 2022. p. 99-113.
22. Shoeb M, Islam R, Parvin N. Antibiotic resistance: a global threat to humanity. Transcending Humanitarian Engineering Strategies for Sustainable Futures. IGI Global. 2023. p. 82-105.
23. Carter D, Charlett A, Conti S, Robotham JV, Johnson AP, Livermore DM, et al. A Risk Assessment of Antibiotic Pan-Drug-Resistance in the UK: Bayesian Analysis of an Expert Elicitation Study. Antibiotics. 2017;6(1).
24. Dugassa J, Shukuri N. Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. JHMN. 2017;1(3):1-17.
25. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and Their Potential Applications in Early Life Nutrition and Beyond. Int. J. Mol. Sci..2019;20(19).
26. Mosca F, Gianni ML, Rescigno M. Can Postbiotics Represent a New Strategy for NEC? Adv. Exp. Med. Biol. 2019;1125:37-45.
27. Romero-Luna HE, Peredo-Lovillo A, Hernández-Mendoza A, Hernández-Sánchez H, Cauich- Sánchez PI, Ribas-Aparicio RM, Dávila-Ortiz G. Probiotic Potential of Lactobacillus paracasei CT12 Isolated from Water Kefir Grains (Tibicos). Curr. Microbiol. 2020;77(10):2584-92.
28. Hamed A C, Ncib K, Merghni A, Migaou M, Lazreg H, Snoussi M, et al. Characterization of Probiotic Properties of Lacticaseibacillus paracasei L2 Isolated from a Traditional Fermented Food "Lben". Life. 2022;13(1).
29. Khani N, Shkouhian Smj, Kafil HS, Gilani N, Abbasi A, Rad AH. Assessing the growth- inhibitory activity of postbiotics of Lactobacillus spp. against Staphylococcus aureus under in vitro circumstances and food model. LAM. 2022;76(2).
30. Rossoni RD, de Barros PP, Mendonça IdC, Medina RP, Silva DHS, Fuchs BB, et al. The Postbiotic Activity of Lactobacillus paracasei 28.4 Against Candida auris. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020;10.
31. Bendali F, Madi N, Sadoun D. Beneficial effects of a strain of Lactobacillus paracasei subsp. paracasei in Staphylococcus aureus-induced intestinal and colonic injury. Int J Infect Dis. 2011;15(11):e787-e94.
32. Shahverdi S, Barzegari AA, Bakhshayesh RV, Nami Y. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of

potential probiotic Lactobacillus paracasei against Staphylococcus aureus and Escherichia coli. Heliyon. 2023;9(4).
33. Nie J, Wu Y, Han X, Li Y, Wang H, Zhang H. [Preparation of Lactobacillus paracei TK1501 postbiotic and its inhibitory effect against Helicobacter pylori infection in mice]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao. 2024;44(5):867-75.
34. Hosseini S, Homayuoni Rad A. Evaluating the Antimicrobial Effect of Postbiotic Extract From Lactobacillus Casei on E. coli, S. aureus, P. nutatum, and C. albicans by Using the Well Diffusion Agar Method. J. Food Eng. 2023;22(1):81-96.

Original Article

Investigating the inhibitory effect of postbiotics from *Lactobacillus Paracasei* on pathogenic bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*

Parisa Nourbakhsh[1], Taghi Zahraei Salehi[2], Saman Hosseinkhani[3], Jalil Mehrzad[2*]

Received:20.07.2024 Revised:13.08.2024 Accepted: 20.09.2024

1. Ph.D. Student of Immunology, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
2. Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran
3. Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.22, No.2, Summer 2024

Pars J Med Sci 2024;22(2):58-67

Abstract:

Introduction: Antibiotic resistance is regrettably increasing. Recently, application of postbiotics against various microbial pathogens can safely be considered to formulate/substitute with antibiotics. As such, we aimed to investigate the inhibitory effect of *Lactobacillus Paracasei* against the most common *Staphylococcal* and coliform pathogens.

Methods & Materials: The standard strain of *Lactobacillus* (*L.*) *paracasei* was cultivated in MRS medium. Then, the inhibitory effects of different obtained postbiotics along with negative-and-positive controls on two pathogenic bacteria, *Staphylococcus (S.) aureus and Escherichia (E.) coli*, was evaluated by the MIC test using the microdilution method on 96-well plates. The results were determined at 630 nm.

Results: The effect of all isolated postbiotics except group C (supernatant obtained with sonication-heat shock treatment) compared to the negative controls (without treatment) was statistically significant ($p<0.05$). Also, the postbiotic group D (supernatant obtained with sonication-thermal shock-freeze treatment) had as remarkably inhibitory effect as positive control (with meropenem treatment) on *S. aureus* ($p=0.0006$) and *E. coli* ($P=0.0003$). Also, different groups of postbiotics had almost similarly non-significant effect *on S. aureus* versus *E. coli*.

Conclusion: Results of this study emphasize the antibacterial potential of *Lactobacillus paracasei* postbiotics against common pathogens, and these postbiotics can be considered as one of the promising candidates for development and further biomedical and pharmaceutical applications.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Postbiotic, *Lactobacillus paracasei*, Antibiotic Resistance

* Corresponding author Email: mehrzad@ut.ac.ir