

اثر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه بر بیوفیلم‌های تشکیل شده توسط استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس: یک مطالعه آزمایشگاهی

زهره دیدار^۱

دریافت مقاله: ۹۷/۸/۶ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۹۷/۱۰/۱۲ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۹۷/۱۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۹۷/۱۲/۱

چکیده

زمینه و هدف: بیوسورفکتانت‌ها، مولکول‌های آمفی‌فیلیک تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که به علت فعالیت سطحی کاربردهای مختلفی از جمله پاک‌کنندگی، امولسیون‌سازی و پراکنده‌کنندگی در صنایع مختلف دارند. هدف از این تحقیق تعیین اثر بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه در برابر تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (PTCC 1440) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1435) است. اثر این نوع بیوسورفکتانت در خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های مذکور نیز بررسی گردید.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، پس از کشت ساکارومایسس سرویسیه جهت تولید بیوسورفکتانت و استخراج بیوسورفکتانت تولیدی، بررسی اثر بیوسورفکتانت تولیدی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس با استفاده از میکروپلیت پلی استایرن ۹۶ چاهک و قرائت جذب در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزا ریدر صورت گرفت. جهت بررسی میزان خارج کردن بیوفیلم‌های میکروبی تشکیل شده نیز از روش جذب سنجی استفاده شد. داده‌ها توسط آنالیز ANOVA انجام شد. میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح اطمینان ۹۹ درصد مقایسه گردیدند.

یافته‌ها: بررسی ویژگی‌های بیوسورفکتانت تولیدی ساکارومایسس سرویسیه نشان داد که این نوع بیوسورفکتانت دارای اندیس امولسیفیکاسیون حدود ۵۵٪ است. میزان فعالیت بیوسورفکتانت جداسازی شده توسط تکنیک پخش روغن تعیین شد و منطقه جایگزینی روغن برابر با $2/5 \pm 0/5$ سانتی‌مترمربع بود. با بررسی اثر بیوسورفکتانت تولیدی توسط ساکارومایسس سرویسیه در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم مشخص گردید که بیش‌ترین اثر را بر بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس داشت. بیوسورفکتانت سبب خارج شدن بیوفیلم کلیه باکتری‌های مورد مطالعه گردید.

نتیجه‌گیری: بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه اثرات ضد بیوفیلمی قوی بر روی بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس دارد.

واژه‌های کلیدی: بیوسورفکتانت، ساکارومایسس سرویسیه، استافیلوکوکوس

۱- (نویسنده مسئول) استادیار گروه صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران
تلفن: ۰۵۱-۴۲۶۲۱۹۰۵، دورنگار: ۰۵۱-۴۲۶۱۵۴۷۲، پست الکترونیکی: z_didar57@yahoo.com

مقدمه

سورفکتانت‌ها گروهی از ترکیبات با ساختار تشکیل شده از دو بخش آب دوست و آب گریز هستند که در حد فاصل دو فاز با قطبیت متفاوت قرار می‌گیرند، در نتیجه سبب کاهش کشش سطحی شده و میکروامولسیون تشکیل می‌دهند و سبب حل شدن هیدروکربن‌های نامحلول می‌شوند. این ویژگی سبب ایجاد سایر ویژگی‌ها نظیر پاک‌کنندگی، امولسیون‌سازی، کف‌کنندگی و پراکنده‌کنندگی سورفکتانت‌ها می‌گردد [۱]. صنعت تولید سورفکتانت‌ها با روند بالایی در حال توسعه است. عملاً تمام این سورفکتانت‌ها به روش شیمیایی سنتز می‌شوند. با این وجود، در سال‌های اخیر به دلیل تجدیدپذیر بودن، قابلیت تجزیه بیولوژیکی و خصوصیات کاربردی بیوسورفکتانت‌ها، این دسته از سورفکتانت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند.

از طرف دیگر می‌توان بیوسورفکتانت‌ها را با استفاده از منابع ارزان قیمت تولید نمود و همچنین می‌توان با تغییر در مواد اولیه، ساختمان و کارایی بیوسورفکتانت‌های حاصله را تغییر داد. همین‌طور بیوسورفکتانت‌ها قادر به حفظ کیفیت در دامنه وسیعی از دما، pH و شوری هستند [۲]. بیوسورفکتانت‌های اصلی شامل گلیکولیپیدها، فسفولیپیدها و اسیدهای چرب، لیپوپتید و

لیپوپروتئین‌ها، بیوسورفکتانت‌های پلیمری و بیوسورفکتانت‌های ویژه هستند.

میکروارگانیزم‌های مختلفی توانایی تشکیل بیوسورفکتانت‌هایی از جمله لاکتوباسیلوس هلوتیکوس [۳]، سودوموناس آئروژنوزا [۴]، اسپینتوباکتر ایندیکوس [۵] و کانیدیدا یوتیلیس را دارند [۶].

بیوفیلم از کلنی‌های میکروبی تشکیل شده است که بر روی سطوح مختلف متصل شده و رشد و تکثیر می‌نمایند. به دلیل مقاومت بیش‌تر باکتری‌ها در برابر ترکیبات ضد عفونی کننده در شرایط تشکیل بیوفیلم، بیوفیلم‌های باکتری‌های بیماری‌زا مشکلات زیادی از نظر ایمنی به وجود می‌آورند. باکتری‌های بیماری‌زایی نظیر اشرشیاکلی، لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا تیفی موریوم، کمپیلوباکتر ژژونی و یرسینیا انتروکولیتیا توانایی تشکیل بیوفیلم دارند [۷]. یکی از روش‌های جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، استفاده از بیوسورفکتانت‌ها است [۸]. بیوسورفکتانت‌ها مانع از تشکیل بیوفیلم می‌شوند و یا این که تشکیل بیوفیلم را به تأخیر می‌ندازند که علت آن ساختار دوقطبی این ترکیبات است.

اثرات ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی توسط میکروارگانیزم‌های مختلف از جمله اثر ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک در برابر بیوفیلم تولیدی توسط اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس

اورئوس [۹]، خاصیت ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در برابر کاندیدا آلبیکانس و باسیلوس سوبتلیس بررسی شده‌اند [۱۰].

Sun و همکاران (۲۰۱۸) اثر بیوسورفکتانت‌ها در خارج کردن بیوفیلم تشکیل شده باکتری اشرشیاکلی را به میزان ۷۵٪ گزارش نموده‌اند [۱۱].

Karlapudi و همکاران در سال ۲۰۱۸، اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت استخراجی از اسپنتوباکتر ایندیکوس M6 در برابر بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی نموده و گزارش کردند که غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این بیوسورفکتانت مانع از تکثیر باکتری گردید. همچنین عمل‌آوری بیوفیلم‌های تشکیل شده با میزان ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این بیوسورفکتانت تا بیش از ۸۲/۵ درصد تجزیه بیوفیلم را نشان داد [۵].

Campos و همکاران (۲۰۱۵) توانایی کاندیدا یوتیلیس در تولید بیوسورفکتانت و افزودن آن در فرمولاسیون سس مایونز را بررسی نموده است و بررسی‌های سم شناسی، غیر سمی بودن این ترکیب را اثبات نموده است [۶].

مخمر ساکارومایسس سرویسیه از جمله گونه‌های مخمری تولید کننده بیوسورفکتانت است [۱۲].

لذا هدف از این تحقیق "تعیین اثر بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه در برابر تشکیل

بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (PTCC 1440) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1435) و توانایی خارج کردن بیوفیلم آن‌ها" بود.

مواد و روش‌ها

تحقیق آزمایشگاهی حاضر دارای کد اخلاق به شماره ۱۳۹۷-۰۱۲ از دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور می‌باشد. در این تحقیق، ابتدا سوبه‌های میکروبی استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112)، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس (PTCC 1440) و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس (PTCC 1435) به صورت لیوفلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. ویال باکتریایی در شرایط استریل، شکسته شده و به محیط براث مناسب (تریپتوز سوی براث در مورد استافیلوکوکوس اورئوس و نوترینت براث در مورد استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس) منتقل گردید و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد، گرم‌خانه گذاری شد. سلول‌های میکروبی توسط سانتریفوژ مدل ALC4232 با دور ۴۰۰۰ rpm جدا شدند. سپس توسط روش مک فارلند جمعیت باکتریایی تعیین شد [۱۳] و با رقیق سازی به نسبت ۰/۰۱ توسط سرم فیزیولوژی، جمعیت

تقریبی $10^6 \times 1/5$ باکتری در هر میلی‌لیتر به دست آمد [۱۴].

مخمر خشک از آستان قدس رضوی خریداری گردید. مراحل آماده سازی شامل انتقال مخمر بر روی محیط کشت سابارو دکستروز آگار و انکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت [۱۲].

سپس به ۲۵ میلی‌لیتر محیط کشت Yeast extract- peptone- glucose براث (YEPG براث) حاوی ۱۰ گرم عصاره مخمر ۲۰ گرم گلوکز و ۲۰ گرم پپتون در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر انتقال داده شد و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید [۱۵]. تولید بیوسورفکتانت توسط مخمر ساکارومایسس سرویسیه، به این صورت انجام شد که مقدار ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت YPEG براث آماده‌سازی گردید و ۲ میلی‌لیتر سوسپانسیون مخمر ساکارومایسس سرویسیه به آن اضافه شد و با سرعت ۱۲۵ دور در دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۶ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. سپس، خالص سازی بیوسورفکتانت صورت گرفت [۱۰].

جهت تعیین میزان فعالیت بیوسورفکتانت جداسازی شده از تکنیک پخش روغن با استفاده از روغن خام سویا استفاده شد. ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پلیت بزرگ ریخته و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از روغن‌های خام بر روی

سطح آب اضافه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر فاز بالایی حاصل از مرحله قبل به آن اضافه شد و منطقه پخش روغن اندازه گیری شد [۱۶].

اندیس امولسیفیکاسیون نیز با برداشتن حجم معادل از کشت براث (۱ میلی‌لیتر) و ۱ میلی‌لیتر پارافین که برای مدت ۲۴ ساعت نگه‌داشته شد. پس از ۲۴ ساعت، لایه امولسیفه شده بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری شد [۱۷].

۱۰۰ میکرولیتر از براث حاوی باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در چاهک ریخته شدند. غلظت‌های متفاوتی از بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر یک از چاهک‌های میکروپلیت حاوی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه گذاری گردید. چاهک‌های حاوی محیط کشت براث استریل به تنهایی به عنوان شاهد استفاده شد. پس از گرم‌خانه گذاری، محیط کشت براث تخلیه شد و هر یک از چاهک‌ها سه مرتبه با ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حاوی نمک (فسفات هیدروژن دی سدیم ۷ میلی‌مول، فسفات دی هیدروژن سدیم ۳ میلی‌مول و کلرید سدیم ۱۳۰ میلی‌مول، $\text{pH}=7/4$ شستشو گردید تا سلول‌های آزاد خارج شوند و به صورت معکوس قرار داده شد تا خشک گردد. سپس توسط اتانل

۹۵٪ لایه بیوفیلم تثبیت گردید و توسط ۱۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۱٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ آمیزی شد. باقی مانده رنگ توسط آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو گردید و میکروپلیت به مدت ۳۰ دقیقه خشک گردید. سپس دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الیزا ریدر (مدل AWARENESS) در هر چاهک قرائت شد. میزان تشکیل بیوفیلم به این صورت دسته بندی گردید. دانسیته نوری < 1 ، تشکیل بیوفیلم به میزان زیاد؛ $1 < \text{دانسیته نوری} < 0.1$ تشکیل بیوفیلم متوسط؛ $0.1 < \text{دانسیته نوری}$ ، عدم تشکیل بیوفیلم در نظر گرفته شد [۱۸].

جهت بررسی اثر بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه در خارج کردن بیوفیلم های باکتری های استافیلوکوکوس ابتدا جمعیت معینی (10^8 باکتری در هر میلی لیتر) از هر یک از باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس در میکروپلیت کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری گردید. سپس درصدهای مختلفی از بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه شامل (۱، ۲ و ۳ میلی گرم در میلی لیتر) به هر چاهک اضافه شد و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه مجدد گرم خانه گذاری گردید. سپس محتویات هر چاهک تخلیه شده و سایر

مراحل شستشو و رنگ آمیزی میکروپلیت مشابه روش ذکر شده در قسمت بالا صورت گرفت [۱۹]. جهت بررسی میزان ممانعت از تشکیل بیوفیلم از تکنیک میکروسکوپ نوری مطابق روش محمدی بازرگانی (۲۰۱۶) به کار برده شد. جهت تشکیل بیوفیلم، ابتدا میکروارگانیسیم های مورد مطالعه (استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس) بر روی لام شیشه ای منتقل و برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم خانه گذاری گردید. سپس لام های شیشه ای حاوی باکتری های مورد مطالعه، در مواجهه با بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه قرار گرفت (به جز نمونه های شاهد). پس از انجام مراحل شستشو و رنگ آمیزی، توسط میکروسکوپ نوری مدل Olympus با بزرگنمایی ۱۰۰۰ مورد بررسی قرار گرفت [۲۰].

اثر غلظت های مختلف بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه بر میزان تشکیل بیوفیلم و نیز میزان خارج کردن بیوفیلم باکتری های مورد بررسی به صورت میانگین و خطای استاندارد میانگین ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) ثبت شد. محاسبات آماری توسط نرم افزار SPSS نسخه ۱۴ و با تست ANOVA انجام شد. میانگین تیمارها به روش دانکن در سطح اطمینان ۹۹ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج

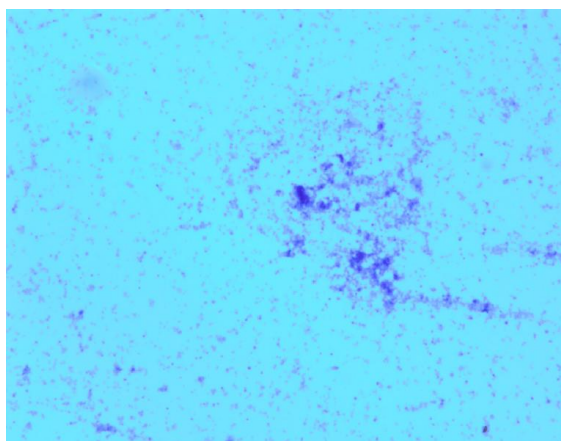
نتایج بررسی های انجام شده نشان داد که اندیس امولسیفیکاسیون بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه ۵۵٪ است. همچنین بررسی فعالیت بیوسورفکتانتی توسط روش جایگزینی روغن نشان داد که میزان منطقه جایگزینی روغن در مورد این بیوسورفکتانت $2/5 \pm 0/5$ سانتی مترمربع بود.

در مطالعه حاضر، اثرات ضد بیوفیلیمی بیوسورفکتانت استخراجی از ساکارومایسس سرویسیه در برابر بیوفیلیم های استافیلوکوکوس اورئوس، ساپروفیتیکوس و اپیدرمیدیس مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان دهنده این است که میزان تشکیل بیوفیلیم توسط هر سه گونه باکتریایی مورد مطالعه تحت تأثیر وجود بیوسورفکتانت میکروبی است و اثر ضد بیوفیلیمی بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه با افزایش غلظت بیوسورفکتانت، افزایش می یابد ($p \leq 0/01$) (جدول ۱).

در بررسی میزان کارایی بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در خارج کردن بیوفیلیم های باکتریایی استافیلوکوکوس های مختلف (استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس) مشخص گردید که غلظت بیوسورفکتانت و نوع باکتری تشکیل دهنده بیوفیلیم بر میزان خارج شدن بیوفیلیم تشکیل شده مؤثر هستند (جدول ۲). بیوفیلیم

باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بیشترین مقاومت در برابر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه نشان داد اما بیوفیلیم باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس رفتار مشابهی در برابر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه نشان دادند (جدول ۲).

تصاویر میکروسکوپی (شکل ۱) بیوفیلیم باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس قبل از مواجهه با بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه را با بزرگنمایی ۱۰۰۰ نشان می دهد. بعد از مواجهه با بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در غلظت ۳ میلی گرم در میلی لیتر هیچ گونه اثری از وجود بیوفیلیم مشاهده نگردید.



شکل ۱- تصویر میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰۰ از بیوفیلیم باکتری استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس. قبل از مواجهه با بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه.

جدول ۱- اثر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های جنس استافیلوکوکوس

تیمار	دانسیتته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیتته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیتته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس به تنهایی	0.03 ± 0.0254	متوسط	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به تنهایی	0.09 ± 0.0138	متوسط	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس به تنهایی	0.17 ± 0.0146	متوسط
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	0.02 ± 0.01	عدم تشکیل	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.0136	متوسط	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	0.05 ± 0.0064	عدم تشکیل
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.009	عدم تشکیل	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.0122	متوسط	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	0.04 ± 0.004	عدم تشکیل
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.002	عدم تشکیل	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.016	عدم تشکیل	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	0.03 ± 0.0027	عدم تشکیل

نتایج آزمون آنالیز آماری به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین. میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد هستند (آزمون چند دامنه داتکن).

جدول ۲- اثر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های جنس استافیلوکوکوس

کیفیت تشکیل بیوفیلم	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	تیمار	کیفیت تشکیل بیوفیلم	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	تیمار	کیفیت تشکیل بیوفیلم	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	تیمار
متوسط	0.146 ± 0.017^a	استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس به تنهایی	متوسط	0.138 ± 0.019^a	استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس به تنهایی	متوسط	0.254 ± 0.03^a	استافیلوکوکوس اورئوس به تنهایی
عدم تشکیل	0.024 ± 0.007^b	بیوفیلم استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.027 ± 0.005^b	بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.02 ± 0.003^b	بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت
عدم تشکیل	0.019 ± 0.006^c	بیوفیلم استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.02 ± 0.006^c	بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.015 ± 0.004^c	بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت
عدم تشکیل	0.011 ± 0.005^d	بیوفیلم استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.012 ± 0.004^d	بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	عدم تشکیل	0.011 ± 0.003^d	بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت

نتایج آزمون آنالیز آماری به صورت خطای استاندارد میانگین $\pm$ میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد هستند (آزمون چند دامنه دانکن).

بحث

بررسی‌ها در خصوص ویژگی‌های بیوسورفکتانت استخراجی ساکارومایسس سرویسیه نشان داد این ماده دارای خاصیت بیوسورفکتانتی حدود ۵۵٪ بود و منطقه جایگزینی روغن که به منظور بررسی میزان خاصیت بیوسورفکتانتی صورت گرفت برابر با $2/5 \pm 0/5$ سانتی‌متر مربع بود.

نتایج جذب سنجی نشان دهنده توانایی تشکیل بیوفیلم توسط هر سه گونه استافیلوکوکی مورد مطالعه است به طوری که میزان دانسیته جذب نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر مربوط به استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس به ترتیب مقدار $0/254$ ، $0/138$ و $0/146$ بود که نشان‌گر تشکیل بیوفیلم به میزان متوسط در هر سه گونه باکتریایی است (جدول ۱). توانایی تشکیل بیوفیلم توسط استافیلوکوکوس اورئوس و اپیدرمیدیس در سایر گزارشات نیز اشاره شده است [۲۱]. در مورد بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس و ساپروفیتیکوس، مواجهه با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه، میزان دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر کم‌تر از $0/1$ بود که نشان دهنده عدم تشکیل بیوفیلم در این شرایط است ولی در مورد بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس فقط در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، میزان دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر کم‌تر از $0/1$ بود که به معنای عدم تشکیل بیوفیلم است، ولی در غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌گرم در

میلی‌لیتر، تشکیل بیوفیلم به میزان متوسط اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

اثر ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت‌های میکروبی در سایر تحقیقات گزارش شده است از جمله Karlapudi و همکاران (۲۰۱۸) اثر ضد باکتریایی و ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت استخراجی از اسینتوباکتر ایندیکوس M6 در برابر بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس اورئوس را بررسی نموده است و گزارش کرده است که غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این بیوسورفکتانت مانع از تکثیر باکتری گردید [۵].

Merghni و همکاران در سال ۲۰۱۷، اثرات ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی توسط لاکتوباسیلوس کازئی را بر روی بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس اورئوس بررسی نموده‌اند. مطابق این تحقیق بیوسورفکتانت استخراجی این باکتری اثرات ضد اتصال بیوفیلم و هم-چنین اثرات ضد بیوفیلمی در برابر استافیلوکوکوس اورئوس داشته است [۲۲].

تعدادی از میکروارگانیسم‌ها ترکیبات بیوسورفکتانت را به منظور ایجاد تغییر در خصوصیات سطحی نظیر قابلیت مرطوب شدن، کاهش کشش سطحی و توانایی تشکیل میکروامولسیون تولید می‌کنند [۱] و در نتیجه سبب جلوگیری از اتصال بعضی سلول‌های میکروبی و تشکیل بیوفیلم می‌شود. هم‌چنین در خارج کردن بیوفیلم از روی سطوح مختلف می‌توانند مؤثر باشند.

نتایج حاصل از بررسی اثر بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در خارج کردن بیوفیلم تشکیل

آرژونوزا و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس بررسی نموده و گزارش کردند که این نوع بیوسورفکتانت تا حدود ۵۷٪ از تشکیل بیوفیلم جلوگیری می‌کند [۲۳].

نتیجه‌گیری

ساکارومایسس سرویسیه توانایی تشکیل بیوسورفکتانت با قدرت بیوسورفکتانتی ۵۵ درصد را دارد. بیوسورفکتانت تولیدی توسط ساکارومایسس سرویسیه اثرات ضد بیوفیلمی بر بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس دارد. همچنین این ماده قابلیت تخریب و خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس را دارد.

تشکر و قدردانی

از آزمایشگاه میکروبیولوژی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور جهت فراهم نمودن امکانات انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌گردد

شده باکتری‌های جنس استافیلوکوکوس نشان داد که مواجهه بیوفیلم‌های استافیلوکوکوس‌های مورد مطالعه در تمامی غلظت‌های بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه (۳-۱ میلی گرم در میلی‌لیتر) دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر کمتر از ۰/۱ بودند که این نشان دهنده عدم وجود بیوفیلم است، در نتیجه بیوسورفکتانت ساکارومایسس سرویسیه در تمام غلظت‌های ۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به طور کامل بیوفیلم تشکیل شده توسط باکتری‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اپیدرمیدیس و ساپروفیتیکوس را خارج نموده است (جدول ۲).

بیوسورفکتانت سنتزی در مطالعه انجام شده توسط Sun و همکاران (۲۰۱۸) سبب خارج شدن بیوفیلم باکتری اشرشیاکلی به میزان ۷۵٪ در غلظت ۱۲۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر گردیده است [۱۱].

Sriram و همکاران (۲۰۱۱) اثرات ضد بیوفیلمی بیوسورفکتانت لیپوپتیدی تولیدی توسط باسیلوس سرئوس را در برابر بیوفیلم‌های باکتری سودوموناس

References

- [1] Banat IM, De Rienzo M A D. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98(24): 9915-29.
- [2] Kosaric N. Biosurfactants in industry. *Pur Appl Chem* 1993; 6: 1731-7.
- [3] Sharma D, Singh Saharan B. Functional characterization of biomedical potential of

- biosurfactant produced by *Lactobacillus helveticus*. *Biotechnol Rep* 2016; 11: 27–35.
- [4] Amani H, Müller MM, Syldatk C, Hausmann R. Production of microbial rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* MM1011 for ex situ enhanced oil recovery. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 170 (5): 1080-93.
- [5] Karlapudi A P, Venkateswarulu T C, Srirama K, Krishna Kota R, Mikkili I, Kodali V P. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an *Acinetobacter* M6 strain. *J King Saud Univ Sci* 2018 <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2018.04.007>.
- [6] Campos J M, Stamford T L M, Rufino R D, Luna J M, Stamford T C M, Sarubbo L A. Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicol Rep* 2015; 2: 1164–70.
- [7] Didar Z. Novel hygienic issues in food industry. Islamic azad university publication. 2018. pp: 5-8. [Farsi].
- [8] de Freitas Ferreira J, Alan Vieira E, Nitschke M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. *Food. Res Int* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005>.
- [9] Kaur S, Amrita Kaur P, Ravinder Nagpal R. In vitro biosurfactant production and biofilm inhibition by lactic acid bacteria isolated from fermented food products. *Int J Probiotics Prebiotics* 2015; 10(1): 17-22.
- [10] Johny JM. Inhibitory effect of biosurfactant purified from probiotic yeast against biofilm producers. *IOSR J Environ Sci Toxicol Food Technol* 2013; 6(1): 51-5.
- [11] Sun W, Wang Y, Zhang W, Ying H, Wang P. Novel surfactant peptide for removal of biofilms. *Colloids Surf B* 2018; 172: 180–186.
- [12] Nibras Nazar Mahmood. 2018. Effect of biosurfactants purified from *Saccharomyces cerevisiae* against *Corynebacterium urealyticum*. *J Pharm Sci & Res* 2018; 10(3): 481-6.

- [13] Mohammadi N, Mirhosseini M, Shirzad M, Dehghan Hamdan A, Yazdani N. Synthesizing ZnO Nanoparticles by High-Energy Milling and Investigating Their Antimicrobial Effect. *J Shahid Sadoughi Uni Med Sci* 2015; 23(4): 2070-82. [Farsi].
- [14] Moradian Eivari A K, Salehi M, Malek Jafarian M. Antimicrobial Activity of Rosmarinus Officinalis on Vancomycin – Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Imam Reza Hospital Patients of Mashhad. *J Neyshabur Uni Med Sci* 2015; 3(3): 39-45.[Farsi].
- [15] Dhivya H, Balaji S, Madhan Rand Srv A. Production of amphiphilic surfactant molecule from *Saccharomyces cerevisiae* Mtcc 181 and its protagonist in nanovesicle synthesis. *Int J Pharma Sci* 2014; 11:16-23.
- [16] Rodrigues LR, Teixeira J A, Mei H C. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids Surf B* 2006; 49: 78-85.
- [17] Bodour A A, Miller R M. 2004. Biosurfactant types, screening, methods, and applications. In: Bitton, G. (Ed.), Encyclopedia of Environmental Microbiology, first ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ, pp. 750–770.
- [18] Noumi E, Snoussi M, Merghni A, Nazzaro F, Quind G. Akdamar G, et al. Phytochemical composition, anti-biofilm and anti-quorum sensing potential of fruit, stem and leaves of *Salvadora persica* L. methanolic extracts. *Microb Pathog* 2017;109 : 169-176.
- [19] Todorov S D, de Paula O A L, Camargo A C, Lopes D A, Nero L A. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. *Rev Argent Microbiol* 2018; 50(1):48-55.
- [20] Mohammadi Bazargani M, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and

- Escherichia coli* biofilms. *Food Control* 2016; 61: 156-64.
- [21] Izano EA, Amarante M A, Kher WB, Kaplan J B. Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Appl. Environ. Microbiol* 2008. 74(2): 470-6.
- [22] Merghni A. Dallel I. Noumi E. Kadmi Y. Hentati H. Tobji S. Mastouri M. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog* 2017;104: 84-9.
- [23] Sriram MI, Kalishwaralal K, Deepak V, Gracerosep R, Srisakthi K, Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2011; 85(2):174-81

The Effect of Biosurfactant of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biofilms Produced by *Staphylococcus Aureus*, *Epidermidis* and *Saprophyticus*: A Laboratory Study

Z. Didar¹

Received: 28/10/2018 Sent for Revision: 02/01/2019 Received Revised Manuscript: 19/02/2019 Accepted: 20/02/2019

Background and Objectives: Biosurfactants are amphiphilic molecules produced by microorganisms that due to surfactant activity, have several applications in different industries such as cleaning, emulsification, foaming and dispersion. The aim of this study was to investigate the effect of biosurfactant extracted from *saccharomyces cerevisiae* on biofilm formation of *staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *staphylococcus saprophyticus* (PTCC 1440) and *staphylococcus epidermidis* (PTCC 1435). The effect of this biosurfactant on the removal of the mentioned bacteria's biofilms was also assessed.

Materials and Methods: In this laboratory study, after *Saccharomyces cerevisiae* cultivation for producing biosurfactant and extraction of the produced biosurfactant, the effect of the extracted biosurfactant in preventing the formation of biofilms of *staphylococcus aureus*, *staphylococcus saprophyticus* and *staphylococcus epidermidis* was assessed using 96-well polystyrene microplate and absorbance reader at 570nm by ELISA reader. The same method was used for determining the ability of biosurfactant in removal of biofilms. Statistical analysis was performed by ANOVA. The means of treatments were compared with Duncan's method at a confidence level of 99%.

Results: The results showed that biosurfactant of *saccharomyces cerevisiae* had an emulsification index equal to 55%. The biosurfactant activity was determined via the oil displacement method and the area of displaced oil was $2.5 \pm 0.5 \text{ cm}^2$. The results showed the biosurfactant produced by *saccharomyces cerevisiae* had the most effect on preventing biofilm formation by *staphylococcus aureus* and *staphylococcus saprophyticus*. Biosurfactant caused the all tested bacteria's biofilms to be removed.

Conclusion: Biosurfactant produced by *saccharomyces cerevisiae* has strong anti-biofilm activity against biofilms of *Staphylococcus aureus*, *epidermidis* and *saprophyticus*.

Key words: Biosurfactant, *Saccharomyces cerevisiae*, *Staphylococcus*

Funding: This study did not have any funds.

Conflict of interest: None declared.

Ethical approval: This protocol was registered at IR.IAU.NEYSHABUR.REC.1397.012 at the I.R. Iran Islamic Azad University. The Ethics Committee of the Islamic Azad University has approved this protocol.

How to cite this article: Didar Z. The Effect of Biosurfactant of *Saccharomyces Cerevisiae* on Biofilms Produced by *Staphylococcus Aureus*, *Epidermidis* and *Saprophyticus*: A Laboratory Study. *Rafsanjan Univ Med Sci* 2019; 18 (5): 441-54. [Farsi]

¹- Assistant Prof., Dept. of Food Sciences, Islamic Azad University, Neyshabur Branch, Neyshabur, Iran, ORCID: 0000-0001-6268-6376.

(Corresponding Author): Tel: (051) 42621905, Fax: (051) 42615472, E-mail: z_didar57@yahoo.com