بررسی اثر باکتری پروبیوتیک *E. coli Nissle 1917* بر شکل‌گیری بیوفیلم ناشی از سویه‌های بالینی *سودوموناس آئروژینوزا* و ارزیابی بیان ژن‌های *algD* و *PpyR* به منظور جلوگیری از تشکیل بیوفیلم

محدثه فرنقی‌زاد[۱]، یاسمن عیسی‌زاده[۲]، سروناز فلسفی[۳]، آوا بهروزی[٤*]

۱-کارشناسی ارشد،گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۲-کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

۳-استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

٤-استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

ava.behrouzi@gmail.com

*صندوق‌پستی: ۱۹۳۹۵۱٤۹٥٤، شهر تهران ایران

دریافت: ۱٤۰۱/۰۲/۲٤ پذیرش: ۱٤۰۲/۰۱/۲۱

چکیده

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مهم‌ترین عوامل عفونت در پز شکی مح سوب می شود که در سال‌های اخیر جزء باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها شناخته شده ا ست. یکی از ا ستراتژی‌های اصلی مقاومت این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها بیان دو ژن *algD* و *PpyR* برای تشکیل بیوفیلم می‌باشد. همچنین، در سال‌های اخیر نشان داده شده است،استفاده از میکروارگانیسم‌ها از جمله پروبیوتیک‌ها یکی از روش‌های مهار باکتری‌های پاتوژن ا ست. از این‌رو، در این مطالعه برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری *P. aeruginosa* از باکتری پروبیوتیک *E.coli Nissle 1917(EcN)* به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی جدید استفاده شد. از آنجایی‌که ارتباط مستقیمی میان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و بیوفیلم‌زایی وجود دارد، سویه‌هایی با بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی تو سط ت ست آنتی‌بیوگرام انتخاب شدند. سپس، برای تعیین میزان بازدارندگی باکتری *EcN* در تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری *P. aeruginosa* تست بیوفیلم‌زایی انجام شد و در انتها برای ارزیابی بیان دو ژن کلیدی (*algD* و *PpyR*) دخیل در تشکیل بیوفیلم، در حضور باکتری پروبیوتیک *EcN* از روش Real- time PCR استفاده شد. بر ا ساس نتایج ت ست بیوفیلم‌زایی، باکتری *EcN* اثر بازدارندگی بالایی در ت شکیل بیوفیلم نا شی از باکتری *P. aeruginosa* نشان داد. همچنین، در ارزیابی بیان دو ژن *algD* و *PpyR* در حضور پروبیوتیک *EcN* کاهش معنی‌داری در بیان ژن *PpyR* نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد پروبیوتیک*EcN* می‌تواند به‌عنوان یکی از گزینه‌های درمانی جدید و مناسب برای کاهش بیوفیلم‌زایی *P. aeruginosa* عمل کند.

کلید واژگان: بیوفیلم، *E. coli Nissle 1917*، پروبیوتیک، *Pseudomonas aeruginosa*.

۱-مقدمه

باکتری *P. aeruginosa* باسیل گرم منفی، هوازی و فرصت طلب از خانواده سودومو ناسه و عضوی از γ-proteobacteria است [۱]. این پاتوژن عامل اکثر عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در افراد دچار زخم‌های سوختگی، افراد دارای نقص ایمنی و بیماران بستری در بخش‌های ICU است و یکی از مهمترین عوامل افزایش مرگ‌ومیر این بیماران محسوب می‌شود. از نظر اپیدمیولوژی این باکتری عامل اکثر عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود و به‌علت ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، درمان را مشکل ساخته و موجب افزایش هزینه درمان و افزایش مرگ‌ومیر بیماران در زمان بستری می‌شود. این باکتری فاکتورهای بیماری‌زایی مختلفی شامل، لیپوپلی ساکارید(LPS)، فلاژل نوع ٤، پیلی، اگزوتوکسین A، سیستم ترشحی نوع ۳ و ٦، پروتئاز و آلژینات دارد[۱۱و۱]. از مهمترین این فاکتورها می‌توان به ایجاد بیوفیلم اشاره کرد. توانایی تشکیل بیوفیلم در *P. aeruginosa*، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، زنده ماندن در شرایط سخت محیطی و فرار از سیستم ایمنی بدن را منجر می شود[۳]. بیوفیلم مجموعه‌ی میکروبی، شامل کلنی‌های میکروبی احاطه شده توسط ماتریکس پلی‌ساکاریدی خارج سلولی است، که توسط باکتری تولید می‌شود. ژن‌های متعددی از جمله، pslA، pelA، algU، algD، algL و ppyR در تولید بیوفیلم ناشی از این باکتری نقش دارند[۲]. آلژینات یکی از مهمترین فاکتورهای تولید کننده بیوفیلم است که توسط ژن کد کننده کپسول آلژیناتی یا *algD* تولید می‌شود و باعث ایجاد قابلیت چسبندگی در *P. aeruginosa* می‌شود و همچنین منجر به کاهش قابلیت ذرهخواری باکتری توسط سلولهای میزبان می شود[۱]. یکی دیگر از ژن‌های مؤثر در شدت بیماری‌زایی و تولید بیوفیلم *P. aeruginosa*، ژن *PpyR* است، که با افزایش تولید اگزوپلی ساکاریدها و پیووردین (یک سیدروفور که سه فاکتور بیماری‌زایی اندوتوکسین A، الاستاز را کنترل می‌کند به همین دلیل اهمیت زیادی در بیماری‌زایی *P. aeruginosa* دارد) منجر به افزایش تولید بیوفیلم می‌شود[٤].

استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای کنترل رشد یکدیگر یکی از روش‌های مهار میکروارگانیسم های پاتوژن است، در این میان مطالعات زیادی در خصوص نقش میکروارگانیسم‌ها یا باکتری‌های پروبیوتیک بر عوامل پاتوژن انجام شده است. پروبیوتیک‌ها اثرات مفید خود را از طریق تغییر pH روده، کاهش نفوذ پذیری مخاط روده و حمله به میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا با تولید موادی مانند: اسید لاکتیک ، باکتریوسین‌ها و دفنسین‌ها و تعدیل پاسخ ایمنی میزبان اعمال می‌کنند[۵].

باکتری *E. coli* Nissle 1917 (EcN) به‌عنوان یکی از پروبیوتیک‌های مورد مصرف است که در درمان عفونت‌ها یا بیماری‌های التهابی روده از جمله، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون در بزرگسالان و نیز التهاب حاد روده در کودکان مؤثر می‌باشد[٦].

این باکتری برای اولین بار در سال ۱۹۱۷ در مدفوع یک سرباز آلمانی که به بیماری اسهال مقاوم و ایمن بود، شناسایی شد. از خواص باکتری *EcN* توانایی رقابت با باکتری بیماری‌زا در روده است. این رقابت از طریق آزادسازی فاکتورهای ازبین برندهی باکتری، میکروسین H47 و میکروسین M رخ می‌دهد که هر دو فاکتور گیرنده های جذب آهن در سایر باکتری‌های روده را تشخیص می‌دهند و از این طریق وارد سیتوپلاسم شده و منجر به مرگ باکتری‌های پاتوژن می‌شوند[۲۱و٦].

با توجه به مطالب بیان شده در ارتباط با وجود مقاومت‌های گسترده طیف آنتی‌بیوتیکی که در دهه‌های اخیر باعث ایجاد معضلات و مشکلات بزرگی در روند درمان بیماران شده است که افزایش هزینه درمان و افزایش مرگ‌ومیر بیماران در زمان بستری شده را سبب شده است. پژوهش‌های زیادی در رابطه با درمان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و جلوگیری از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی ناشی از باکتری‌های پاتوژن انجام شده است.

در تحقیقات انجام شده محققان، به تأثیر مثبت پروبیوتیک‌ها در درمان بسیاری از بیماری‌ها و همچنین کاهش اثر ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، توسط باکتری‌های پاتوژن نظیر *P. aeruginosa* پی بردند. به همین دلیل، با توجه به ضرورت درمان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین با توجه به اثرات مفید *E. coli Nissle1917*، در پژوهش حاضر از این سویه، به‌عنوان یک عامل دارویی جدید برای بررسی امکان جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* استفاده شد و تغییرات در سطح بیان ژن‌های *algD* و *PpyR*، به‌عنوان ژن‌های دارای نقش اساسی در تشکیل بیوفیلم ارزیابی شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* و تعیین مقاومت آنتی‌بیوتیکی

در این مطالعه از ۵۰ سویه *P. aeruginosa* جدا شده از نمونههای بالینی بیماران استفاده شد. پس از انجام تست های تائیدی، برای انجام تست آنتی‌بیوگرام سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* از آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان شامل، آمیکاسین (AMK)، جنتامایسین (GEN)، سفتازیدیم (CAZ)، سفوتاکسیم (CTX)، سیپروفلوکساسین (CIP)، ایمی‌پنم (IPN)، کلیستین، پیپراسیلین(PIP) و توبرامایسین (TOB) استفاده شد. از میان سویه‌های مورد ارزیابی، سویه‌هایی با بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی برای ارزیابی‌های بعدی انتخاب شد.

۲-۲ سویه باکتریایی *E. coli Nissle1917* و محیط کشت

برای تهیه سویه باکتریایی پروبیوتیک *E. coli Nissle1917* از قرص Mutaflor ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای کشت این سویه ابتدا مقداری از محتویات داخل کپسول به محیط کشت LB Broth انتقال داده شد و پس از ۲٤ ساعت انکوبه کردن در دمای اپتیمم ۳۷ درجه سانتی‌گراد این سوسپانسیون به محیط کشت LB Agar انتقال داده شد و در دمای اپتیمم ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شد. برای تایید سویه مورد نظر از رنگ‌آمیزی گرم و تست تشخیصی گالری استفاده شد.

۲-۳ تهیه مایع رویی باکتریایی

برای تهیه مایع رویی باکتریایی ابتدا سوسپانسیونی معادل سه غلظت McFarland ۰/۵، ۱ و ۳ تهیه شد. سپس، سوسپانسیون در دور rpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریوفیوژ شد و مایع رویی از فیلتر ۰/۲ میکرون برای جداسازی کامل بیوماس سولی، عبور داده شد.

۲-٤ بیوفیلم زایی

پس از شناسایی سویه‌های مقاوم *P. aeruginosa*، از پلیت ۹٦ خانه برای بررسی تشکیل بیوفیلم استفاده شد. سویه‌های *P. aeruginosa* با غلظتی معادل McFarland ۰/۵ در مجاورت با سه غلظت ۰/ ۵، ۱ و ۳ مایع رویی پروبیوتیک *E. coli Nissle1917* قرار داده شد و پس از ۲٤ ساعت انکوباسیون، پلیت از انکوباتور خارج شد. سپس، پلیت وارونه شد و محیط اضافی خارج شد. با استفاده از مولتی چنل سه مرتبه و هر بار با λ ۳۰۰ سرم فیزیولوژی فرآیند شست و شو انجام داده شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه به‌صورت واژگون قرار داده شد تا خشک شود. سپس، λ ۱۰۰ از رنگ کریستال ویوله به هر چاهک اضافه شد. پلیت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه پلیت را وارونه کرده و رنگ اضافی خارج شد و مجددا سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد،

سپس، λ ۱۲۵ اسید استیک به هر چاهک اضافه شد و پلیت به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس، یک پلیت جدید برداشته شد و از هر چاهک بعد از پیپتاژ کامل λ ۱۰۰ به پلیت جدید منتقل شد.

در آخر مقدار OD هر چاهک در طول موج ۶۲۰ قرائت شد. این آزمایش با کنترل (*P. aeruginosa* و محیط کشت خالی) انجام شد.

۲-۵ میکروسکوپ الکترونی

برای تصویر برداری از تجمع باکتری *P. aeruginosa* در حالت بیوفیلم و تاثیر مایع رویی EcN برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم نمونه برای تصویربرداری میکروسکوپ FE-SEM تهیه شد و پس از پوشش دهی با طلا، تصویر برداری انجام شد.

۲-۶ استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام Real- time PCR

در ابتدا استخراج RNA از سویه‌های بالینی توسط محلول Rnx شرکت سیناکلون ساخت کشور ایران برپایه روش فنل-کلروفرم انجام شد. سپس، سنتز cDNA توسط پروتکل کیت تاکارا ساخت کشور ژاپن انجام شد. برای این کار، بافر 5X Prime Script در حجم ۲ میکرولیتر، آنزیم RT در حجم ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر الیگو dT و پرایمرهای رندوم هگزامر در حجم ۰/۵ ماکرولیتر به RNA (در غلظت ۵۰۰ میکروگرم) در مخلوط واکنش اضافه شد و سپس تمامی ترکیبات برای سنتز cDNA در واکنش دمایی ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در نهایت برای غیر فعال کردن آنزیم ریورس ترنسکریپتاز (برای ممانعت از ایجاد اختلال در واکنش Real-Time PCR) در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ثانیه طبق دستورالعمل کیت قرار گرفت. برای ارزیابی بیان دو ژن *algD* و *PpyR*، از تکنیک Real- time PCR بر پایه روش سایبرگرین استفاده شد .

قابل ذکر است که در این تکنیک از پرایمر ژن 16srRNA به‌عنوان ژن رفرنس استفاده شد.

در تکنیک Real- time PCR از TB Green Premix Ex Taq II (2x)، پرایمر فوروارد و پرایمر ریورس و محلول واکنش RT طبق دستور بروشور کیت استفاده شد و واکنش‌ها به‌ترتیب در دماهای زیر انجام شد:

مرحله Pre incubation (۹۵)، مرحله Denature (۹۵ درجه سانتی‌گراد)، مرحله Anneling (۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد) و مرحله Extension (۷۲ درجه سانتی‌گراد).

پرایمرهای مورد استفاده در واکنش طبق جدول ۱ می‌باشد:

جدول ۱ پرایمرهای مورد نیاز برای Real-Time PCR

ژن‌ها	فوروارد	ریورس
algD (۱۸)	5- GCGACCTGGACCTGGGCT -3	5- TCCTCGATCAGCGGGATC -3
ppyR (۱۹)	5- CGTGATCGCCGCCTATTTCC -3	5- ACAGCAGACCTCCCAACCG -3
16srRNA (۲۰)	5- GAGGAAGTTGGGGATGACGT -3	5- AGGCCCGGGAACGTATTCAC -3

۲-۷ آنالیز آماری

در این مطالعه، تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌ها توسط نرم‌افزار graph pad انجام شد. برای ارزیابی‌های بیان ژن از آزمون t-test و One Way ANOVA استفاده شد و داده‌هایی با *p value* کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار گزارش شد.

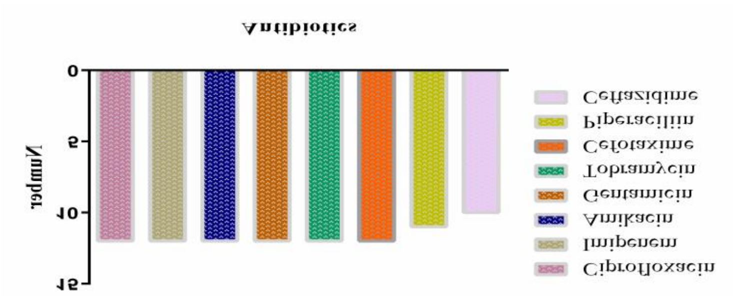
۳-نتایج

۳-۱ آنتی‌بیوگرام

از میان ۵۰ ســـویه بالینی مورد بررســـی توســـط تســـت آنتی‌بیوگرام، تعداد ۱۲ ســـویه یالینی با بیشـــترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به دارو های خط درمان، انتخاب شـــدند (شـــکل ۱) از آنجایی‌که ارتباط مســـتقیمی میان مقاومت‌های چند دارویی و ایجاد بیوفیلم گزارش شـــده است، سویه‌هایی با بیشترین میزان مقاومت برای پژوهش حاضر انتخاب شدند. [۹-۷].

همانطور که در شـکل ۲ نشـان داده شـده اسـت، بررسـی نتایج مقاومت در ســـویه های انتخاب شـــده در برابر آنتی‌بیوتیک‌های مختلف نشـــان داد که، همه ۱۲ ســـویه‌ی انتخابی به آنتی‌بیوتیک‌های سـیپروفلوکســاسـین، ایمی‌پنم، آمیکاســین، جنتامایســین، توبرامایســین و ســفوتاکســیم مقاومت داشــتند در حالی‌که در مورد ســفتازیدیم، تنها ۱۰ ســویه از ۱۲ ســویه مورد مطالعه به‌عنوان مقاوم شــناخته شدند و ۲ سویه دیگر حساس به این آنتی‌بیوتیک بودند و همچنین در مورد پیپراســیلین، ۱۱ ســویه مقاوم شــناخته شـدند و تنها یک سـویه نیمه حسـاس به این آنتی‌بیوتیک بود (شکل ۲).

شکل ۱ نتایج تست آنتی‌بیوگرام؛ بررسی میزان مقاومت سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان و انتخاب ۱۲ سویه با بالاترین میزان مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌های خط اول درمان



شکل ۲ نتایج آنتی‌بیوگرام؛ با توجه به نتایج آنتی‌بیوگرام از میان ۵۰ سویه *سودوموناس آئروژینوزا* ۱۲ سویه با بیشترین میزان مقاومت برای ایجاد بیوفیلم زایی و ارزیابی اثر پروبیوتیک در روند بیوفیلم زایی انتخاب شدند.

۳-۲ بیوفیلم زایی

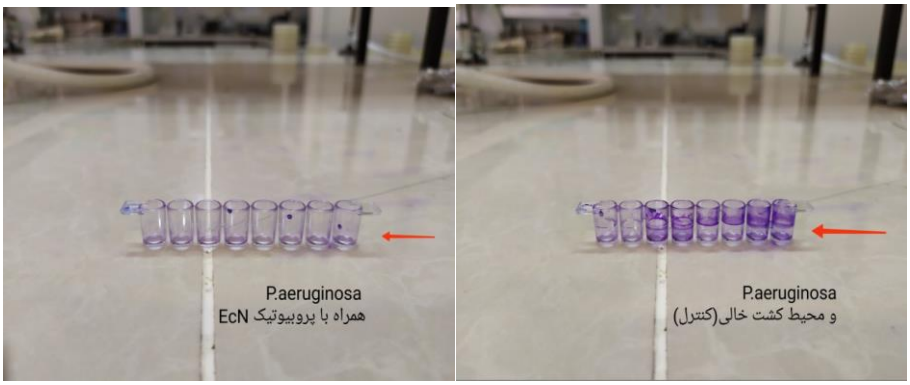
با توجه به ارزیابی‌های صورت گرفته علی رغم شکل‌گیری بیوفیلم پرقدرت توســـط *P. aeruginosa*، ســـویه‌ها در حضـــور *EcN* به‌عنوان پروبیوتیک مورد اســـتفاده، قدرت تشکیل بیوفیلم کمتری را از خود نشان دادند و در برخی سویه‌ها در حضور پروبیوتیک به میزان قابل ملاحظه‌ای از

تشکیل بیوفیلم ممانعت کردند. به‌عنوان مثال، در شکل ۳ (تصویر سمت چپ) سویه *P. aeruginosa* در مجاورت با سه غلظت از پروبیوتیک قرار گرفت (۰/۵ McFarland، ۱ و ۳) و نتایج نشان داد که سویه پروبیوتیک با غلظت معادل ۰/۵ McFarland نسبت به سویه کنترل (تصویر سمت راست) توانسته به میزان بالایی از تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* جلوگیری کند (شکل ۳).

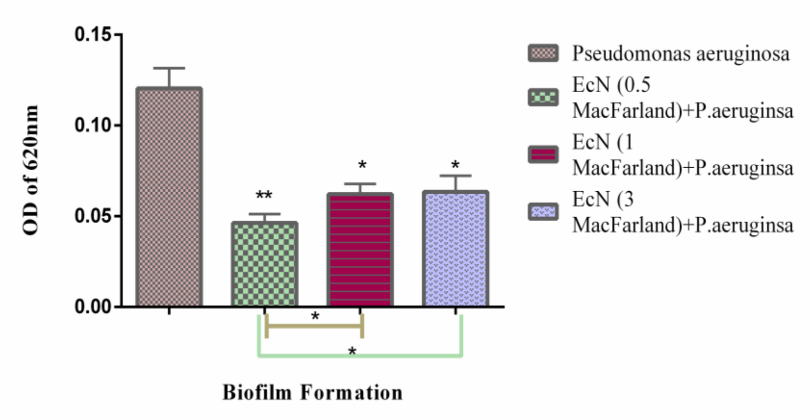
همانطور که در شکل ٤ قابل مشاهده است، خوانش در OD=٦٢٠ نشان داد که تشکیل بیوفیلم در هر سه غلظت ۰/۵ McFarland، ۱ و ۳ قابلیت ممانعت از شکل‌گیری بیوفیلم ناشی از سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* را داشته است و در هر سه مورد نسبت به کنترل (*P. aeruginosa* در عدم حضور پروبیوتیک)دارای کاهش معنی‌داری می باشد، هرچند این کاهش در ارتباط با غلظت ۰/۵ McFarland با $p<0/001$ و در دو غلظت McFarland ۱ و۳ به میزان $p<0/05$ گزارش شد. قابل ملاحظه است که کاهش بیان بیشتری که در ایجاد بیوفیلم در غلظت ۰/۵ McFarland نسبت به دو غلظت بالاتر مشاهده شد نیز معنی‌دار گزارش شد (شکل ٤) ($p<0/05$).

Real- time PCR ۳-۳

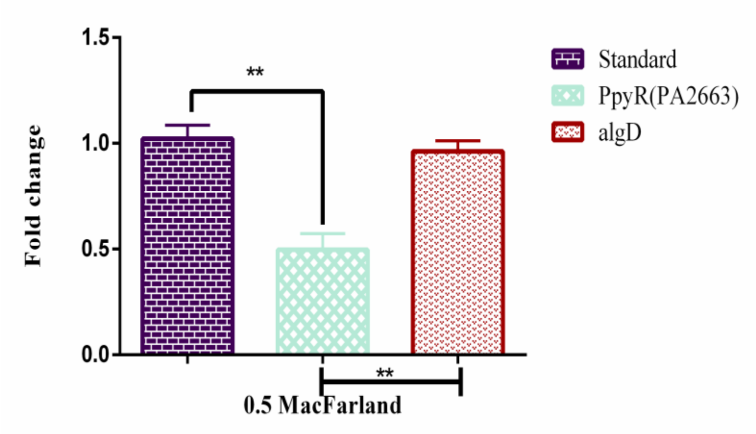
با توجه به نتایج به‌دست آمده از خوانش OD بیوفیلم زایی مشاهده شد، غلظت ۰/۵ McFarland از پروبیوتیک به‌عنوان بهترین غلظت مؤثر عمل کرده است و بیشترین میزان کاهش معنی‌دار را در ممانعت از رشد سویه‌های بالینی *P. aeruginosa* و مهار تشکیل بیوفیلم ناشی از سویه‌ها داشته است. از سویی دیگر نسبت به غلظت‌های بالاتر نیز کاهش معنی‌داری را نشان داده است و بنابراین به‌عنوان بهترین غلظت برای مطالعات بعدی و ارزیابی بیان ژن‌های *algD* و *PpyR* انتخاب شد. همانطور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، کاهش بیان معنی‌داری در ژن *PpyR* نسبت به کنترل داخلی مشاهده شد ($p<0/001$). در حالی‌که کاهش بیان در ژن *algD* مشاهده شد اما این کاهش نسبت به کنترل معنی‌دار گزارش نشد. این نکته نیز حائز اهمیت است که بیان ژن *PpyR* نسبت به *algD* نیز کاهش معنی‌داری را نشان داد (شکل ۵) ($p<0/001$).



شکل۳ تصویر سمت راست نماینگر سویه‌های *سودوموناس آئروژینوزا* به همراه محیط کشت خالی است (به‌عنوان کنترل منفی- فاقد تیمار پروبیوتیکی) و بیوفیلم شکل گرفته توسط *سودوموناس آئروژینوزا* در دیواره چاهک ها با غلظت بالا می‌باشد و تصویر سمت چپ که سویه *سودوموناس آئروژینوزا* همراه با تیمار پروبیوتیکی می‌باشد که همانطور که در تصویر مشخص است و سویه پروبیوتیک به خوبی توانسته به میزان قابل قبولی از تشکیل بیوفیلم ناشی از *سودوموناس آئروژینوزا* جلوگیری کند.



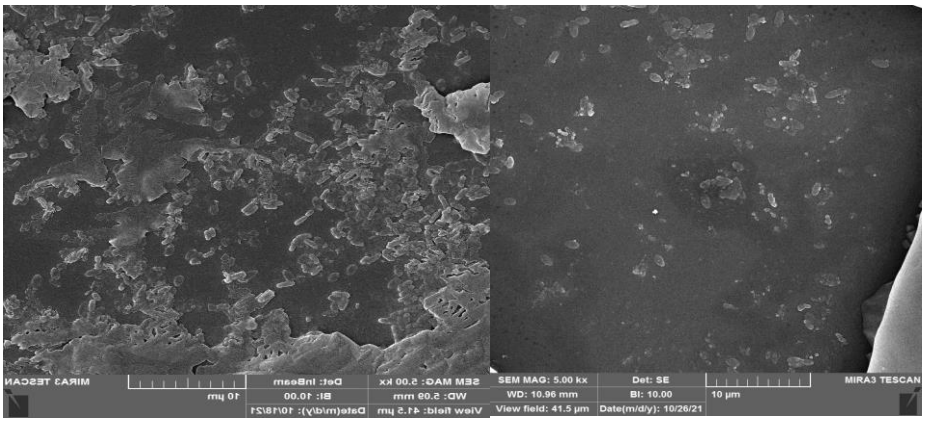
شکل٤ نتایج بیوفیلم‌زایی. بیوفیلم زایی در غلظت نیم فک فارلند از تیمار پروبیوتیکی نسبت به کنترل (سویه فاقد تیمار پروبیوتیکی) کاهش معنی‌داری را با $p = 0.001$ نشان داد. در غلظت‌های ۱ و ۳ مک فارلند از تیمار پروبیوتیکی نیز کاهش معنی‌داری را نسبت به سویه کنترل با $p = 0.01$ مشاهده شد، هرچند که این کاهش در مقایسه با غلظت نیم مک فارلند به میزان کمتری مشاهده شد. از سویه دیگر کاهش بیشتری که در تیمار با غلظت نیم مک فارلند مشاهده شد نسبت به هر دو غلظت ۱ ($p = 0.0102$) و غلظت ۳ ($p = 0.0710$) معنی‌دار گزارش شد.



شکل٥ نتایج Real Time PCR: ارزیابی های بیان دو ژن alg D و PpyR نشان داد که در حضور تیمار پروبیوتیکی بیان ژن Alg D به میزان معنی‌داری ($p = 0.001$) کاهش می‌یابد، گرچه در بیان ژن PpyR نیز نسبت به کنترل کاهش مشاهده شد. اما این کاهش معنی‌دار گزارش نشد.از سوی دیگر کاهش بیان alg D نیز نسبت به PpyR معنی‌دار گزرش شد($p = 0.001$) .

٤-۳ میکروسکوپ الکترونی

برای بررســـی تاثیر *EcN* بر جلوگیری از تشـــکیل بیوفیلم تصاویری توسط میکرو سکوپ الکترونی گرفته شد طبق شکل شماره ٦ در تصویر سمت چپ نمونه تصویر برداری شده تجمیع باکتری‌های *P. aeruginosa* را نشان می‌دهد و تصـــویر ســـمت راســـت عدم تجمیع باکتری‌های *P. aeruginosa* به‌علت حضور باکتری *EcN* را نشان می‌دهد و نتایج حاکی از آن اســـت که *EcN* توانســـت از تشـــکیل بیوفیلم ناشـــی *P. aeruginosa* به میزان بالایی جلوگیری کند(شکل ٦).



شکل ٦ تصویر سمت چپ تصویر میکروسکوب الکترونی که تجمع باسیل‌های *P. aeruginosa* در آن دیده می‌شود و تصویر سمت راست عدم وجود تجمع باکتری *P. aeruginosa* به علت حضور EcN

٤-بحث و نتیجه‌گیری

همانطور که بیان شد، مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی امروزه تبدیل به چالش بزرگی در درمان شده است و وجود مکانیسم‌های متفاوت باکتری‌ها از جمله توانایی تشکیل بیوفیلم باعث مقاومت آنها در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود و در نتیجه درمان و کنترل عفونت‌ها را با مشکل مواجهه کرده است .مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌تواند از سه طریق، ذاتی، اکتسابی و فرایند جهش‌زایی به باکتری‌ها انتقال یابد[۱۰]. پیش‌تر بیان شد یکی از مهم‌ترین باکتری‌هایی که مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی داشته و امروزه درمان را با مشکل مواجه کرده است *P. aeruginosa* می‌باشد که باکتری فرصت طلب و عامل اصلی عفونت‌های بیمارستانی است[۱۱]. باکتری *P. aeruginosa* به‌دلیل توانایی تشکیل بیوفیلم مقاومت زیادی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارد. از این‌رو، به‌دلیل اهمیت بالای این موضوع در چند دهه اخیر دانشمندان زیادی مکانیسم‌های مقاومت باکتری‌ها در زمینه مهار و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم را مورد ارزیابی قرار دادند. از سوی دیگر علاقه روزافزون به ارتقای سلامت به روش طبیعی، تحقیقات در زمینه پروبیوتیک را در مقیاس جهانی در دو دهه اخیر تشدید کرده است، در نتیجه منجر به تولید صنعتی تعداد قابل توجهی از محصولات جدید شده است[۱۲]. با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک‌ها در زمینه‌های مختلف در مطالعات اخیر پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک گزینه‌ی مناسب درمانی در برابر مقاومت های آنتی‌بیوتیکی انتخاب شدند. مطالعه Dariush shokri et al نشان داد که *Lactobacillus* ها به‌دلیل تولید ترکیبات ضد باکتری مختلف به‌عنوان مثال، تولید متابولیت‌هایی مانند، اسیدهای استیک و لاکتیک، و کاهش pH، رشد باکتری‌های بیماری‌زا را مهار می‌کنند.

همچنین، در این مطالعه *Lactobacillus* های مختلف از منابع لبنی محلی جدا شد و اثرات ضد باکتری و ضد بیوفیلم در برابر سویه‌های *P. aeruginosa* بررسی شد. دو سویه *Lactobacillus* که به‌عنوان *L. fermentum* شناسایی شدند، بیشترین اثر آنتاگونیستی را در برابر تمام سویه‌های *P. aeruginosa* نشان داد[۱۳]. نتایج ناشی از پژوهش حاضر نیز در همین راستا به بررسی اثر یکی از پروبیوتیک های دارای مجوز FDA بر روی مهار فرایند بیوفیلم زایی *P. aeruginosa* پرداخت و نتایج قابل توجهی در زمینه کاهش فرایند بیوفیلم زایی مشاهده شد. این امر می‌تواند به‌دلیل تولید و ترشح بسیاری از متابولیت‌های ترشحی باکتریایی از جمله وزیکول‌های غشای خارجی باکتری با شد.امروزه مشخص شده است که بسیاری از باکتری‌ها اثرات خود را به واسطه ترشح متابولیت‌های اولیه و ثانویه خود القا می‌کنند.

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Da-hye lee و همکاران انجام شد، نشان داده شد که باکتریو سین HW01 باعث کاهش تولیدفاکتورهای ویرولانس مانند پیوسیانین، پروتئاز و رامنولیپید در *P.aeruginosa KCTC 2004* می‌شود[۲۲]. بر اساس گزارش مطالعات مختلف در ارتباط با کارایی پروبیوتیک ها و باتوجه به افزایش نرخ مقاومت های آنتی‌بیوتیکی و ناکارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها در پژوهش حاضر تلاش شد تا به ارزیابی اثر پروبیوتیک *EcN* بر روی شکل‌گیری بیوفیلم ناشی از *P. aeruginosa* پرداخته شود؛ زیرا بیوفیلم ناشی از *P. aeruginosa* یکی از مشکلات رایج در پزشکی می‌باشد و ارتباطی مستقیم با مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. در سال های اخیر مطالعاتی در مورد کارایی باکتری *EcN* به انجام رسیده است و پژوهشگران این باکتری را در زمینه های مختلف در برابر باکتری های پاتوژن و بیوفیلم آنها ارزیابی کردند. مطالعه‌ی انجام شده توسط yang *et al* نشان داد که، گونه‌های *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* با استفاده از روش انتشار چاه آگار، توانستند رشد باکتری *E. coli* مقاوم به دارو را کاهش دهند. به عبارت دیگر، فعالیت مهاری پروبیوتیک‌های غنی شده با سلنیوم در برابر باکتری *E. coli* بیماری‌زا در شرایط in vitro و in vivo به خوبی مستند شده است[۱٤]. همچنین، وجود *EcN* به شدت تولید بیوفیلم *C. perfringens CP4* و تعداد *Clostridium perfringens* در بیوفیلم را کاهش داد. مکانیسم مشخص شده احتمالاً به‌دلیل سیستم منحصر به فرد یرسینیا باکتین *EcN*، توانایی ایجاد چندین چسبندگی و فیمبریا یا ترکیب آن است[۱٦ و ۱۵]. مطالعات ما نیز با نشان دادن کارایی اثر EcN بر روی مهار و کاهش فرایند بیوفیلم‌زایی می‌تواند این باکتری پروبیوتیکی را به‌عنوان یکی از باکتری‌های پروبیوتیک با پتانسیل پیشگیری و مهار بیوفیلم زایی معرفی کند. *P. aeruginosa* از نظر اپیدمیولوژی نقش مهمی در عفونت‌های بیمارستانی دارد و در کشور ما نیز میزان شیوع مقاومت دارویی این باکتری ۵۸ درصد تخمین زده شده است[۳و۱]. همین امر ضرورت مطالعه بر روی این باکتری و معرفی فاکتورهایی جدید با پتانسیل درمانی را ایجاد می‌کند. در تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* ژن‌های زیادی از جمله دو ژن *PpyR* و *algD* دخیل هستند که طبق تحقیقات متاآنالیز در همه‌ی سویه‌های *P. aeruginosa* مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارند[۳]. بنابراین، برای بررسی اثر پروبیوتیک بر ارزیابی بیان شان در این مطالعه انتخاب شدند. در طی مطالعاتی که بر روی تحقیقات اخیر در ارتباط با بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین کاربرد پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی جدید انجام شده است، فرضیه‌ای شکل گرفت مبنی بر آنکه پروبیوتیک *E.coli Nissle1917* می‌توانند به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی جدید برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری ها از جمله *P. aeruginosa* در نظر گرفته شود و برای اثبات این فرضیه در این مطالعه ۵۰ سویه *P. aeruginosa* از نمونه‌های بالینی جدا شد. از میان ۵۰ سویه بالینی *P. aeruginosa* که توسط تست آنتی‌بیوگرام مورد بررسی قرار گرفتند، ۱۲ سویه بالینی که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به داروهای خط اول درمان را داشتند انتخاب شدند، زیرا بسیاری از مطالعات گزارش کردند که ارتباط معنی‌داری میان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد بیوفیلم وجود دارد[۹-۷]، این موضوع در نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز دیده شد و به‌طور جالبی سویه‌هایی که دارای رنج مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری بودند بیوفیلم بیشتری را نسبت به سویه‌های دیگر داشتند، از این‌رو برای ادامه بررسی‌ها در این مطالعه به انتخاب سویه‌هایی با بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی پرداخته شد. با مشاهده کاهش چشمگیر شکل‌گیری بیوفیلم در حضور سویه پروبیوتیک به ارزیابی دو ژن کلیدی در تشکیل بیوفیلم پرداخته شد که آیا این مشاهده فنوتیپی می‌تواند ارتباط با بین این دو ژن کلیدی

داشته باشد و ایا اساسا این پروبیوتیک توانسته بر روی این دو ژن کلیدی اثر گذار بوده و از این طریق کاهش بیان این دو ژن کلیدی منجر به کاهش شـــکل‌گیری بیوفیلم در سویه‌های *P. aeruginosa* شده باشد.

برای ارز یابی بـیان ژن های مرتبط با بیوفیلم (*PpyR* و *algD*) در مجـاورت بـا *EcN* از غلظـت McFarland ۰/۵پروبیوتیک اســـتفاده شـــد و نتایج Real- time PCR بیانگر آن بود که در حضـــور پروبیوتیک مورد بررســـی کاهش معنی‌داری در بیان ژن *PpyR* مشاهده شد. با توجه به کاهش بیان این ژن در حضـور *EcN* و به‌دلیل اینکه این ژن در تشـــکیل بیوفیلم و فاکتور های بیماری‌زایی *P. aeruginosa* (الاستاز، پیووردین و مولکول های سـیگنال کروم ســـنســـینگ) نقش مهمی دارد[۱۷]، می‌توان نتیجه گر فت که *EcN* با اثر بر روی یکی از ژن های کلیدی شـــکل‌گیری بیوفیلم در *P. aeruginos* می‌تواند منجر به کاهش شکل‌گیری بیوفیلم شده و می‌تواند به‌عنوان یکی از فاکتورهای درمانی جدید معرفی و مورد ارزیابی‌های بیشتر قرار گیرد. از این‌رو می‌توان در مطالعات بعدی به ارزیابی و بررسی نقش این پروبیوتیک در بیوفیلم زایی پاتوژن‌های مختلف و همچنین امکان تولید متابولیت‌های مختلف این باکتری پرداخت تا بتوان با قطعیت در ارتباط با متابولیت ترشحی اثر گذار بر این روند بیوفیلم زایی اظهار نظر کرد.

۵-منابع

[1] Rocha AJ, Barsottini MRdO, Rocha RR, Laurindo MV, Moraes FLLd, Rocha SLd. 2019; Pseudomonas aeruginosa: virulence factors and antibiotic resistance genes. Brazilian Archives of Biology and Technology.;62.

[2] Ghazalibina M, Morshedi K, Farahani RK, Babadi M, Khaledi A. 2019 ;Study of virulence genes and related with biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa isolated from clinical samples of Iranian patients; A systematic review. Gene Reports.;17:100471.

[3]Newman1 JW, Floyd2 R, Fothergill1 JL. 2017;The contribution ofPseudomonas aeruginosavirulencefactors and host factors in the establishment ofurinary tract infections. FEMS Microbiology Letters.;364.

[4] Attila C, Ueda A, Wood TK. 2008; PA2663 (PpyR) increases biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa PAO1 through the psl operon and stimulates virulence and quorum-sensing phenotypes. Applied microbiology and biotechnology.;78(2):293-307.

[5] Akutko K, Stawarski A. Probiotics, prebiotics and synbiotics in inflammatory bowel diseases. Journal of Clinical Medicine. 2021 Jun 2;10(11):2466.

[6] Güttsches A-K, Löseke S, Zähringer U, Sonnenborn U, Enders C, Gatermann S, et al. 2012; Anti-inflammatory modulation of immune response by probiotic Escherichia coli Nissle 1917 in human blood mononuclear cells. Innate immunity.;18(2):204-16.

[7] Høiby N, Bjarnsholt T, Moser C, Bassi G, Coenye T, Donelli G, et al. 2015;ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. Clinical microbiology and infection.;21:S1-S25.

[8] Fernández-Barat L, Ciofu O, Kragh KN, Pressler T, Johansen U, Motos A, et al. 2017; Phenotypic shift in Pseudomonas aeruginosa populations from cystic fibrosis lungs after 2-week antipseudomonal treatment. Journal of Cystic Fibrosis.;16(2):222-9.

[13] Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. 2018;The inhibition effect of lactobacilli against growth and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Probiotics and antimicrobial proteins.;10(1):34-42.

[14] Yang J, Huang K, Qin S, Wu X, Zhao Z, Chen F. 2009;Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic Escherichia coli. Digestive diseases and sciences.;54(2):246-54.

[15] Hancock V, Dahl M, Klemm P. 2010; Probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 outcompetes intestinalpathogens during biofilm formation. Journal of medical microbiology.;59(4):392-9.

[16] Jiang Y, Kong Q, Roland KL, Wolf A, Curtiss III R. 2014;Multiple effects of Escherichia coli Nissle 1917 on growth, biofilm formation, and inflammation cytokines profile of Clostridium perfringens type A strain CP4. Pathogens and disease.;70(3):390-400.

[17] Attila C. 2009 ;Identification of Pseudomonas aeruginosa via a poplar tree model.
[18] Béatrice J, Maud P, Stéphane A, François C, Frédéric G, Benoit G, Marie-Odile H. Relative expression of Pseudomonas aeruginosa virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. FEMS microbiology letters. 2005 Feb 1;243(1):271-8.
[19] Fusco A, Savio V, Stelitano D, Baroni A, Donnarumma G. The intestinal biofilm of pseudomonas aeruginosa and staphylococcus aureus is inhibited by antimicrobial peptides HBD-2 and HBD-3. Applied Sciences. 2021 Jul 18;11(14):6595.
[20] Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of Pseudomonas aeruginosa direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). Journal of Clinical Laboratory Analysis. 2001 Apr;15(3):131-7.
[21] Sonnenborn U. Escherichia coli strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. FEMS microbiology letters. 2016 Oct 1;363(19):fnw212.
[22] Lee D-H, Kim BS, Kang S-S. Bacteriocin of Pediococcus acidilactici HW01 inhibits biofilm formation and virulence factor production by Pseudomonas aeruginosa. Probiotics and antimicrobial proteins. 2020;12(1):73-81.

Investigating the effect of probiotic bacteria *E. coli* Nissle 1917 on biofilm formation caused by clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* and evaluating the expression of algD and PpyR genes in order to prevent biofilm formation.

Mohadeseh Farnaghizad[1], Yasaman Issazadeh[2], Sarvenaz Falsafi[3], Ava Behrouzi[4*]

1. MS.c, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology,Tehran Medical Science , Islamic Azad University, Tehran , Iran
2. MS.c, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology,Tehran Medical Science , Islamic Azad University, Tehran , Iran
3. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science , Islamic Azad University, Tehran , Iran
4. Assistant Professor, Department of Microbiology, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Science , Islamic Azad University, Tehran , Iran

ava.behrouzi@gmail.com

Receipt: 2025/05/14 Accepted: 2023/04/10

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is one of the most important causes of infection in medicine, which in recent years is known as an antibiotic resistant bacterium. One of the antibiotic resistance strategies of this bacterium is algD and PpyR genes expression for biofilm formation. In recent years, it has been shown that using microorganisms, such as probiotics, is a method of pathogen bacterium harnessing, hence, in this study, for preventing biofilm formation of P. aeruginosa, *E.coli Nissle 1917(EcN)* probiotic bacterium is used, as a new treatment choice. Due to direct relationship between antibiotic resistance and biofilm formation, strains with the highest antibiotic resistance was chosen by antibiogram test. Then, in order to determine the inhibition rate of EcN bacterium in the formation of biofilm caused by *P. aeruginosa* bacterium, a biofilm formation test was performed. At the end, to evaluate algD and PpyR genes expression, which were key parts of biofilm formation, in the presence of probiotic EcN bacterium, Real- time PCR method was used. Based on the results of the biofilm formation test, EcN bacterium showed a high inhibitory effect on the formation of biofilm caused *by P. aeruginosa* bacterium. Also, in assessment of algD and PpyR genes expression in presence of EcN probiotic, a significant reduction in PpyR gene expression has been seen, in comparison with control group. The results of this study showed that EcN probiotic can act as a suitable new treatment option, to reduce *P. aeruginosa* biofilm formation.

Keywords: Biofilm , *E. coli Nissle 1917* ,Probiotic, *Pseudomonas aeruginosa.*