اثر عصاره کوکالچر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس با اشریشیاکلی بر میزان رشد اشریشیاکلی

مریم نصرالله زاده[۱]، لیدا لطف الهی[۱]، سولماز اثنی عشری[۲]، رضا اکبری[۱]*

۱. گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ارومیه، ارومیه، ایران
۲. مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول : رضا اکبری نشانی برای مکاتبه: akbari.r@umsu.ac.ir
دریافت مقاله: زمستان ۱۴۰۴ پذیرش برای چاپ: بهار ۱۴۰۵

چکیده

سابقه و هدف: *عفونت‌های دستگاه ادراری یک مشکل بهداشت عمومی و از شایعترین عفونت ها است که توسط طیفی از باکتریها همچون اشریشیاکلی ایجاد می‌شوند. در مواردی عفونت‌های ادراری بصورت پلی میکروبیال بروز می کنند. در این نوع عفونت ها باکتریها با تولید انواع متابولیت‌های ثانویه اثر فزاینده یا کاهنده بر رشد یکدیگر می گذارند. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره کوکالچر استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی بر میزان رشد اشریشیاکلی می باشد.*

مواد و روش‌ها: *سویه های استاندارد استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و اشریشیاکلی بصورت کوکالچر در محیط مایع مشترک کشت داده شدند. مایع رویی پس از سانتریفوژ جداسازی شده و به ترتیب از فیلتر سرسرنگی (۰/۲۲) میکرومتر و فیلتر آمیکون سایز ۱۰ عبور داده شد. فراکشن های پپتیدی عصاره با HPLC تخلیص شدند. در ادامه تاثیر عصاره کوکالچر و فراکشن‌های تخلیص شده بر روی اشریشیاکلی به روش Microdilution broth، شمارش کلونی/سلول در آگار پلیت و روش فلوسیتومتری بررسی شد.*

یافته‌ها: *مقدار MIC عصاره خام، عصاره فیلتره کوکالچر و فراکشن پپتیدی F2; RT8.083 بر روی اشریشیاکلی ۵۰۰< میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد. در حضور عصاره کوکالچر و فراکشن پپتیدی F2، رشد اشریشیاکلی افزایش می یابد و به ترتیب تعداد کلونی اشریشیاکلی از ۸۸/۳۳ ×۱۰^۸ CFU/ml به ۱۰۴/۳۳ ×۱۰^۸ CFU/ml و از ۱۸۰/۳۳×۱۰^۵ CFU/ml تا ۲۳۰× ۱۰^۵ CFU/ml افزایش می یابد. در بررسی جمعیت سلولی اشریشیاکلی با فلوسیتومتری مشخص شد تعداد بیشتری از سلولها در حضور فراکشن پپتیدی F2; RT8.083، در مقایسه با عصاره بدون فراکشن زنده هستند.*

نتیجه‌گیری و پیشنهادات:*عصاره خام کوکالچر، عصاره فیلتره و فراکشن پپتیدی F2; RT8.083 نه تنها بر روی اشریشیاکلی فعالیت ضدمیکروبی نشان ندادند بلکه عصاره خام و عصاره فیلتره حدود ۱۸ و فراکشن F2 حدود ۲۸ درصد رشد اشریشیاکلی را افزایش می دهند. یافته‌ها نشان‌دهنده احتمال اثر تحریک‌کننده برخی اجزای حاصل از کوکالچر بر رشد اشریشیاکلی در شرایط آزمایشگاهی هستند و بررسی بیشتر مکانیسم این اثر و اهمیت بالینی احتمالی آن ضروری است.*

کلمات کلیدی: *برهمکنش باکتریها، عفونت های چند میکروبی، عفونت های ادراری، مقاومت دارویی، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، اشریشیاکلی.*

مقدمه

عفونت‌های دستگاه ادراری[۱] (UTIs) یک مشکل بهداشت عمومی هستند که توسط طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شوند، *اشریشیاکلی* با درصد بیماری‌زایی ۴۳٪ جزء شایعترین باکتری ایجادکننده عفونت‌های ادراری مرتبط با مراقبت‌های بهداشتی است. در مواقعی عفونت‌های ادراری با دخالت ترکیبی از انواع باکتری‌ها بصورت عفونت چند میکروبی[۲] ایجاد می شوند (۱ و ۲).

۱ Urinary Tract Infection

۲ Polymicrobial infections

عفونت‌های چند میکروبی به تداخلات بین میکروبی[۳] گفته می شود که بین چند میکروب پاتوژن با یکدیگر یا بین پاتوژن با میکروب‌های فلور میزبان اتفاق می افتد(۳). تعاملات بین باکتری‌ها در عفونت‌های چند میکروبی می تواند شدت عفونت را تغییر دهد و درمان را پیچیده و طولانی کند(۴-۸). چنین فعل و انفعالاتی می تواند ناشی از رقابت برای ماده مغذی(9)، دفع متابولیت‌ها (تغذیه متقابل) (۱۰)، تولید مولکول‌هایی که به طور خاص به سایر اعضای اکوسیستم آسیب می زنند یا به آن‌ها کمک می کنند(۱۱, ۱۲) و یا تولید مولکول‌های سیگنال دهی[4](QS) باشد.

تولید مولکول‌های سیگنال دهی، مکانیسمی است که در تعامل باکتری‌ها در عفونت‌های چند میکروبی بر روند کاهش تعداد باکتری‌های رقیب یا افزایش تعداد گونه‌های همنوع تاثیرگذار است (۱۳). به عنوان مثال *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* با تولید عوامل اتصالی در سطح دیواره سلولی، ترشح پروتئین‌هایی که باعث تسهیل چسبندگی باکتری‌های رقیب می شوند و با تحریک پاسخ پیش التهابی قوی، کلونیزاسیون *استافیلوکوکوس اورئوس* و تشکیل بیوفیلم آن را فزایش می‌دهند (14-16).

در مطالعه‌ی دیگر که توسط Ballen و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در اسپانیا انجام گرفت، برهمکنش‌های میکروبی *کلبسیلا پنومونیه* و *انتروکوکوس فکالیس* مورد ارزیابی قرار گرفت. آنها نشان دادند که *انتروکوکوس فکالیس* ، PH محیط را با تولید اسید لاکتیک در بیوفیلم‌های پلی میکروبی تغییر می‌دهد که رشد *کلبسیلا پنومونیه* را مختل می‌کند (17). در مطالعات مشابه تولید متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ضد *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۸) و تولید ترکیبات ضدمیکروبی توسط گونه های *Bacillus sp* موجود در حفره دهان در برابر باکتریهای *میکروکوکوس لوتئوس*[۵]، *سالمونلا تیفی*[۶]، *اشریشیاکلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* گزارش شده است (۱۹).

یکی از روش‌ها برای مطالعه رابطه بین میکروارگانیسم-ها در آزمایشگاه، روش کوکالچر یا کشت همزمان چند میکروب در محیط مایع مشترک[۷](CLM) هست. با این روش میکروارگانیسم‌های هم‌کشت بیشتر رشد می کنند و تولید مواد زیستی همچون داروها، مواد مغذی و انواع فراورده های تخمیری تقویت می شود (۲۰, ۲۱). در روش کشت در محیط مایع مشترک تغییرات اجزای بیوشیمیایی و رشد کلی گونه‌های متقابل به طور کامل بررسی می شود. از این روش برای شناسایی افزایش یا کاهش تولید متابولیتهای زیستی در محیط در مراحل مختلف استفاده می شود (۲۲).

استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس یکی از فلورهای نرمال پوست و مخاط انسان است که از طریق چسبنده های خاص با چسبیدن به بخش‌های سطحی بافت میزبان، می تواند یک رابطه همسان مادام العمر با انسان برقرار کند که در اوایل زندگی آغاز می شود (۲۳). بدلیل اینکه *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* از اعضای مهم فلور پوست انسان است، احتمال آلودگی ابزار و آلات پزشکی در حین استفاده آنها در بدن، بالاست. به همین دلیل در حال حاضر یکی از شایع‌ترین علت عفونت‌های بیمارستانی است (۲۴). *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با تولید مدولین‌های محلول در فنل ([8]PSMs) (خانواده‌ای از پپتیدهای آمفی پاتیک و آلفا هلیکال چند عملکردی) (۲۵) با تولید باکتریوسین‌هایی مانند لانتی بیوتیک‌های اپیدرمین(۲۶)، PEP5، اپیلانسین K7 (۲۷) و اپیلانسین ۱۵X(۲۸)، تخریب بیوفیلم‌های دیگر گونه‌های باکتریایی (29)، تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیره (30) در استقرار گونه‌های دیگر میکروبی در بدن میزبان تاثیرگذار است. در رابطه با ارتباط مهاری یا تقویتی *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بر میزان رشد یا مهار سایر پاتوژنها اطلاعات کاملی وجود ندارد و تنها بصورت موردی در برخی مقالات علمی اشاره شده است. لازم است ارتباط این گونه با گونه‌های دیگر همچون *اشریشیاکلی* بیشتر بررسی شود، بویژه این‌که این باکتری از مهم‌ترین پاتوژن‌های عفونت‌های ادراری در انسان است.

اشریشیاکلی[۹] عضوی از خانواده باکتریایی انتروباکتریال، شایع‌ترین ساکن مجرای گوارشی انسان و حیوانات خونگرم و همچنین یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زا است. این باکتری به‌عنوان کومنسال با میزبان زندگی می‌کند ولی مسئول طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها نیز است (31). در حال حاضر بیش از ۱۶۰ نوع سرولوژیک، *اشریشیاکلی* وجود دارد که در عفونت

---

۳ Microbial interference
4 Quorum sensing
۵ *Micrococcus luteus*
۶ *Salmonella Typhi*
۷ - Communal liquid medium
8 - Phenol soluble modulins
۹ - *Escherichia coli*

دستگاه ادراری[10] (UTI) ، پنومونی اکتسابی بیمارستانی[11] (HAP) ، سندروم همولیتیک-اورمیک (HUS)[12] و مننژیت نقش دارند(32). اشریشیاکلی از جمله باکتری‌هایی است که در سال‌های اخیر گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت‌های میکروبی در مقابل آنتی‌بیوتیک‌هایی نظیر پنی‌سیلین، کانامایسین، ریفامپین، کلرامفنیکل، کارباپنم، استرپتومایسین، تتراسایکلین، سفالوتین، سفوروکسیم و سفوکسیتین از آن گزارش شده است (33, 34). با توجه به مقاومت های انتی بیوتیکی گسترده ای که در *اشریشیاکلی* وجود دارد و چالش هایی که در درمان عفونت های این باکتری بویژه عفونت های ادراری این باکتریها احساس می شود، استفاده از مواد ضد میکروبی جایگزین یکی از ضروریات است. از انجایی که باکتریهای مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، منشاء تولید مواد ضد میکروبی هستند، از این قابلیت باکتریها می توان در جهت مهار پاتوژنهای مقاوم به دارو استفاده کرد. ایده تحقیقاتی این مطالعه این است که در کشت همزمان *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با باکتری مولد عفونت های ادراری *اشریشیاکلی* متابولیت های ثانویه ای توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تولید می شود که در مهار رشد باکتریهای پاتوژن *اشریشیاکلی* اثرگذار خواهد بود، بویژه اینکه در این خصوص هیچ مطالعه‌ای در دنیا انجام نگرفته است انجام این مطالعه ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* جهت بررسی تولید متابولیت های ثانویه در محیط مایع مورد آزمایش قرار گرفت. هدف این مطالعه بررسی اثر عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* بر میزان رشد *اشریشیاکلی* است.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی سوسپانسیون باکتری‌ها

سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* ATCC 12228و *اشریشیاکلی* ATCC 25922 بصورت لیوفیلیزه از انستیتو پاستور تهران خریداری شدند. به منظور کشت باکتری، ۱میلی لیتر محیط کشت TSB به ویال لیوفیلیزه سویه ها افزوده شد و به مدت 20 دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از سویه های موردنظر کشت ۲۴ ساعته انجام گرفت. پس از کشت، ویال های متعدد از سویه ها تهیه گردید. ویال‌های ذخیره در TSB با ۲۰ ٪ گلیسرول جهت استفاده بعدی در فریزر ۲۰- ذخیره شدند و ویال های کاری برای آماده سازی سوسپانسیون میکروبی جهت انجام تست های میکروبی استفاده شدند.

برای آماده سازی سوسپانسیون میکروبی، باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در محیط کشت مولر هینتون براث کشت داده شده و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. برای آماده سازی سوسپانسیون باکتری با تراکم CFU/ml ۱۰۶، ابتدا مقداری از سوسپانسیون رشد کرده از باکتریها در یک میکروتیوب ۲ میلی لیتری ریخته شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردیده و مایع رویی سوسپانسیون‌ها دور ریخته شد. سه مرتبه عمل شستشوی رسوب باکتری‌ها با مولر هینتون براث استریل با شرایط سانتریفیوژ گفته شده تکرار شد. OD دستگاه اسپکتروفتومتری در عدد ۶۲۵ تنظیم گردیده و با ۱ میلی لیتر محیط مولر هینتون براث استریل (داخل کووت) بلانک شد. در ادامه مقدار بسیار کمی از سوسپانسیون حاوی رسوب باکتری به آرامی به محیط کشت اضافه و با استفاده از سمپیلر به خوبی مخلوط گردید. این کار تا رسیدن OD دستگاه به عدد مطلوب ۰/۰۹۵ (در محدوده ۰/۰۸ تا ۰/۱۳) انجام گرفت. در این OD تراکم باکتری برابر CFU/ml ۱۰۸ × ۱/۵ خواهد بود. با توجه به این که در این مطالعه تراکم CFU/ml ۱۰۶ از باکتری‌ها مورد نیاز بود تراکم CFU/ml ۱۰۶ از روی غلظت اولیه باکتری CFU/ml ۱۰۸ × ۱/۵ تهیه شد (۱۰ میکرولیتر در هر میلی لیتر) (35).

تهیه عصاره کوکالچر از *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشریشیاکلی*

در این مطالعه از روش کشت در محیط مایع مشترک (مخلوط مستقیم دو باکتری) استفاده شد. برای کشت باکتری‌ها از محیط تریپتیک سوی براث (TSB) استفاده شد.

برای تهیه کوکالچر باکتری‌ها ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از باکتریهای *اشریشیاکلی* (CFU/ml ۱۰۶) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (CFU/ml ۱۰۶) به یک ارلن حاوی ۱۰۰ میلی لیتر محیط کشت TSB اضافه شدند. در دو ارلن مجزا

---

[10] - Urinary tract infection
[11] - Hospital acquired pneumonia
[12] - Hemolytic-uremic syndrome

باکتری‌های *اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با تراکم باکتریایی مشابه ارلن اول به عنوان کنترل به تنهایی کشت داده شدند. ارلن‌ها در انکوباتور شیکردار با دور ۱۶۰ rpm به مدت ۱۸-۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردیدند. بعد از مدت زمان گفته شده، سوسپانسیون کشت باکتریها در داخل فالکون‌های ۵۰ سی‌سی ریخته شده و با دور ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی به آرامی برداشته شده و به منظور حذف باکتری از عصاره کشت، مایع از فیلتر ۰/۲۲ nm، عبور داده شدند. در نهایت عصاره‌های کشت کوکالچر در میکروتیوب‌ها تقسیم شده و برای استفاده بعدی در فریزر ۲۰- درجه ذخیره شدند (36).

جداسازی متابولیت های پپتیدی بوسیله فیلتر آمیکون ۱۰ کیلو دالتون

جهت جداسازی متابولیت های پپتیدی با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون از سایر ترکیبات با وزن مولکولی بالا، از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلو دالتون با حجم ۱۵ میلی لیتری استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی در فیلتر آمیکون با دور ۱۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. مایع عبور کرده از فیلتر به عنوان نمونه جداسازی شد و تا انجام تست بعدی در فریزر ۲۰- ذخیره شدند (37).

جداسازی فرکشن‌های پپتیدی از عصاره های فیلتره شده با استفاده از HPLC

جهت جداسازی فراکشن های پپتیدی از عصاره های فیلتر شده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در فاز معکوس (HPLC) (Knauer GmbH Germany) با ستون C18 (Knauer analytical column C18 250 mm × 4.6 mm 5 micro meter) استفاده گردید. فاز متحرک شامل استونیتریل خالص به عنوان ماده اصلی (محلول C) و آب خالص کروماتوگرافی HPLC Grade با ۰.۰۵ درصد تری فلوئورو استیک اسید (محلول A) به عنوان محلول فرعی استفاده شد. قبل از تزریق نمونه به دستگاه ابتدا ستون تخلیص با محلول A شستشو داده شده و متعادل سازی گردید. سپس نمونه در حجم ۲۰ میکرولیتر با سرنگ همیلتون به ستون تخلیص تزریق شد. نمونه تزریق شده به ستون تخلیص، در معرض یک گرادیانت خطی افزایشی از محلول استونیتریل با Retention Time ۳۵ دقیقه ای قرار گرفت. فراکشن های پپتیدی بر اساس تصاویر مانیتوری پیک های کروماتوگرام جمع‌آوری شده و پس از لیوفیلیزه شدن با دستگاه فریز درایر(Martin Christ, ALPHA 1-2 LD plus, freeze dryer, Germany) و تعیین غلظت در فریزر ۷۰- تا زمان انجام آزمایش نگهداری شدند (38)

تعیین اثر ضد میکروبی عصاره کوکالچر و فرکشن های به دست آمده از عصاره کوکالچر بر میزان رشد *اشریشیاکلی*

برای بررسی فعالیت ضد میکروبی عصاره کوکالچر و فرکشن‌های تخلیص شده در برابر باکتری استاندارد *اشریشیاکلی* از روش حداقل غلظت مهارکنندگی MIC[13] و حداقل غلظت کشندگی MBC[14] استفاده گردید.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC)

در این تست از پروتکل CLSI و روش میکرودایلوشن براث استفاده شد (39). برای انجام این تست ابتدا یک محلول استوک از فراکشن ها و متابولیت های جمع آوری شده از عصاره کوکالچر با آب مقطر دوبار تقطیر با غلظت معین تهیه گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون براث[15] (MHB) استریل به چاهک‌های یک میکروپلیت ۹۶ خانه ای مربوط به هر نمونه آزمایشی اضافه شد. سپس رقت‌های سریالی از فرکشن‌ها در محدوده ۵۱۲ تا ۴ میکروگرم، آماده شد. بعد از این مرحله ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون باکتریایی با تراکم CFU/mL ۱۰^۵ ×۵ به تمام چاهک‌ها اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. کمترین غلظت از ماده آنتی‌باکتریال که در شرایط آزمایشگاهی از رشد باکتری جلوگیری کند به عنوان غلظت MIC در نظر گرفته می شود.

تعیین حداقل غلظت کش‌اندگی (MBC)

برای انجام MBC از پروتکل CLSI و روش کشت در محیط مولر هینتون آگار و شمارش کلونی استفاده شد (39). در این روش ۱۰ میکرولیتر از هرکدام از چاهک‌های استفاده‌شده در

---

[13] Minimal Inhibitory Concentration
[14] Minimal Bactericidal Concentration
[15] Mueller Hinton Broth

روش MIC در پلیت های حاوی مولرهینتون آگار (MHA) کشت داده شد و پلیت ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیده و در ادامه کلونی‌ها شمارش شدند. کمترین غلظت از ماده آنتی‌باکتریال که می‌تواند در شرایط آزمایشگاهی مانع رشد ۹۹/۹۹ درصد از باکتری‌ها شود به عنوان MBC در نظر گرفته می شود.

بررسی اثر عصاره خام کوکالچر *(استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس +اشریشیاکلی)* بر رشد *اشریشیاکلی*

برای انجام این کار ابتدا در ۳ لوله آزمایشی ۹ میلی لیتر محیط کشت TSB اضافه شد. در لوله اول ۱ میلی لیتر از عصاره کوکالچر اپیدرمیدیس با *اشریشیاکلی* همراه با ۱۰ میکرولیتر از باکتریهای *اشریشیاکلی* با تراکم 10^6 CFU/ml کشت داده شد. در لوله دوم ۱۰ میکرولیتر از باکتریهای *اشریشیاکلی* با تراکم 10^6 CFU/ml بدون اضافه کردن عصاره کوکالچر کشت داده شد (کنترل مثبت ۱). در لوله آزمایشی سوم ۱ میلی لیتر از عصاره کوکالچر حرارات داده شده در بن ماری دمای ۶۵ درجه سانتیگراد بمدت ۲۰ دقیقه (جهت غیر فعال کردن ماده موثره) با باکتری *اشریشیاکلی* کشت داده شد (لوله شاهد). در ادامه لوله ها بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. از هر کدام از لوله ها، یک رقت 10^5/ ۱ با محیط TSB استریل تهیه کرده و مقدار ۱۰ میکرولیتر از آن داخل پلیت مولرهینتون آگار کشت داده شد و پلیت‌ها مجددا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از این مدت تعداد کلنی-های رشد کرده در پلیت آگار شمارش شدند (40).

بررسی وضعیت جمعیت سلولی *اشریشیاکلی* با روش فلوسایتومتری

ابتدا باکتری *اشریشیاکلی* در محیط کشت مولر هینتون براث (MHB) کشت داده شد. باکتریها در فاز لگاریتمی برداشت شدند، شسته شدند و تعداد آنها در بافر PBS به 10^6 CFU/ml تنظیم شد. سلول های باکتریایی بمدت 4 ساعت در مخلوط با ۱۰ میلی گرم از فراکشن کوکالچر تخلیص شده از HPLC (فرکشن RT8.083) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. محلول باکتری با دور ۷۰۰۰ rpm/min بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس رسوب سلولی سه مرتبه در بافر PBS شسته شده و در حجم ۱ میلی لیتر با ۱ میکرولیتر از رنگ فلورسنت PI (۱.۳میکروگرم بر میلی لیتر) در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شدند. تحریک[16] و تشعشع[17] فلورسانس حاصل به ترتیب در طول موج ۵۴۴ و ۶۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر فوئورسانس (BD FACSCalibur flowcytometer, USA) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه از سوسپانسیون باکتری بدون فراکشن در ترکیب با رنگ پروپیدیوم یداید (PI[18]) به عنوان کنترل منفی استفاده شد(41).

پروپیدیوم یداید رنگی است که از غشای سلول عبور نمی‌کند و معمولاً توسط سلول‌های زنده با غشای سالم دفع می‌شود؛ با این حال، این ماده می‌تواند به غشای آسیب‌دیده سلول‌های مرده نفوذ کرده و با قرار گرفتن (اینترکاله شدن) میان بازها، مولکول‌های DNA دورشته‌ای درون‌سلولی را رنگ‌آمیزی کند و با استفاده از یک فلوسیتومتر قابل تشخیص است.

تحلیل داده‌ها:

نتایج MIC عصاره کوکالچر و فراکشن ها بر روی باکتری *اشریشیاکلی* با سه بار تکرار و با در نظر گرفتن میانگین ± انحراف استاندارد (SD) انجام شد. کشت باکتریها در محیط آگار جهت شمارش تعداد کلونی ها، در سه پلیت مجزا انجام گرفت و میانگین تعداد کلونی ها پس از شمارش جهت مقایسه بین گروه تست و گروه شاهد در نظر گرفته شد. در این مطالعه از سوسپانسیون باکتری بدون عصاره کوکالچر به عنوان (کنترل مثبت)، سوسپانسیون باکتری در حضور عصاره کوکالچر حرارت داده شده به عنوان (شاهد) و سوسپانسیون باکتری در حضور عصاره کوکالچر (گروه تست) برای مقایسه و ارزیابی اثر عصاره کوکالچر بر روی باکتری استفاده شد.

یافته ها:

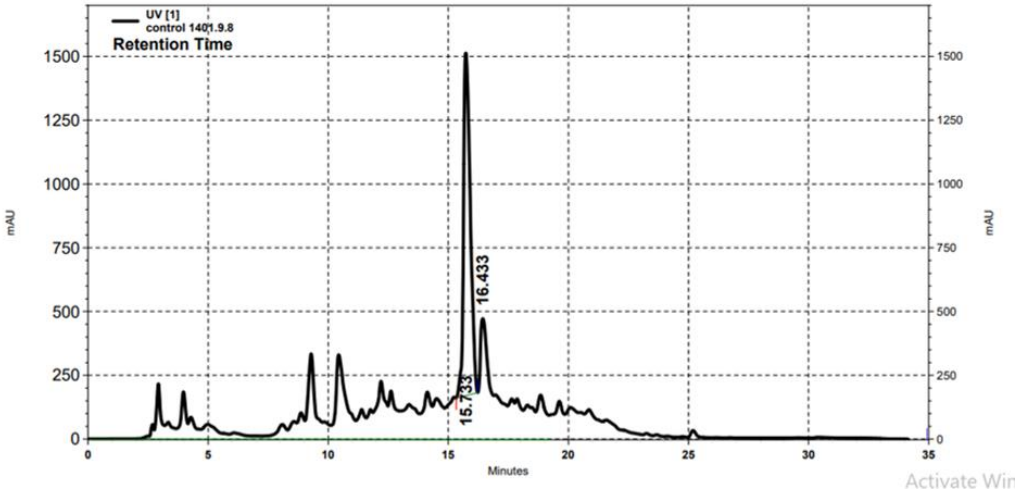
نتایج تخلیص فرکشن‌های پپتیدی در ستون HPLC

در تخلیص عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تنها با HPLC، حدود ۲۰ فراکشن پپتیدی شناسایی شد.

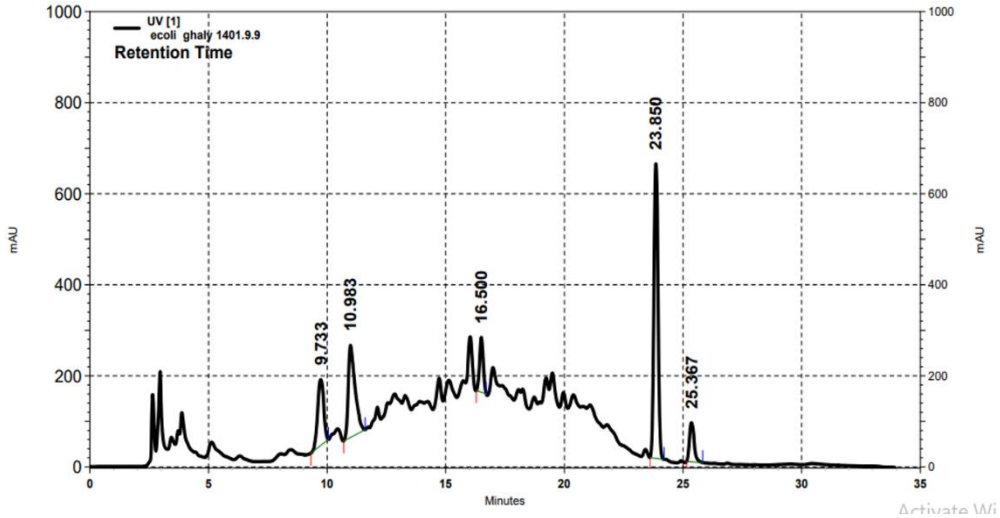
---

[16] Excitation
[17] Emission
[18] Propidium iodide

بزرگترین فراکشن با[۱۹] RT برابر ۱۵/۷۳ و با دامنه mAU۱۵۰۰ بود (شکل 1). در تخلیص عصاره کشت *اشریشیاکلی* تنها با HPLC، حدود ۲۴ فراکشن پپتیدی شناسایی شد. بزرگترین فراکشن با RT برابر ۲۴ و با دامنه mAU ۶۵۰ بود (شکل ۲). در تخلیص عصاره کشت کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* با HPLC، حدود ۲۶ فراکشن پپتیدی شناسایی شد. بزرگترین فراکشن کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* با RT برابر ۲۴ و با دامنه mAU ۶۵۰ بود (شکل ۳). فراکشن های با RT ۱۵/۷۳ و ۱۶/۴۳ به ترتیب با دامنه هایmAU ۱۵۰۰ و mAU ۵۰۰ مربوط به عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در حالت کوکالچر با *اشریشیاکلی* تا دامنه mAU۳۰۰ کاهش نشان داد. در عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *اشریشیاکلی* فراکشن RT;8.083 فراکشنی بود که منحصرا در عصاره کوکالچر افزایش تولید داشته است و در عصاره اپیدرمیدیس یا*اشریشیاکلی* تنها تولید نشده است (اشکال ۴ و ۵).

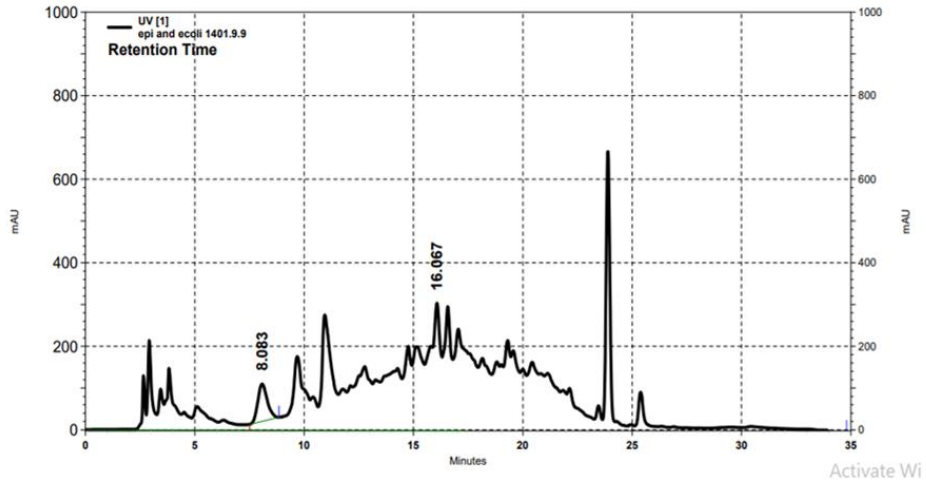


شکل1: کرماتوگرام عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تنها

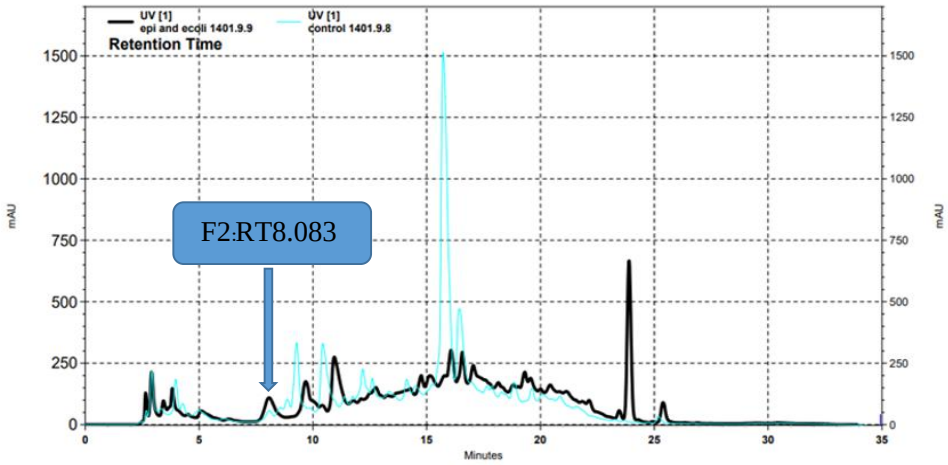


شکل۲: کروماتوگرام عصاره کشت *اشریشیاکلی* تنها

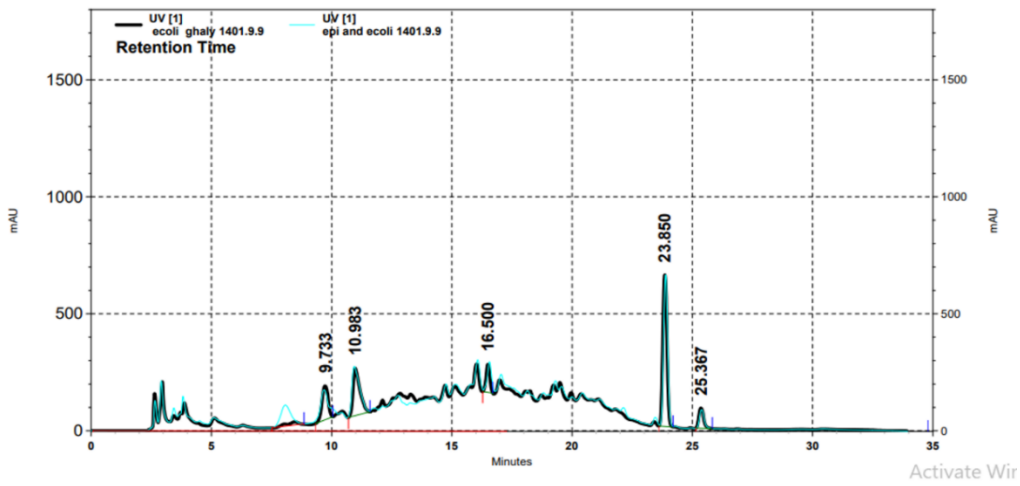
[۱۹] Retention time



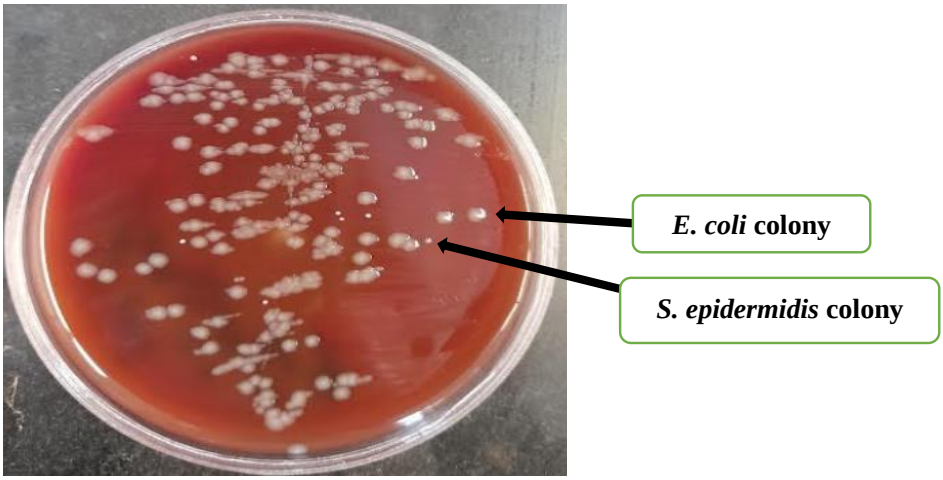
شکل۳: کروماتوگرام عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *شریشیاکلی*



شکل۴: انطباق کروماتوگرام عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تنها (کروماتوگرام آبی) و عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *شریشیاکلی* (کروماتوگرام سیاه)



شکل۵: انطباق کروماتوگرام عصاره کشت *اشریشیاکلی* تنها (کروماتوگرام سیاه) کروماتوگرام عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* (کروماتوگرام آبی).



شکل۶: کشت عصاره کوکالچر (رقت ۱/۱۰۶) *استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس* -*اشریشیاکلی* در محیط بلاد آگار

اثر ضدمیکروبی عصاره کوکالچر و فراکشن جدا شده از آن بر روی اشریشیاکلی

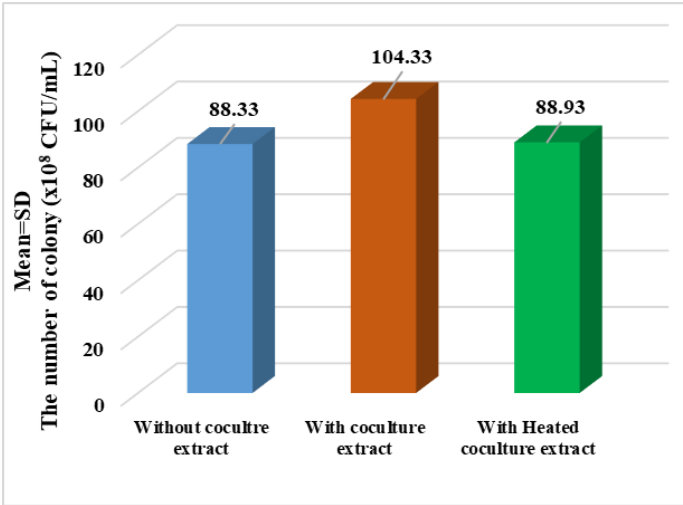
با انجام تست میکرودایلوژن براث، حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) عصاره خام و فیلتر شده کوکالچر و فراکشن (F2: RT8.083) بر روی باکتری *اشریشیاکلی* مورد بررسی قرار گرفت. ترکیبات فوق هیچ گونه اثر مهارکنندگی و کشندگی بر روی باکتری مد نظر نداشتند و مقادیر MIC و MBC بالاتر از ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱: اثر ضدمیکروبی عصاره کوکالچر و فراکشن F2: RT8.083 بر روی *اشریشیاکلی*

	حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) (µg/ml)	**حداقل غلظت کشندگی (MBC) (µg/ml)**
عصاره خام و فیلتر شده کوکالچر	>۵۰۰	>۵۰۰
فراکشن (F2: RT8.083)	>۵۰۰	>۵۰۰

تاثیر عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرومیدیس* – *اشریشیاکلی* بر میزان رشد *اشریشیاکلی*

نتایج نشان داد که رشد *اشریشیاکلی* در حضور عصاره خام و فیلتره کوکالچر *اشریشیاکلی- استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* افزایش می یابد. بطور میانگین تعداد کلونی های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* در حضور عصاره کوکالچر *اشریشیاکلی+ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در حجم ۱۰ میکرولیتر برابر با ۱۰۴/۳۳ ×۱۰^۸Cfu/ml شمارش گردید. تعداد کلونی های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* بدون حضور عصاره کوکالچر طور میانگین ۸۸/۳۳ ×۱۰^۸ Cfu/ml شمارش گردید. نتایج شمارش کلونی از رشد ***اشریشیاکلی* در حضور عصاره کوکالچر حرارت داده شده** تقریبا مشابه نتایج پلیت حاوی ***اشریشیاکلی* بدون حضور عصاره کوکالچر** بود.

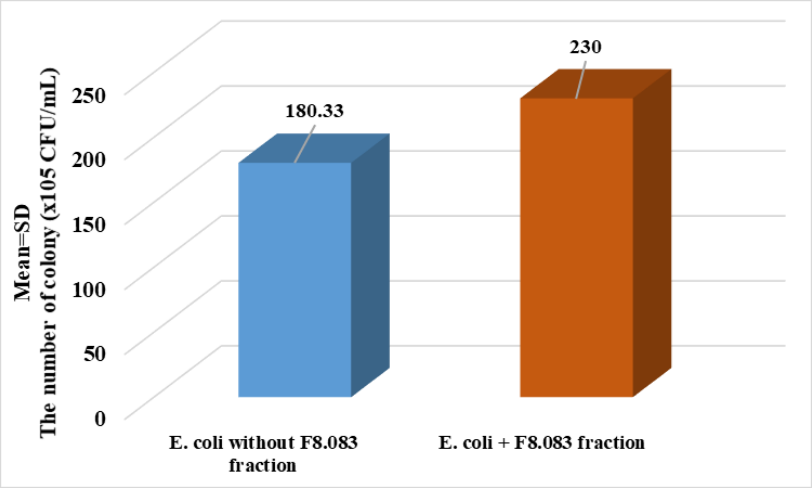


نمودار۱: تعداد کلونی‌های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* در حضور عصاره کوکالچر، عصاره کوکالچر حرارت دیده و بدون عصاره کوکالچر *اشریشیاکلی* با *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

تاثیر فراکشن (F2: RT8.083) پپتیدی جدا شده از عصاره کوکالچر بر میزان رشد *اشریشیاکلی*

بطور میانگین تعداد کلونی های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* در حضور فراکشن (F2: RT8.083) بدست آمده از کوکالچر *اشریشیاکلی+ استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، ۲۳۰× ۱۰۵ Cfu/ml کلونی شمارش گردید.

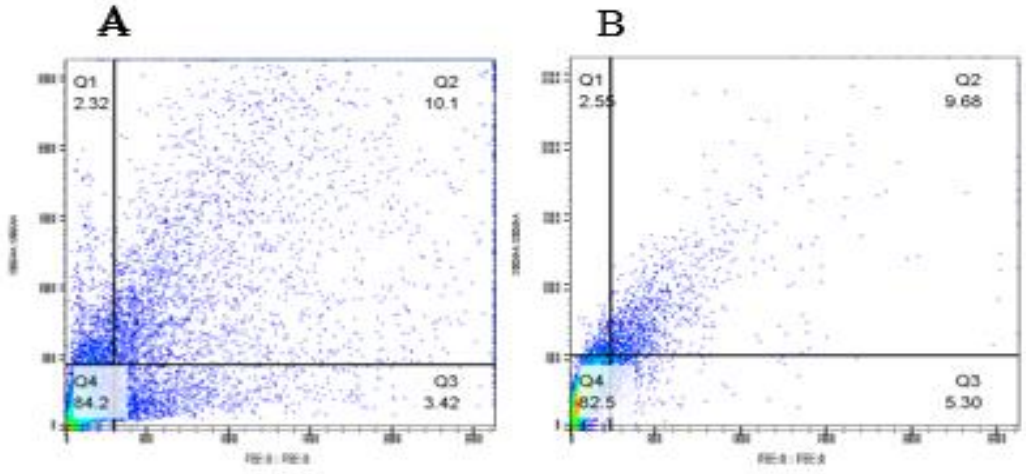
بطور میانگین تعداد کلونی های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* بدون حضور فراکشن (F2: RT8.083) ۱۸۰/۳۳×۱۰۵ Cfu/ml شمارش گردید. نتایج کلونی های شمارش شده در نمودار ۲ خلاصه شده است.



نمودار۲: تعداد کلونی‌های شمارش شده از رشد *اشریشیاکلی* در حضور و بدون حضور فراکشن F8. 083 جدا شده از عصاره کوکالچر *اشریشیاکلی* با *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*

نتایج فلوسایتومتری بررسی جمعیت سلولی *اشریشیاکلی* بعد از تاثیر فراکشن F2: RT8.083

نتایج بدست آمده از فلوسایتومتری نشان می‌دهد که در سلول‌های *اشریشیاکلی* تیمار نشده با فرکشن (کنترل)، ۸۲٪/۵ از سلولهای باکتری در Q4 قرار گرفته‌اند که نشان دهنده درصد سلولهای زنده در سوسپانسیون بدون فرکشن است. که حدود ۲/۵۵٪ از جمعیت سلول‌ها از Q4 به Q1 شیفت پیدا کرده اند و ۵/۳۰٪ و ۹/۶۸٪ از جمعیت سلولی به ترتیب به Q3 و Q2 شیفت پیدا کرده اند. در سلول‌های *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن F2: RT8.083 ، ۸۴/۲٪ از سلولهای باکتری در Q4 قرار گرفته‌اند که نشان دهنده درصد سلولهای زنده در سوسپانسیون تیمار شده با فرکشن است. ۲/۳۲٪ از سلول از Q4 به Q1 شیفت پیدا کرده اند و ۳/۴۲٪ و ۱۰/۱٪ از سلول‌های *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن به ترتیب به Q3 و Q2 شیفت پیدا کرده اند. (شکل ۷).



شکل۷: شمارش تعداد سلول های *اشریشیاکلی* در حضور فرکشن (RT8.083) و بدون حضور فرکشن به روش فلوسیتومتری با استفاده از رنگ PI. **A**) *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن RT8.083: F2 ، **B**) *اشریشیاکلی* بدون حضور فرکشن RT8.083: F2

بحث:

عفونت‌های دستگاه ادراری یکی از مشکلات بهداشت عمومی در جوامع امروزی هستند و توسط طیفی از عوامل بیماری‌زا بویژه اشریشیا کلی ایجاد می‌شوند. احتمال بالای عود عفونت و افزایش مقاومت ضد میکروبی در بین پاتوژن های ادراری، بار اقتصادی این عفونت ها را به شدت افزایش داده است. اغلب عفونت‌های ادراری به صورت عفونت‌های چند میکروبی اتفاق می افتند. (42). در این اکوسیستم چند میکروبی، باکتریها با ترشح انواع متابولیت‌های ثانویه در مهار یا تقویت رشد همدیگر اثر می گذارند.

در این مطالعه تولید متابولیت‌های ثانویه در کشت همزمان باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با *اشریشیاکلی* مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج اثر متابولیت های تولید شده بر روی باکتریها با استفاده از روش کوکالچر و فعالیت ضدمیکروبی بصورت MIC و MBC و شمارش کلونی به روش کلونی کانت در آگار پلیت و روش فلوسیتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* باعث افزایش رشد و افزایش تعداد کلونی های *اشریشیاکلی* در محیط کشت آگار پلیت می شود، به نظر می رسد متابولیت های تولید شده در کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* به عنوان فاکتور رشد برای *اشریشیاکلی* عمل می کنند. منشاء تولید و ماهیت ساختاری متابولیت های تقویت کننده رشد در عصاره دو باکتری فوق، دقیقا مشخص نیست و نیاز به بررسی دقیق تری دارد. نتیجه مهم این یافته، رشد بیش از حد باکتری *اشریشیاکلی* در حضور *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می‌باشد. هر چند این آزمایش در شرایط آزمایشگاهی اثبات شده، ولی در شرایط بالینی نیز وقوع آن امکانپذیر است. *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به عنوان باکتری فلور پوست و *اشریشیاکلی* از مهمترین پاتوژنهای ادراری محسوب می شوند، عفونت همزمان آنها در دستگاه ادراری احتمالا به تشدید عفونت *اشریشیاکلی* منجر خواهد شد. با این حال نیاز است در مدل حیوانی این موضوع با دقت بیشتری آزمایش گردد.

در آنالیز شیمیایی عصاره کوکالچر باکتری *اشریشیاکلی* با *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با سیستم HPLC، انواع مختلف فراکشن های پروتئینی شناسایی شدند (اشکال ۵-۱). فرکشن F2: RT8.083 مهمترین فراکشنی است که از عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* جدا شد. این فراکشن در عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (تنها) و *اشریشیاکلی*(تنها) تولید نشده بود. ممکن است وجود فرکشن F2: RT8.083 در محیط، عامل افزایش رشد باکتری *اشریشیاکلی* باشد. در کروماتوگرام عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (تنها)، یک فرکشن

پپتیدی در RT: 15.73 با دامنه mAU۱۵۰۰ قابل مشاهده است، در حالیکه دامنه این فرکشن در عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس -اشریشیاکلی* تا ۳۰۰ mAUکاهش پیدا کرده است، اختلاف دامنه در این روند کاهشی در حدود mAU۱۲۰۰ است که نشان می دهد *اشریشیاکلی* در کاهش بیان برخی ژنها وکاهش تولید برخی متابولیت‌های *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تاثیرگذار است. به نظر می رسد *اشریشیاکلی* بواسطه مصرف کردن و کاهش مقدار کمی فاکتورهای بیان ژنی در یک محیط مغذی یا بواسطه تولید فعالانه فاکتورهای مهار کننده بیان ژن باعث کاهش بیان برخی ژنها در *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* می شود. در شرایط آزمایشگاهی تولید فعالانه برخی فاکتورها توسط *اشریشیاکلی*، در کرماتوگرام عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* و کروماتوگرام عصاره کشت *اشریشیاکلی* (تنها) نشان داده شده است. فرکشن RT:24 در هر دو عصاره فوق که *اشریشیاکلی* حضور دارد، تولید شده است در حالیکه در کروماتوگرام عصاره کشت *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (تنها)، این فراکشن دیده نمی شود. به نظر می رسد این متابولیت فقط توسط *اشریشیاکلی* تولید می شود اما تاثیر آن در افزایش رشد یا مهار *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* مشخص نیست.

در بررسی فعالیت ضدمیکروبی فراکشن (F2: RT8.083) بر روی باکتری *اشریشیاکلی* تا غلظت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مقدار MIC مشخص نشد. اما مقایسه نتایج شمارش کلونی باکتریها در گروه تست (سوسپانسیون باکتری در حضور ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از فراکشن ها)، با گروه کنترل مثبت (سوسپانسیون باکتری بدون حضور فراکشن) نشان داد که در حضور فراکشن (F2: RT8.083) به دست آمده از عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس+ اشریشیاکلی*، تعداد کلونی‌های *اشریشیاکلی* افزایش می یابد. این یافته ها با نتایج بدست آمده از کشت عصاره خام کوکالچر با باکتریهای هدف مطابقت دارد. در این مطالعه ماهیت و ساختار شیمیایی فراکشن های پپتیدی جدا شده مورد بررسی واقع نشده است. در مطالعات مشابه همچون مطالعه Ana Flores و همکارانش در سال 2026، برهمکنش های بین میکروبی *انتروکوکوس فکالیس*، *اشریشیاکلی* و قارچ کاندیدا البیکنس در شرایط in vitro و in vivo با ایجاد مدل بالینی عفونت چند میکروبی در دستگاه ادراری در موش ارزیابی شده است. در این مطالعه نشان داده شده است که انتروکوکوس فکالیس با تولید انواع مدیاتورهای شیمیایی باعث افزایش رشد و تقویت کلونیزاسیون اشریشیاکلی در کنار قارچ کاندیدا البیکنس در دستگاه ادراری می شود. به عبارت دیگر در حضور مدیاتورهای انتروکوکوس فکالیس، شدت آنتاگونیسم اشریشیاکلی و قارچ کاندیدا البیکنس کاهش می یابد (43). در مطالعه دیگری موسی و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در آلمان، در بررسی متابولیت‌های تولید شده در کوکالچر *سودوموناس ائروژینوزا* با قارچ نشان دادند که در حالت کوکالچر متابولیت‌های بیشتری نسبت به کشت تکی آنها (کنترل) تولید می شود (37). در مطالعه Khalid و همکارانش در سال ۲۰۲۰ در عراق، در بررسی فعالیت ضدمیکروبی متابولیت های تولیده توسط *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* روی *اشریشیاکلی* بیماری‌زا به روش پلاگ آگار، هیچ فعالیت بازدارندگی برعلیه *اشریشیاکلی* مشاهده نکردند. این نتیجه با نتایج مطالعه ما مطابقت دارد (36).

در بررسی نتایج فلوسایتومتری *اشریشیاکلی*، در سلول‌های *اشریشیاکلی* تیمار نشده با فرکشن (کنترل) ۸۲٪/۵ از تجمع سلولی در Q4 قرار گرفته‌اند و ۲/۵۵٪ از جمعیت سلولی به سمت Q1 شیفت پیدا کرده‌اند که نشان دهنده‌ی سلول‌های مرده است. حدود ۵/۳٪ از جمعیت سلولی از Q4 به سمت Q3 شیفت پیدا کرده‌اند که بیانگر Agrigation یا ایجاد توده سلولی در سوسپانسیون است. در سوسپانسیون تیمار شده *اشریشیاکلی* با فرکشن F2: RT8.083 در Q4، ۸۴/۲٪ جمعیت سلولی قرار گرفته‌اند که اشاره به جمعیت سلول‌های زنده دارد که در مقایسه با سوسپانسیون *اشریشیاکلی* تیمار نشده با فرکشن (کنترل) حدود ۲٪ افزایش نشان می‌دهد. در سوسپانسیون *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن، حدود ۲/۳۲٪ از جمعیت سلولی با شیفت از Q4 به Q1 به عنوان سلول‌های مرده شمارش شده اند. همچنین در سوسپانسیون *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن، شمارش ۳/۴۲٪ از جمعیت سلولی در Q3 بیانگر میزان Agrigation سلول‌های *اشریشیاکلی* هست که در مقایسه با سوسپانسیون کنترل با اختلاف بسیا کمی پایین‌تر است. اما نقطه‌ای که در Q3 در سوسپانسیون *اشریشیاکلی* تیمار شده دیده می‌شود اندازه Agrigation سلولی بسیار بزرگتر از نمونه کنترل است که در شکل ۷ به خوبی مشخص است. بطور کلی تعداد سلولهای شمارش شده با روش فلوسیتومتری در *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن F2: RT8.083 ۴۲۳۷۹ عدد است که در مقایسه با تعداد ۱۰۰۰۰ سلول شمارش شده از *اشریشیاکلی* تیمار نشده (کنترل) بخوبی مشخص است که تعداد سلولهای زنده در *اشریشیاکلی* تیمار شده با فرکشن F2: RT8.083 بسیار

بیشتر از تعداد سلولهای *اشریشیاکلی* تیمار نشده (کنترل) با فرکشن است. این نشان دهنده تاثیر مثبت عصاره کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در رشد *اشریشیاکلی* است.

با توجه به اینکه رنگ فلورسنت پروپیدیوم یدید (PI) بطور کلی یه رنگ شاخص در رنگ آمیزی DNA سلولهای مرده محسوب می شود، اطمینان از تعداد دقیق سلولهای زنده بر پایه پروپیدیوم یدید بحث برانگیز خواهد بود، هر چند در مطالعات مختلف رنگ آمیزی سلولهای زنده باکتری با رنگ فلورسنت پروپیدیوم یدید در فازهای مختلف رشد از جمله مراحل اولیه فاز لگاریتمی[۲۰] و ابتدای فاز سکون[۲۱] به اثبات رسیده است (۴۴). رنگ های فلورسنت SYTO 9 (۴۵) و ۶,۴′-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (۴۶) در رنگ آمیزی سلولهای زنده باکتریها بسیار موثر هستند. این رنگ ها براحتی از غشای سیتوپلاسمی سلولهای زنده عبور می کنند و با اتصال به DNA باکتری، سلول را رنگ آمیری و نشاندار می کنند. استفاده همزمان هر کدام از این رنگ ها با پروپیدیوم یدید به عنوان رنگ کنتراست در افتراق بین سلولهای زنده و مرده، شمارش سلولی در باکتریها را دقیق تر خواهد کرد.

مطالعه برهمکنش باکتریها در تولید انواع متابولیت های مهاری بویژه باکتریوسین ها یا با شناسایی متابولیت های افزایش دهنده رشد باکتریها با استفاده از کشت کوکالچر، استراتژی جدیدی از مبارزه بیولوژیک است که در مقابله با پاتوژنهای بیماریزا و پیشگیری از عفونت های همزمان باکتریها می توان استفاده کرد.

نتیجه گیری:

اثر تقویتی عصاره کوکالچر باکتری *اشریشیاکلی* با *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بر روی رشد *اشریشیاکلی* نشان داده شد. عصاره خام کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* و فراکشن پپتیدی (RT8.083: F2) جدا شده از کوکالچر *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس- اشریشیاکلی* به ترتیب ۱۸ درصد و ۲۸ درصد باعث افزایش تعداد کلونی های *اشریشیاکلی* می شوند. یافته‌ها نشان‌دهنده احتمال اثر تحریک‌کننده برخی اجزای حاصل از کوکالچر بر رشد *اشریشیاکلی* در شرایط آزمایشگاهی هستند و بررسی بیشتر مکانیسم این اثر و اهمیت بالینی احتمالی آن ضروری است.

تشکر و قدردانی:

این مطالعه بخشی از پروژه پایان نامه کارشناسی ارشد(کد اخلاق پایان نامه: IR.UMSU.REC.1401.007) رشته میکروب شناسی پزشکی است. از دانشگاه علوم پزشکی ارومیه به جهت فراهم کردن بودجه و امکانات آزمایشگاهی مورد نیاز انجام این پروژه، تشکر می کنیم. از مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز که در تسهیل انجام آنالیزهای HPLC کمک کردند، تشکر و قدردانی می کنیم.

[۲۰] Exponential phase
[۲۱] Stationary phase

REFERENCE

1. Reyes-Martinez P, Sierra-Diaz E, Ortiz-Lazareno PC, Garcia-Gutierrez M, Ramírez-de-Arellano A, Sandoval-Pinto E, et al. Microbiological profile and epidemiological perspective on urinary tract infections (UTIs) in a tertiary medical center in Western Mexico. Frontiers in Microbiology [Internet]. 2026 Jan 29 [cited 2026 Sept 30];17. Available from: https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2026.1734551/full
2. Ajabnoor A, Thabit A, Alharbi O, Ibrahem K, Asiri T, Al-Ghamdi A, et al. Epidemiology of Urinary Pathogens and Antibiotic Resistance Trends: A Retrospective Analysis Stratified by Age and Sex from a Large Tertiary Hospital in Saudi Arabia. Infection and Drug Resistance. 2026 Apr;Volume 19:1–15.
3. BROGDEN K, GUTHMILLER J, TAYLOR C. Human polymicrobial infections. The Lancet. 2005 Jan 15;365(9455):253–5.
4. De Wit G, Svet L, Lories B, Steenackers HP. Microbial Interspecies Interactions and Their Impact on the Emergence and Spread of Antimicrobial Resistance. Annual Review of Microbiology. 2022 Sept 8;76(1):179–92.
5. Baishya J, Bisht K, Rimbey JN, Yihunie KD, Islam S, Al Mahmud H, Waller JE, Wakeman CA. The Impact of Intraspecies and Interspecies Bacterial Interactions on Disease Outcome. Pathogens. 2021 Jan 21;10(2):96. doi: 10.3390/pathogens10020096. PMID: 33494265; PMCID: PMC7909810.
6. Muzafar S, Nair RR, Andersson DI, Warsi OM. The strength of interspecies interaction in a microbial community determines its susceptibility to invasion. Bank C, editor. PLOS Biology [Internet]. 2024 Nov 7 [cited 2026 Sept 30];22(11):e3002889. Available from: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11575764/
7. Su Y, Ding T. Targeting microbial quorum sensing: the next frontier to hinder bacterial driven gastrointestinal infections. Gut Microbes. 2023 Dec;15(2):2252780. doi: 10.1080/19490976.2023.2252780. PMID: 37680117; PMCID: PMC10486307.
8. Fons AGTKM. Mechanisms of Colonisation and Colonisation Resistance of the Digestive Tract Part 2: Bacteria/Bacteria Interactions. Microbial Ecology in Health and Disease. 2000;12(2):240-6.
9- Shahin K, Wang L, He Z, Lv B, Van Alin A, Lo-Man R, Wu H, Sansonetti P, Collard JM. A metabolite-dependent mechanism by which Bifidobacterium animalis subsp. lactis promotes Bacteroides colonization. Gut Microbes. 2026 Dec 31;18(1):2696647. doi: 10.1080/19490976.2026.2696647. Epub 2026 Jul 7. PMID: 42415234; PMCID: PMC13348967.
10. Wintermute EH, Silver PA. Emergent cooperation in microbial metabolism. Molecular Systems Biology. 2010 Jan;6(1):407.
11- Guo Y, Li Y, Sun Y, Fan Y, Hang G, Kwok LY, et al. The effect of Lactococcus lactis subsp. lactis on the survival rate and metabolic dynamics of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in co-fermented milk. Food Research International. 2026 Feb;225:118041.
12- Zeybek N, Rastall RA, Buyukkileci AO. Utilization of xylan-type polysaccharides in co-culture fermentations of Bifidobacterium and Bacteroides species. Carbohydr Polym. 2020 May 15;236:116076. doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116076. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32172889.
13- Sadiq FA, De Reu K, Yang N, Burmølle M, Heyndrickx M. Interspecies interactions in dairy biofilms drive community structure and response against cleaning and disinfection. Biofilm. 2024 June;7:100195.
14. Ehlers S, Merrill SA. *Staphylococcus saprophyticus* Infection. 2023 Jun 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29493989.

15. Kline KA, Lewis AL. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. Microbiology spectrum. 2016;4(2).
16. Walker JN, Flores-Mireles AL, Pinkner CL, Schreiber HL, Joens MS, Park AM, et al. Catheterization alters bladder ecology to potentiate Staphylococcus aureus infection of the urinary tract. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2017 Sept 25;114(41).
17. Ballén V, Ratia C, Cepas V, Soto SM. *Enterococcus faecalis* inhibits *Klebsiella pneumoniae* growth in polymicrobial biofilms in a glucose-enriched medium. Biofouling. 2020;36(7):846-61.
18. Jang IT, Yang M, Kim HJ, Park JK. Novel Cytoplasmic Bacteriocin Compounds Derived from Staphylococcus epidermidis Selectively Kill Staphylococcus aureus, Including Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA). Pathogens. 2020 Jan 30;9(2):87.
19. Al-Thubiani ASA, Maher YA, Fathi A, Abourehab MAS, Alarjah M, Khan MSA, et al. Identification and characterization of a novel antimicrobial peptide compound produced by Bacillus megaterium strain isolated from oral microflora. Saudi pharmaceutical journal : SPJ : the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society. 2018;26(8):1089-97.
20. Kapoore RV, Padmaperuma G, Maneein S, Vaidyanathan S. Co-culturing microbial consortia: approaches for applications in biomanufacturing and bioprocessing. Critical Reviews in Biotechnology. 2021 May 12;42(1):46–72.
21. Xuyen Thi Vo, Mi Kieu Thi Ngo, Nam Duc Truong, Thao Van Ho4 and Nhut Nhu Nguyen. Co-culturing potassium-solubilizing bacteria in a common liquid medium for the development of a consortium fertilizer formulation. Bulgarian Journal of Agricultural Science. 2025;31(6): 1155–1165.
22. Gasparek M, Steel H, Papachristodoulou A. Deciphering mechanisms of production of natural compounds using inducer-producer microbial consortia. Biotechnology Advances. 2023 May;64:108117.
23. Rademacher A, Ekat K, Skusa R, Scharnagl L, Knipp F, Warnke C, et al. Bacterial factors required for biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* are linked to contact activation. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2026 Apr 14;16.
24. Au S, Cruz WD, Lala M, Karthikeyan S, Venketaraman V. The Evolution of Symbiosis in Staphylococcus epidermidis: From a Protective Mutualist to a Parasitic Pathogen. Biomolecules. 2026; 16(2):334. https://doi.org/10.3390/biom16020334.
25. Otto M. Phenol-soluble modulins. International journal of medical microbiology : IJMM [Internet]. 2014 Mar 1 [cited 2026 Sept 30];304(2):164–9. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4014003/
26. Allgaier H, Jung G, Werner RG, Schneider U, Zähner H. Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. European journal of biochemistry. 1986;160(1):9-22.
27. van de Kamp M, Horstink LM, van den Hooven HW, Konings RN, Hilbers CW, Frey A, et al. Sequence analysis by NMR spectroscopy of the peptide lantibiotic epilancin K7 from *Staphylococcus epidermidis* K7. European journal of biochemistry. 1995;227(3):757-71.
28. Ekkelenkamp MB, Hanssen M, Danny Hsu ST, de Jong A, Milatovic D, Verhoef J, et al. Isolation and structural characterization of epilancin 15X, a novel lantibiotic from a clinical strain of *Staphylococcus epidermidis*. FEBS Letters [Internet]. 2005 Feb 24 [cited 2026 Sept 30];579(9):1917–22. Available from: https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1016/j.febslet.2005.01.083.
29. Sugimoto S, Iwamoto T, Takada K, Okuda K, Tajima A, Iwase T, et al. *Staphylococcus epidermidis* Esp degrades specific proteins associated with Staphylococcus aureus biofilm formation and host-pathogen interaction. Journal of bacteriology. 2013;195(8):1645-55.
30. Wang Y, Kuo S, Shu M, Yu J, Huang S, Dai A, et al. *Staphylococcus epidermidis* in the human skin microbiome mediates fermentation to inhibit the growth of Propionibacterium acnes: implications of probiotics in acne vulgaris. Applied microbiology and biotechnology. 2014;98(1):411-24.
31. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. Escherichia coli in Europe: an overview. International journal of environmental research and public health. 2013;10(12):6235-54.
32. Grome HN, Brandenburg JM, Kent AG, Curtis L, Raymond RE, Ansari U, et al. Extraintestinal Invasive Escherichia coli Infections in the US. JAMA Network Open. 2026 Feb 2;9(2):e2557201.

33. Tchesnokova V, Choudhury D, Larson L, Basova I, Sledneva Y, Bonilla TC, et al. Gut *E. coli* profiles as prospective predictors of UTI risk and antibiotic susceptibility. Communications Medicine. 2026 Aug 27;.
34. Palupi MF, Wibawan IWT, Sudarnika E, Maheshwari H, Darusman HS. Prevalence of Mcr-1 Colistin Resistance Gene in *Escherichia Coli* Along Broiler Meat Supply Chain in Indonesia. Biotropia. 2019;26(2).
35. Akbari R, Hakemi Vala M, Hashemi A, Aghazadeh H, Sabatier JM, Pooshang Bagheri K. Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. Amino acids. 2018;50(9):1231-43.
36. Luti KJK. Bacteriocin production by Staphylococcus epidermidis the normal flora of outer ear: a potential probiotic against outer ear infections. Journal of Biotech Research. 2020;11:13-22.
37. Allahghadry T, Bojesen AM, Whitehead BJ, Antenucci F. Clarification of large-volume bacterial cultures using a centrifuge-free protocol. Journal of Applied Microbiology. 2022 Aug 1;133(2):870–82.
38. Mahrous M Al. Purification and Characterization of 221, the Cationic Peptide that Inhibits *Staphylococcus aureus*. Journal of Microbiology & Experimentation. 2017 July 24;5(3).
39. Barbara L. Zimmer. M07Ed12E Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 12th Edition. 2024. Available at: https://clsi.org/shop/standards/m07/
40. Moussa M, Ebrahim W, Kalscheuer R, Liu Z, Proksch P. Co-culture of the bacterium Pseudomonas aeruginosa with the fungus Fusarium tricinctum induces bacterial antifungal and quorum sensing signaling molecules. Phytochemistry Letters. 2020;36:37-41.
41. Akbari R, Hakemi Vala M, Hashemi A, Aghazadeh H, Sabatier JM, Pooshang Bagheri K. Action mechanism of melittin-derived antimicrobial peptides, MDP1 and MDP2, de novo designed against multidrug resistant bacteria. Amino acids. 2018;50(9):1231-43.
42. Bonkat G, Burgos JG, Ruepp R, Browne K. The European Association of Urology Guidelines on Urological Infections: Bridging Regulatory Strategy with Proactive Clinical Leadership. European Urology Focus. 2026 Mar;12(2):297–8.
43. Flores-Mireles A, Wongso E, Molina J, Gibbon A. Calling a Truce: *Enterococcus faecalis* as a mediator between *E. coli* and *C. albicans* during polymicrobial CAUTIs. Res Sq [Preprint]. 2026 May 7:rs.3.rs-9545567. doi: 10.21203/rs.3.rs-9545567/v1. PMID: 42147172; PMCID: PMC13174776.
44. Shi L, Günther S, Hübschmann T, Wick LY, Harms H, Müller S. Limits of propidium iodide as a cell viability indicator for environmental bacteria. Cytometry Part A. 2007 Apr 9;71A(8):592–8.
45. Wilkinson MG. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. Trends in Food Science & Technology. 2018 Aug;78:1–10.
46. López-Gálvez J, Schiessl K, Besmer MD, Bruckmann C, Harms H, Müller S. Development of an automated online flow cytometry method to quantify cell density and fingerprint bacterial communities. Cells [Internet]. 2023 Jan 1 [cited 2026 Oct 14];12(12):1559. Available from: https://www.mdpi.com/2073-4409/12/12/1559.