



The effects of Tomatidine alkaloid on biofilm formation and the expression of quorum sensing associated genes in *Pseudomonas aeruginosa*

Hadi Ghoomdost Noori¹, Omid Tadjrobehkar², Elham Moazamian³

¹Ph.D student, Department of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran. ²Assistant professor, Microbiology department (Bacteriology & Virology), Afzalipour school of medicine, Kerman university of medical sciences, Kerman, Iran. ³Associate Professor, Department of Microbiology, College of Sciences, Agriculture and Modern Technology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

Abstract

Background and Objectives: Quorum sensing system plays an important role in regulating pathogenic properties and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Therefore, inhibiting the quorum sensing system can be a suitable solution in the treatment of infections related to *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. This study was conducted to investigate the effects of sub-inhibitory concentrations of tomatidine on the expression of quorum sensing genes and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*.

Materials and methods: The present study was a laboratory interventional study. Biofilm formation was evaluated by microtiter plate method. The RNA of all bacteria was extracted using a column RNA isolation kit and the expression of *lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR* and *algD* genes in both normal conditions and after treatment with tomatidine was analyzed. Antibiotic resistance was evaluated by the disk diffusion method.

Results: The highest and least antibiotic resistance was detected against ticarcillin (80%) and colistin (5%), respectively. Tomatidine up to a concentration of 2 mg/ml had no inhibitory effect on *Pseudomonas aeruginosa*. 55% of the strains were weak biofilm producers and 45% were strong biofilm producers. The expression of all genes and biofilm formation increased after treatment with tomatidine. The *lasI* and *rhlR* genes were respectively the most and least affected genes. Among the five genes examined, only *rhlR* is significantly more expressed in weak biofilm producers.

Conclusion: The results showed, contrary to expectation, the sub-MIC concentrations of tomatidine increase the expression of quorum sensing genes and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*.

Keywords: Tomatidine, biofilm, quorum sensing, *Pseudomonas aeruginosa*.

Received: 28 February 2023

Revised: 2 June 2023

Accepted: 2 August 2023

Correspondence to: Omid Tadjrobehkar

Tel: +98 9131997503

E-mail: o.tadjrobehkar@kmu.ac.ir

Journal of Microbial World 2023, 16(2): 119 - 131

DOI:10.30495/jmw.2022.1968949.2040



Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.



تأثیر آلکالوئید توماتیدین بر تشکیل بیوفیلم و بیان ژن‌های موثر در حساسیت جمعیتی سودوموناس آئروژینوزا

هادی قوم‌دوست نوری^۱، امید تجربه‌کار^{۲*}، الهام معظمیان^۳

^۱ دانشجوی دکتری، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران. ^۲ استادیار، گروه میکروبیولوژی پزشکی (باکتریولوژی و ویروس‌شناسی)، دانشکده پزشکی افضلی پور، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. ^۳ دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: سیستم حساسیت جمعیتی نقش مهمی در تنظیم فاکتورهای بیماری‌زایی و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا بازی می‌کند. بنابراین مهار سیستم حساسیت جمعیتی می‌تواند راه حل مناسبی در درمان عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا باشد. این مطالعه به منظور بررسی اثر غلظت‌های زیر حد مهارت توماتیدین بر بیان ژن‌های حساسیت جمعیتی و تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا انجام شد.

مواد و روش‌ها: مطالعه حاضر از نوع مداخله‌ای آزمایشگاهی است. ارزیابی تشکیل بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیتر پلیت انجام شد. RNA تمام باکتری‌ها با استفاده از کیت ستونی جداسازی RNA، استخراج و بیان ژن‌های *algD*، *rhIR*، *rhII*، *lasR*، *lasI* در دو شرایط نرمال و تیمار با توماتیدین مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به روش انتشار دیسک صورت گرفت. **یافته‌ها:** بیشترین و کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی به ترتیب در برابر تیکارسیلین (۸۰٪) و کلیستین (۵٪) بود. توماتیدین تا غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فاقد اثر مهارت بر روی سودوموناس آئروژینوزا بود. ۵۵٪ سویه‌ها تولیدکننده بیوفیلم ضعیف و ۴۵٪ تولیدکننده بیوفیلم قوی بودند. بیان همه ژن‌ها و تشکیل بیوفیلم پس از تیمار با توماتیدین افزایش یافت. ژن‌های *lasI* و *rhIR* به ترتیب بیشترین و کمترین ژن‌های تحت تأثیر با توماتیدین بودند. در میان پنج ژن مورد بررسی، تنها *rhIR* در تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف به‌طور قابل توجهی بیشتر بیان شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد غلظت‌های زیر حد مهارت توماتیدین، بر خلاف انتظار باعث افزایش بیان ژن‌های حساسیت جمعیتی و افزایش تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا می‌شود.

واژگان کلیدی: توماتیدین، بیوفیلم، حساسیت جمعیتی سودوموناس آئروژینوزا.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۵/۱۱

ویرایش مقاله: ۱۴۰۲/۳/۱۲

دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۱۲/۹

مقدمه

خودساخته از مواد پلیمری خارج سلولی به یک دیگر و یا به یک سطح چسبیده‌اند (۱). تشکیل بیوفیلم یکی از خواص تکاملی بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی است (۲). بیوفیلم یک استراتژی کلیدی برای بقای گونه‌ها در طول تغییرات غیرمنتظره شرایط زندگی مانند نوسانات دمایی و

بیوفیلم یا زیست‌لایه میکروبی به اجتماعی از سلول‌های ریزجانداران اطلاق می‌شود که اغلب در یک ماتریس

(* آدرس برای مکاتبه: گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پزشکی، کرمان، ایران.

پست الکترونیک: o.tadrobehkar@kmu.ac.ir

تلفن: ۰۹۱۳۱۹۹۷۰۳



می‌کنند (۱۰). در سیستم‌های LasIR و RhlIR، ژن‌های همگام‌کننده (*lasR, lasI* در LasIR و *rhlR, rhlI* در RhlIR) با تولید برخی از فاکتورهای بیماری‌زایی مانند الاستاز A و B، آلکالین پروتئاز، آگزوتوکسین A، پیوسیانین، رامنولپید، سیانید و لکتین‌ها مرتبط هستند (۱۱).

تشکیل بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا باعث مقاومت تطبیقی نسبت به عوامل آنتی‌بیوتیکی می‌شود (۱۲). بنابراین، عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم این باکتری همچنان یک زمینه چالش برانگیز در درمان آنتی‌بیوتیکی است و ریشه‌کنی سودوموناس آئروژینوزا به تنهایی با عوامل آنتی‌بیوتیک نمی‌تواند با موفقیت انجام شود (۱۲).

مطالعات زیادی در سراسر دنیا به منظور کشف عوامل موثر جدید یا استراتژی‌های جدید در درمان عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا انجام می‌شود (۱۳). در این راستا، درمان ترکیبی با آنتی‌بیوتیک‌ها و عوامل ضد بیماری‌زایی، عوامل ضد بیوفیلم و یا ایجاد اختلال در سیستم حساسیت جمعیتی می‌تواند راه حل باشد (۱۴). آلکالوئیدها گروهی از عوامل زیست فعال متنوع هستند که در انواع مختلف موجودات زنده یافت می‌شوند. گیاهان به‌عنوان منشاء مهم عوامل آلکالوئیدی شناخته می‌شوند. بسیاری از آلکالوئیدها به دلیل خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر انواع مختلف پاتوژن‌ها دارند (۱۵).

توماتیدین یک آلکالوئید استروئیدی با خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی، ضدویروسی و حتی ضدسرطانی است که از گوجه‌فرنگی و سایر گیاهان خانواده Solanaceae خالص‌سازی می‌شود (۱۶). اخیراً توماتیدین به دلیل داشتن خواص ضدباکتریایی به‌عنوان یک عامل آنتی‌بیوتیک طبیعی معرفی شده است (۱۶ و ۱۷). در مطالعه حاضر، تشکیل بیوفیلم و بیان برخی از ژن‌های مرتبط با حساسیت جمعیتی در سودوموناس آئروژینوزا پس از تیمار با غلظت‌های زیر حد مهارت توماتیدین مورد بررسی قرار گرفت.

در دسترس بودن مواد غذایی است (۳). باکتری‌های درون یک بیوفیلم می‌توانند از پاسخ‌های ایمنی میزبان فرار و هزار تا ده هزار مرتبه بیشتر از هم‌تایان پلانکتونی خود در برابر درمان‌های ضد میکروبی مقاومت کنند (۳ و ۴). بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا یک سلاح حیاتی برای رقابت، بقا و تسلط در محیط پلی میکروبی ریه بیماران مبتلا به سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۳).

سیستم حساسیت جمعیتی (Quorum sensing) در تنظیم بسیاری از فرآیندهای فیزیولوژی باکتریایی دخیل است و همچنین نقشی محوری در فرآیندهای تشکیل بیوفیلم بازی می‌کند. امروزه برخی از پاتوژن‌های باکتریایی به دلیل توانایی در تشکیل بیوفیلم و نقش آن‌ها در عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم مورد توجه قرار گرفته‌اند. سودوموناس آئروژینوزا یکی از باکتری‌های گرم منفی شناخته شده در این رویکرد و به‌ویژه در عفونت‌های مرتبط با بیماران سیستیک فیبروزیس می‌باشد (۵). این باکتری یک باسیل گرم منفی است که می‌تواند در بسیاری از نقاط بدن از جمله پوست، بافت‌های زیر جلدی، استخوان، گوش، چشم، مجاری ادراری، ریه‌ها و دریچه‌های قلب باعث ایجاد عفونت شود. این عفونت‌ها بستگی به محل ورود و آسیب‌پذیری بیمار دارند (۶).

حساسیت جمعیتی نقش مهمی در تنظیم عوامل بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا از جمله تشکیل بیوفیلم، مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تولید آگزوتوکسین و برخی دیگر از ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی دارد (۷).

چهار سیستم حساسیت جمعیتی (LasIR, RhlIR, Pqs و Iqs) در سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده است. دو سیستم LasIR و RhlIR به میزان بیشتری مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۸) و بیان بیش از ۱۰ درصد از ژن‌های سودوموناس آئروژینوزا را کنترل می‌کنند (۹). این دو سیستم، در تشکیل بیوفیلم از طریق تولید مولکول‌های سیگنالینگ 3co12-homoserin lactone و C4-homoserin lactone (به ترتیب به‌عنوان مولکول‌های خودالفاگر اصلی در سیستم‌های LasIR و RhlIR شناخته می‌شوند) نقش خود را بازی

مواد و روش‌ها

(ایمی پنم ۱۰ میکروگرم، مروپنم ۱۰ میکروگرم)، سولفونامیدها (کوتریموکسازول ۲۵/۱ + ۷۵/۲۳ میکروگرم) کینولون‌ها (سیپروفلوکساسین ۵ میکروگرم)، فنیکل‌ها (کلرامفنیکل ۳۰ میکروگرم)، ماکرولیدها (آزیترومایسین ۱۵ میکروگرم) و کلیستین ۱۰ میکروگرم، استفاده شد. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک از شرکت روسکو دیاگنوستیک ساخت دانمارک بودند.

ج) ارزیابی MIC توماتیدین: از روش ماکرودایلوشن برات در ارزیابی MIC توماتیدین مطابق با دستورالعمل‌های CLSI استفاده شد (۲۰). در مرحله اول توماتیدین هیدروکلراید (سیگما آلدریج، چین) در DMSO (کمتر از ۱٪، حجمی/حجمی) حل شد و متعاقباً با آب مقطر استریل رقیق شد. در مرحله دوم غلظت‌های مختلف (۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸، ۲۵۶، ۵۱۲، ۱۰۲۴ و ۲۰۴۸ میلی‌گرم بر لیتر) از توماتیدین، با رقیق کردن در لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر مولر هیتون برات (مرک، آلمان) تهیه شد. در مرحله سوم همه لوله‌ها با ۰/۱ میلی‌لیتر محیط کشت حاوی 5.10^6 CFU/ml سلول‌های باکتریایی به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. در مرحله چهارم حداقل غلظت توماتیدین که رشد قابل مشاهده باکتری را مهار می‌کند به عنوان MIC انتخاب شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

د) تشخیص فنوتیپی تشکیل بیوفیلم: از روش کریستال ویوله برای اندازه‌گیری کمی تولید بیوفیلم استفاده شد (۲۱). غلظت نهایی 5.10^6 CFU/ml سوسپانسیون باکتریایی در محیط کشت مولر هیتون برات غنی شده با ۱٪ گلوکز در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه ساخته و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس پلیت‌ها شسته و خشک شدند. پس از آن بیوفیلم‌های باکتریایی روی دیواره میکروپلیت‌ها با کریستال ویوله ۰/۱ درصد رنگ‌آمیزی شدند. بیوفیلم‌های رنگ‌آمیزی شده از دیواره‌های میکروپلیت توسط اسید استیک ۳۵ درصد شسته و توسط دستگاه میکروپلیت خوان در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شدند. از محیط کشت مولر هیتون برات استریل غنی شده با ۱٪ گلوکز به عنوان شاهد منفی و بلانک استفاده شد و توبرامایسین با غلظت ۱ میکروگرم بر میلی‌لیتر به عنوان کنترل

(الف) جدایه‌های باکتریایی و شرایط کشت: ۲۰ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از نمونه‌های بالینی مختلف از بیماران علامت دار مراجعه کننده به آزمایشگاه بیمارستان افضل پور کرمان در جنوب شرق ایران، در سال ۱۳۹۹ تهیه شد. بیماران با سابقه مصرف آنتی‌بیوتیک در ماه‌های اخیر از مطالعه خارج شدند. جدایه‌های باکتریایی که به عنوان سودوموناس آئروژینوزا شناسایی شده بودند به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی‌لیتر نوترینت برات تلقیح و برای تایید به آزمایشگاه باکتریولوژی دانشکده پزشکی افضل پور منتقل شدند. این سویه‌ها روی محیط کشت سیترمید آگار کشت و در دمای ۴۲ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند و با تست‌های متداول شامل مورفولوژی کلنی، رنگدانه، رشد روی مک کانکی آگار، TSI، استفاده از گلوکز در محیط کشت OF، رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس و تست اکسیداز غربالگری شدند (۱۸). در گام اول سویه‌های باکتریایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را داشتند غربالگری شدند و در گام‌های بعدی سویه‌هایی که به عنوان تولیدکننده بیوفیلم تایید شدند در آزمایش‌ها استفاده شدند. از سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به عنوان سویه استاندارد در تمام آزمایش‌ها استفاده شد. برای استفاده از سویه‌ها در مراحل بعدی، تمام سویه‌ها در محیط کشت مولر هیتون برات با ۲۰٪ گلیسرول و در دمای منفی ۷۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. ب) ارزیابی حساسیت آنتی‌بیوتیکی: تست استاندارد انتشار دیسک به روش کربی باوئر، مطابق دستورالعمل CLSI استفاده و معیارهای حساسیت و مقاومت بر اساس پروتکل CLSI M100-S31 انجام شد (۱۹). بیست دیسک آنتی‌بیوتیکی در کلاس‌های مختلف شامل: β -لاکتام‌ها (کاربنسیلین ۳۰ میکروگرم، پپراسیلین تازوباکتام ۳۰ + ۶ میکروگرم، تیکارسیلین ۳۰ میکروگرم، سفوپرازون ۳۲ میکروگرم، سفوتاکسیم ۳۰ میکروگرم، سفنازیدیم ۳۰ میکروگرم)، آمینوگلیکوزیدها (جتامایسین ۱۰ میکروگرم، توبرامایسین ۱۰ میکروگرم، کانامایسین ۳۰ میکروگرم، استرپتومایسین ۱۰ میکروگرم)، تتراسایکلین‌ها (تتراسایکلین ۳۰ میکروگرم)، کارباپنم‌ها

در دمای ۷۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه نیز وجود داشت. محصولات غیر اختصاصی و محصولات دایمر پرایمر با تجزیه و تحلیل منحنی ذوب پس از تکثیر غربال شدند. توالی‌های پرایمر از مطالعه Hnamte و همکاران به‌دست آمد (۲۳). لیست پرایمرها در جدول ۱ ارائه شده است. میانگین مقادیر CT به‌دست آمده از RT-PCR برای محاسبه میزان بیان ژن مورد نظر در رابطه با بیان کنترل ژن داخلی (ΔC_T)، در شرایط تیمار شده با توماتیدین و در مقایسه با شرایط بدون تیمار ($\Delta \Delta C_T$) استفاده شد. در نهایت، میزان بیان نسبی ($2^{-\Delta Ct}$) ژن‌های مورد نظر با روش مقایسه‌ای CT محاسبه شد (۲۴).

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در فرآیند تکثیر RT-PCR.

Name	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon length (bp)	Temp (°C)
<i>lasI</i>	CTTTCCGA CTGTACGCT	ATCATCTTCT CCACGCCT	108	57
<i>lasR</i>	CTTGGTTGA CGGTTTTCT	CTCCACTCCA ATTTTCCAC	54	57
<i>rhII</i>	CAAACCCGC TACATCGTC	TGCACAGGTA GGCGAAGA	109	56
<i>rhIR</i>	GAGGCTTTT TGCTGTGGT	GGGTGAAGG GAATCGTGT	105	56
<i>algD</i>	GGGGCCAACA AGGAATACA	AGCACCAGC ACATCGGAA	101	57
<i>gyrA</i>	ACACCGAGG CGAACAAGA	TAGTCGGTGG TGAGGAAGT	73	57

(و) آنالیز آماری داده‌ها: در تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. فراوانی مقاومت آنتی‌بیوتیکی بین تولید کننده‌های بیوفیلم ضعیف و بیوفیلم قوی با تست فیشر مقایسه شد. از آنالیز واریانس (ANOVA) برای مقایسه مقادیر میانگین میزان بیان پنج ژن مورد بررسی بین گروه‌های مختلف و در شرایط مختلف استفاده شد. معنی‌دار بودن ($p\text{-value} \leq 0.05$) در سطح ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد. اختصاصیت پرایمرها با منحنی‌های ذوب ارزیابی شد.

یافته‌ها

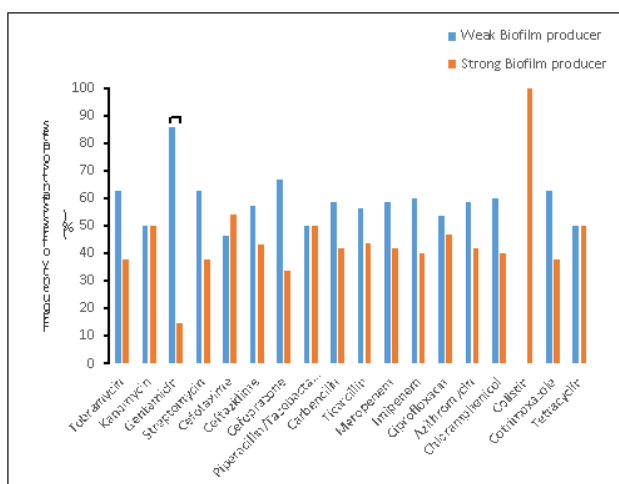
(الف) مقاومت آنتی‌بیوتیکی: تفاوت فراوانی (٪) مقاومت در

مثبت مورد استفاده قرار گرفت. ODهای بالاتر از OD بلانک (ODc) به عنوان تولیدکننده بیوفیلم در نظر گرفته شدند و اگر $OD < 2 \times ODc$ and $OD > 4 \times ODc$ ، به ترتیب به‌عنوان تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف و قوی طبقه‌بندی شدند (۲۱). تشکیل بیوفیلم بین دو شرایط بدون تیمار و شرایط تیمار (دو غلظت ۳۲ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین) مقایسه شد. همه آزمایش‌ها سه بار تکرار شدند.

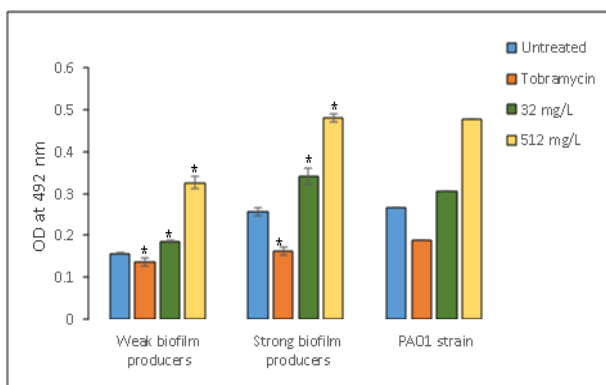
استخراج RNA و *PCR Real-time*: از RT-PCR برای تشخیص میزان بیان نسبی ژن‌های مورد نظر (*rhII*, *lasR*, *lasI*, *algD* و *rhIR*) در شرایط قبل و بعد از تیمار استفاده شد. تمام سویه‌های مورد نظر در غیاب و حضور دو غلظت زیر حد مهار کنندگی توماتیدین هیدروکلراید، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در محیط لوریبرتانی براث (مرک، آلمان) و تا مرحله لگاریتمی، رشد داده شدند. در مرحله بعد سلول‌های باکتریایی با سانتریفیوژ از کشت‌های شبانه جدا شدند و سپس RNA با استفاده از کیت جداسازی RNA ستونی (دنا زیست آسیا، ایران) استخراج شد.

خلوص نمونه‌های RNA با به‌دست آوردن OD نمونه در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نانو درآپ (پی سی آر مکس لامبدا، اوکراین) و محاسبه نسبت ۲۸۰/۲۶۰ تعیین شد. پایداری RNA با الکتروفورز روی ژل آگاروز ۱٪ تایید شد. RNAهای استخراج شده در دمای منفی ۸۰ درجه سلسیوس ذخیره شدند. سنتز cDNA و تکثیر محصولات cDNA توسط کیت دو مرحله‌ای RT-PCR (ویوانتیس، مالزی) با تکنولوژی SyberGreen mastermix طبق دستورالعمل سازنده انجام شد. تمام فرآیند تکثیر با دستگاه Real-Time, Step One PCR (صنایع مارسیلینگ، سنگاپور) انجام شد. از ژن *gyrA* به‌عنوان ژن مرجع داخلی استفاده شد (۲۲). فرآیند تکثیر شامل ۳۵ چرخه با شرایط زیر بود: واسرشت در دمای ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس برای ۴۵ ثانیه، فعال‌سازی ابتدایی آنزیم در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه در ابتدا و گسترش نهایی

(۳۲ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر) مقایسه شد و تویرامایسین



شکل ۱: فراوانی (%) سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در بین تولیدکنندگان بیوفیلم قوی در مقایسه با تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف. * $p \leq 0.07$.



شکل ۲: تجزیه و تحلیل کمی تشکیل بیوفیلم (میانگین چگالی نوری) در تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف، بیوفیلم قوی و سویه استاندارد در شرایط تیمار نشده در مقایسه با دو شرایط مختلف تیمار شده و تویرامایسین به عنوان کنترل مثبت. علامت * نشانگر اختلاف معنی دار با کنترل است ($p \leq 0.05$).

(د) میزان بیان نسبی پنج ژن مورد مطالعه پس از تیمار با غلظت‌های توماتیدین در مقایسه با شرایط بدون تیمار: نتایج به دست آمده از دو غلظت توماتیدین در مقایسه با شرایط تیمار نشده، با استفاده از تجزیه و تحلیل تی تست زوجی نشان داد که میزان بیان نسبی هر پنج ژن مورد نظر پس از تیمار با هر دو غلظت زیر حد مهار کنندگی توماتیدین (۳۲ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر) به‌طور قابل توجهی بالاتر از شرایط تیمار نشده بود ($P = 0.00$). مقادیر بیشتر میزان بیان نسبی برای هر پنج ژن

برابر عوامل آنتی‌بیوتیکی مختلف از تست دیسک دیفیوژن به دست آمد. حداکثر مقاومت در برابر تیکارسیلین (۸۰٪) و پس از آن سیپروفلوکساسین (۷۵٪) و حداقل مقاومت در برابر کلیستین (۵٪) و پس از آن پپراسیلین/تازوباکتام (۲۰٪) مشاهده شد. تنها یکی از بیست سویه به کلیستین مقاوم بود. مقاومت به سایر عوامل آنتی‌بیوتیکی به شرح زیر: تویرامایسین ۴۰٪، کانامایسین ۴۰٪، جنتامایسین ۳۵٪، استرپتومایسین ۴۰٪، سفوتاکسیم ۷۰٪، سفنازیدیم ۷۰٪، سفوپرازون ۶۰٪، کاربنسیلین ۶۰٪، تتراسایکلین ۷۰٪، ایمی‌پنم ۵۰٪، مروپنم ۶۰٪، آزیترومایسین ۶۰٪، کلرامفنیکل ۵۰٪، و کوتریموکسازول ۶۰٪ تشخیص داده شد. ۴۰ درصد از سویه‌ها به حداقل ۳ عامل آنتی‌بیوتیکی از کلاس‌های مختلف یا مقاومت چند دارویی (MDR) و ۳۵ درصد دارای مقاومت دارویی گسترده (XDR) بودند.

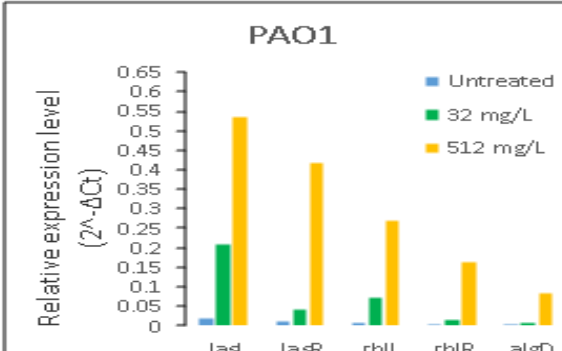
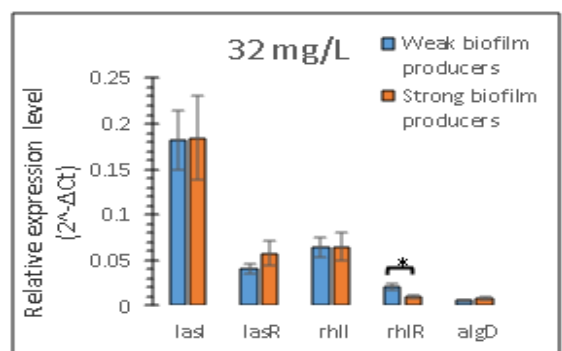
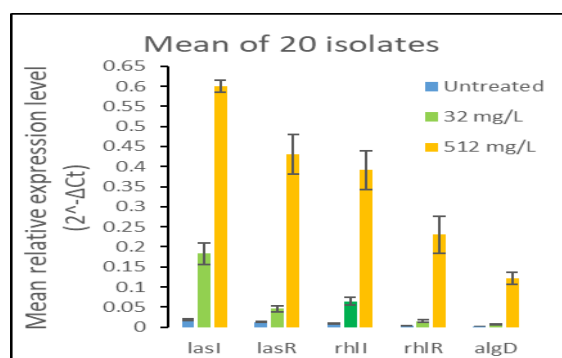
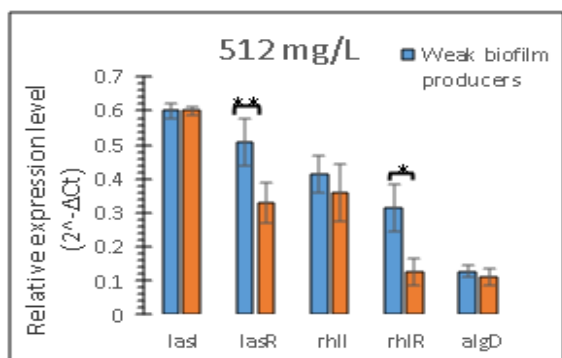
(ب) حداقل غلظت مهارت توماتیدین هیدروکلراید: فعالیت مهارت توماتیدین در برابر ۲۰ سویه بالینی غیر تکراری سودوموناس آئروژینوزا و سویه PAO1 در غلظت‌های مختلف (۱۶ - ۲۰۴۸ میلی‌گرم بر لیتر) مورد بررسی قرار گرفت، اما هیچ خاصیت بازدارندگی در این غلظت‌ها مشاهده نشد.

(ج) توانایی تولید بیوفیلم: یازده تا از بیست سویه (۵۵٪) تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف بودند و ۹ تا از سویه‌ها (۴۵٪) تولیدکنندگان بیوفیلم قوی بودند. اکثر سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، تولیدکننده‌های بیوفیلم ضعیف بودند (شکل ۱). آنالیزهای آماری مربع کای و فیشر نشان داد که تفاوت معنی داری در توانایی تولید بیوفیلم سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک در مقایسه با جدایه‌های حساس به آنتی‌بیوتیک در فاصله اطمینان ۹۵٪ وجود ندارد. اما اکثر سویه‌های مقاوم به چند دارو MDR (۵/۶۲٪) و ۱/۵۷٪ از جدایه‌های دارای مقاومت دارویی گسترده (XDR)، تولیدکننده بیوفیلم ضعیف بودند.

افزایش بیشتر پس از تیمار با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر در مقایسه با تیمار با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده شد (شکل ۲). میانگین $OD \pm SE$ (در ۴۹۲ نانومتر) از سویه‌ها بین شرایط تیمار نشده با شرایط تیمار با دو غلظت توماتیدین

میزان بیان نسبی ژن‌های *lasI*، *lasR*، *rhII* و *algD* بین تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف و تولیدکنندگان بیوفیلم قوی در شرایط تیمار در غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر از توماتیدین تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج مشابهی از شرایط تیمار در غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد. اما میزان بیان نسبی *rhIR* در تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف در مقایسه با تولیدکنندگان بیوفیلم قوی در هر دو شرایط تیمار (۳۲ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین) به طور قابل توجهی بالاتر بود (شکل ۴). میانگین \pm انحراف معیار مقادیر میزان بیان نسبی پنج ژن مورد بررسی، بین ۱۱-سویه تولیدکننده بیوفیلم ضعیف و ۹ تولیدکننده بیوفیلم قوی، در دو حالت بررسی شد $p = 0.08$ **. $p < 0.05$ * (شکل ۴).

مورد نظر، پس از تیمار با غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین و در مقایسه با تیمار با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر ($P \leq 0.05$)، ملاحظه شد. میانگین \pm انحراف معیار بیان نسبی پنج ژن مورد مطالعه برای ۲۰ سویه بالینی و همچنین سویه PAO1 محاسبه شد. افزایش میزان بیان ژن پس از تیمار با هر دو غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی توماتیدین در مقایسه با شرایط تیمار نشده مشاهده شد ($P \leq 0.05$). میزان بیان ژن در غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین در مقایسه با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین بیشتر بود (شکل ۳).



شکل ۴: میزان بیان نسبی پنج ژن مورد نظر از تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف در مقایسه با تولیدکنندگان بیوفیلم قوی، در دو حالت تیمار با ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر (راست) و تیمار با ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر از توماتیدین (چپ). $p < 0.05$ *. $p = 0.08$ **

شکل ۳: میزان بیان نسبی پنج ژن مورد مطالعه در شرایط عدم تیمار و در حضور دو غلظت زیر حد مهارکنندگی توماتیدین. اختلاف معنی‌داری بین میانگین بیان نسبی تمامی ۵ ژن مورد بررسی بعد از تیمار با دو غلظت متفاوت توماتیدین در مقایسه با حالت عدم تیمار مشاهده گردید ($P \leq 0.05$).

بحث

امروزه، مصرف بیش از حد آنتی‌بیوتیک باعث افزایش نگرانی‌ها در خصوص توسعه سویه‌های باکتریایی مقاوم به چندین دارو

۵) مقایسه میزان بیان نسبی پنج ژن مورد مطالعه بین تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف و تولیدکنندگان بیوفیلم قوی، در دو شرایط (تیمار با ۳۲ و ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین):

از سودوموناس آئروژینوزا/هایی باشد که توانایی تشکیل بیوفیلم قوی دارند. البته این موضوع باید در مطالعات آینده بررسی شود.

در پژوهش حاضر هیچ گونه اثر مهاری از توماتیدین بر روی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا تا غلظت ۲ میلی‌گرم بر لیتر مشاهده نشد، در حالی که در برخی از مطالعات اثرات بازدارندگی قوی (محدوده نانومولاری) توماتیدین علیه باکتری‌های گرم مثبت مانند استافیلوکوکوس، باسیلوس و گونه‌های لیستریا گزارش شده بود (۱۶). این موضوع را می‌توان به مقاومت بیشتر باکتری‌های گرم منفی در برابر عوامل ضد میکروبی نسبت به باکتری‌های گرم مثبت نسبت داد که این می‌تواند به دلیل برخی از ویژگی‌ها ذاتی باکتری‌های گرم منفی مانند وجود یک لایه غشایی اضافی (غشاء خارجی)، سیستم‌های ترشحی قوی، پمپ‌های efflux فعال و تنوع بیشتر ژن‌های مرتبط با مقاومت باشد.

بر اساس نتایج به دست آمده، اکثر جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به آنتی‌بیوتیک در گروه تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف قرار گرفتند. بسیاری از سویه‌های مقاوم به چنددارو (MDR) نیز جزء تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف بودند. یمانی و همکاران نیز در سال ۲۰۲۱ همبستگی معکوسی بین شیوع مقاومت آنتی‌بیوتیکی و توانایی تولید بیوفیلم در سودوموناس آئروژینوزا گزارش داده‌اند (۲۹). در شرایط استرس‌زا، سودوموناس آئروژینوزا با کاهش برخی از ویژگی‌های رقابتی مانند افزایش تمرکز بر روی تشکیل بیوفیلم و مقاومت در برابر عوامل آنتی‌بیوتیکی، در بدن انسان خود را در شرایط پایداری قرار می‌دهد. چنین پدیده‌ای یعنی سازگاری با استرس اخیرا توسط مورگان و همکاران در سال ۲۰۱۹ ارائه شده است (۳۰). کاهش برخی از خواص، مانند مقاومت آنتی‌بیوتیکی در تولیدکنندگان بیوفیلم قوی در مقایسه با تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف، در مطالعه حاضر به دست آمده بود که می‌تواند به دلیل سازگاری در شرایط سخت باشد. سان و همکاران، نیز کاهش مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌های بتالاکتام را در سویه‌های تولیدکننده بیوفیلم در سودوموناس

شده است. یافتن مواد جدید با خواص تداخلی حساسیت جمعیتی یا فعالیت‌های مهاری بیوفیلم می‌تواند یک راه حل مناسب باشد. تعداد کمی از آنتی‌بیوتیک‌ها و برخی مواد طبیعی در این زمینه بررسی شده است. اما بین یافته‌های به دست آمده از این بررسی‌ها تناقض وجود دارد. به گونه‌ای که فعالیت‌های مهاری بیوفیلم در برخی از مواد شیمیایی و آنتی‌بیوتیک‌ها گزارش شده است (۱۰ و ۲۵). در حالیکه برخی دیگر از مواد و حتی برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان محرک تشکیل بیوفیلم معرفی شده‌اند (۲۶). در این راستا، بولانگر و همکاران، فعالیت ضدباکتریایی توماتیدین را در ترکیب با توبرامایسین علیه سودوموناس آئروژینوزا گزارش دادند.

در مطالعه حاضر حداقل مقاومت آنتی‌بیوتیکی در برابر کلیستین شناسایی شد. کلیستین به عنوان یکی از آخرین آنتی‌بیوتیک‌های مؤثر بر علیه باکتری‌های گرم منفی مقاوم به چند دارو از جمله سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شود. کلیستین به دلیل سمیت نسبتا بالا برای کلیه‌ها و سیستم عصبی تجویز محدودی دارد. بنابراین، مقاومت به کلیستین قابل پیش‌بینی بوده، زیرا به طور مکرر در مطالعات دیگر نیز شناسایی شده بود (۱۹ و ۲۷).

به طور معمول آمینوگلیکوزیدها، به تنهایی یا همراه با سایر عوامل آنتی‌بیوتیک در درمان علیه عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا استفاده می‌شوند. فراوانی مقاومت به عوامل مختلف آمینوگلیکوزید در مقالات کم گزارش شده است (۲۸). در پژوهش حاضر نیز میزان مقاومت در برابر آمینوگلیکوزیدهای مختلف کم تا متوسط بود که این موضوع می‌تواند این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها را به عنوان یک گزینه مناسب در درمان ترکیبی علیه عفونت‌های مرتبط با سودوموناس آئروژینوزا قرار دهد. حداقل مقاومت (۱/۳٪) در برابر جنتامایسین، در تولیدکنندگان بیوفیلم قوی تشخیص داده شد (شکل ۱). میزان مقاومت پایین در برابر جنتامایسین در تولیدکنندگان بیوفیلم قوی می‌تواند به دلیل اثربخشی کمتر مکانیسم‌های خاص مانند آنزیم‌های غیرفعال کننده یا اصلاح کننده یا فعالیت کم پمپ‌های efflux در تولیدکننده‌های بیوفیلم قوی نسبت داده شود. بنابراین، جنتامایسین می‌تواند گزینه مناسبی در درمان عفونت‌های ناشی

آئروژینوزا گزارش داده بودند (۳۱).

بیان بیشتر ژن‌های مرتبط با بیماری‌زایی پس از تیمار با غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد طبیعی قبلاً به‌عنوان نظریه هورمسیس گزارش شده بود (۳۴). در مطالعه رانیری و همکاران، نیز عوامل ضدمیکروبی در غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی به‌عنوان مولکول‌های سیگنالی عمل می‌کردند و برخی استراتژی‌های محافظتی در باکتری‌ها مانند تشکیل بیوفیلم را القا می‌کردند (۲). اعتقاد ما بر این است که توماتیدین به‌عنوان یک عامل آنتی‌بیوتیک طبیعی (۳۵) می‌تواند با همین استراتژی باعث ایجاد بیوفیلم شود. زیرواحد C آنزیم ATP سنتاز در زنجیره تنفسی به‌عنوان هدف اصلی توماتیدین و آنالوگ‌های آن شناسایی شده است (۱۶). عملکرد نادرست زنجیره تنفسی و اختلال در تعادل ATP پس از تیمار با غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی توماتیدین می‌تواند به‌عنوان یک سیگنال القایی قوی در نظر گرفته شود که منجر به افزایش تشکیل بیوفیلم می‌شود.

نتیجه‌گیری

هدف این مطالعه بررسی خواص مهارکنندگی بیوفیلم با استفاده از توماتیدین بود. اما به‌طرز شگفت‌انگیزی خواص القایی از غلظت‌های مختلف توماتیدین مشاهده شد. تیمار با غلظت‌های زیر حد مهارکنندگی توماتیدین منجر به تشکیل بیوفیلم بیشتر در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا در مقایسه با شرایط نرمال شد. بیان ژن‌های مرتبط با حساسیت جمعیتی نیز پس از تیمار با توماتیدین افزایش یافت. بنابراین، بسیاری از عوامل آنتی-بیوتیک و برخی از عوامل زیست‌فعال طبیعی مانند توماتیدین را می‌توان به‌عنوان شمشیر دولبه در مبارزه با عفونت‌های باکتریایی در نظر گرفت. فعالیت‌های ضدباکتریایی یا باکتریواستاتیک توماتیدین می‌تواند در برابر شکل پلانکتونی سودوموناس آئروژینوزا در غلظت‌های بالاتر از MIC موثر باشد، اما در غلظت زیر حد مهارکنندگی، آن‌ها می‌توانند رفتار کاملاً متفاوتی به‌خصوص در برابر بیوفیلم‌ها داشته باشند. این موضوع در عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم در بیمارانی مانند سیستمیک فیبروزیس بسیار مهم می‌باشد. بنابراین، تجدید نظر در

با کمال تعجب، در مطالعه حاضر افزایش قابل توجهی در میزان تشکیل بیوفیلم پس از تیمار با هر دو غلظت زیر حد مهارکنندگی توماتیدین مشاهده شد. غلظت ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین در مقایسه با غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر به‌طور قابل توجهی باعث القای تشکیل بیوفیلم شد (شکل ۲). بیان ژن‌های *algD* و *rhIR* تحت تأثیر غلظت ۳۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین تأثیر معنی‌دار نبود. در حالی که، مقادیر میزان بیان نسبی ژن‌های *lasI*، *lasR* و *rhII* پس از تیمار با این غلظت توماتیدین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. بیان هر پنج ژن مورد بررسی پس از تیمار با ۵۱۲ میلی‌گرم بر لیتر توماتیدین به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. از این یافته‌ها می‌توان به حساسیت کمتر ژن‌های *algD* و *rhIR* به توماتیدین را نتیجه گرفت (شکل ۳).

بیان بیشتر برخی از ژن‌های مورد بررسی به‌ویژه *rhIR* پس از تیمار با توماتیدین در تولیدکنندگان بیوفیلم ضعیف در مقایسه با تولیدکنندگان بیوفیلم قوی یک نتیجه غیرمنتظره بود (شکل ۴). در تحقیقات اخیر توسط Hnamte و همکاران، فعالیت تضعیف‌کننده مزولوفالون در برابر برخی از ژن‌های مرتبط با حساسیت جمعیتی در سیستم‌های *LasIR* و *RhIIR* مشخص شد. در گزارش آن‌ها ژن *rhIR* حداقل ژن تحت‌تأثیر بوده است (۲۴). امکان دارد درگیری بیشتر ژن *rhIR* در پاسخ به سایر مکانیسم‌های استرس نسبت به تشکیل بیوفیلم مانند تولید الاستاز، پروتئاز *LasA*، رامنولپید و پیوسیانین باشد (۳۲). همچنین بیان پایین ژن *algD* پس از تیمار با توماتیدین نیز می‌تواند به همین دلیل باشد.

در هر دو غلظت مورد بررسی، حداکثر اثر القایی توماتیدین در برابر ژن *lasI* بود (شکل ۳). بنابراین در کنترل بیان عوامل مرتبط با حساسیت جمعیتی، می‌توان نتیجه گرفت که سیستم *LasIR* نسبت به سیستم *RhIIR* اولویت دارد. این موضوع نیز اخیراً توسط Kostylev و همکاران در سال ۲۰۱۹ گزارش شده است. آن‌ها همچنین مشخص کردند که *RhIR* در مقایسه با *LasR* بسیار حفظ شده است و فعالیت *RhIR* مستقل از *LasIR* است (۳۳).

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از پرسنل آزمایشگاه بیمارستان افضل‌پور کرمان و بیمارستان امیرالمومنین(ع) زابل، سرکار خانم یزدان‌پور کارشناس آزمایشگاه دانشگاه علوم پزشکی زابل و سرکار خانم خواجه کارشناس آزمایشگاه دانشگاه زابل کمال تشکر و قدردانی را دارند.

رژیم‌های درمانی متداول که علیه عفونت‌های مرتبط با بیوفیلم استفاده می‌شوند، رویکرد مهمی است که باید در توسعه دستورالعمل‌های درمانی آینده مورد توجه قرار گیرد. پیشنهاد ما این است که مطالعات بیشتری با مجموعه‌ای بزرگ‌تر از سویه‌های پاتوژن باکتریایی در شرایط *in vitro* و *in vivo* انجام شود تا به دیدگاه جامع‌تری به دست آید.

تعارض منافع

وجود ندارد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان این مقاله تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت نموده‌اند.

References

1. Tarkashvand, M., Lakzian, A., Fotovat, A., Mohammady, M. Isolation screening, and efficiency of *Pseudomonas* isolates in biofilm formation on organic and inorganic carriers and phenanthrene bioremediation. *Journal of Microbial World*. 2020; 13(1): 6-20.
2. Ranieri, M.R., Whitchurch, C.B., Burrows, L.L. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 45: 164-169.
3. Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International journal of molecular sciences*. 2020; 21(22): 8671.
4. Firouzi Dalvand, L., Hosseini, F., Moradi Dehaghi, Sh., Siasi Torbati, E. Antibacterial and antibiofilm activity of bismuth oxide nanoparticles produced by *Bacillus subtilis* against clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections. *Journal of Microbial World*. 2019; 12(2): 172-185.
5. Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., Bisht, R. Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian J. Microbiol*. 2019; 59(1): 3-12.
6. Tavafi H, Abdi-Ali A, Ghadam P, Gharavi S. Evaluation of the synergistic effect of bacterial recombinant alginate lyase and therapeutic antibiotics on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Microbial World*. 2019 Aug 23;12(2):160-71.
7. Smith, R.S., Iglewski, B.H. *P. aeruginosa* quorum-sensing systems and virulence. *Curr. Opin. Microbiol*. 2003; 6(1): 56-60.
8. T. Oluwabusola, E., Katermeran, N P., Han Poh, W., Goh, T M B., Tan. L T., Diyaolu, O., Tabudravu, J., Ebel, R., A. Rice, S., Jaspars, M. Inhibition of the quorum sensing system, elastase production and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* by sammaplin A and Bisaprasin. *Molecules*. 2022; 27(1721): 1-17.

9. Schuster, M., Greenberg, E.P. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Med. Microbiol. 2018; 296(2-3): 73-81.
10. Rajkumari, J., Borkotoky, S., Murali, A., Suchiang, K., Mohanty, S.K., Busi, S. Cinnamic acid attenuates quorum sensing associated virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Biotechnol Lett. 2018; 40(7): 1087-1100.
11. Almohaywi, B., Tin Yu, T., Iskander, G., Sabir, Sh., Bhadbhade, M., Blak, D., Kumar, N. Synthesis of alkyne-substituted dihydropyrrolones as bacterial quorum-sensing inhibitors of *Pseudomonas aeruginosa*. Antibiotics. 2022; 11(151): 1-16.
12. Lima, M.R., Ferreira, G.F., Neto, W.R.Nunes, Monteiro, J.M., Santos, A.R.C., Tavares, P. B., Denadai, A.M.L., Bomfim, M.R.Q., Santos, V.L.Dos, Marques, S.G., de Souza Monteiro, A. Evaluation of the interaction between polymyxin B and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells: reactive oxygen species induction and zeta potential. BMC Microbiol. 2019; 19(1): 115.
13. Falahati, N., Jamali, H., Kargar, M. and Kafilzadeh, F., 2022. The evaluation of the effect of gold nanoparticles on the expression of (MexA/B) efflux pump genes from the RND family in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. Journal of Microbial World, 15(1), pp. 78-87.
14. Li, Q., Mao, S., Wang, H., Ye, X. The molecular architecture of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing inhibitors. Mar. Drugs. 2022; 20(488): 1-28.
15. Cushnie, T.P., Cushnie, B., Lamb, A.J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. Int. J. Antimicrob. Agents. 2014; 44(5): 377-386.
16. Lamontagne Boulet, M., Isabelle, C., Guay, I., Brouillette, E., Langlois, J.P., Jacques, P.E., Rodrigue, S., Brzezinski, R., Beauregard, P.B., Bouarab, K., Boyapelly, K., Boudreault, P.L., Marsault, E., Malouin, F. Tomatidine is a lead antibiotic molecule that targets *Staphylococcus aureus* ATP synthase subunit C. Antimicrob. Agents Chemother. 2018; 62(6).
17. Normandin, C., Boudreault, P.L. Concise large-scale synthesis of tomatidine, a potent antibiotic natural product. Molecules. 2021; 26(19): 6008.
18. Karami, P., Khaledi, A., Mashoof, R.Y., Yaghoobi, M.H., Karami, M., Dastan, D., Alikhani, M.Y. The correlation between biofilm formation capability and antibiotic resistance pattern in *Pseudomonas aeruginosa*. Gene Rep. 2020; 18: 100561.
19. Weinstein, M.P. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2021
20. Wikler, M. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. In: Approved Standard 10th ed. M07-A11. 2018.
21. Kirmusaoglu, S. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. In: Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods, 15th ed. IntechOpen, pp. 2019; 1-17.

22. Mitchell, G., Lafrance, M., Boulanger, S., Seguin, D.L., Guay, I., Gattuso, M., Marsault, E., Bouarab, K., Malouin, F. Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. J. Antimicrob. Chemother. 2012 67(3): 559-568.
23. Hnamte, S., Parasuraman, P., Ranganathan, S., Ampasala, D.R., Reddy, D., Kumavath, R. N., Suchiang, K., Mohanty, S.K., Busi, S. Mosloflavone attenuates the quorum sensing controlled virulence phenotypes and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: In vitro, in vivo and in silico approach. Microb. Pathog. 2019; 131: 128-134.
24. Schmittgen, T.D., Livak, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C (T) method. Nat. Protoc. 2008; 3(6): 1101-1108.
25. Ahmed, S., Rudden, M., Smyth, T.J., Dooley, J.S.G., Marchant, R., Banat, I.M. Natural quorum sensing inhibitors effectively downregulate gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2019; 103(8): 3521-3535.
26. Townsley, L., Shank, E.A. Natural-product antibiotics: cues for modulating bacterial biofilm formation. Trends Microbiol. 2017; 25 (12), 1016–1026.
27. Abd El-Baky, R.M., Masoud, S.M., Mohamed, D.S., Waly, N.G., Shafik, E.A., Mohareb, D. A., Elkady, A., Elbadr, M.M., Hetta, H.F. Prevalence and some possible mechanisms of colistin resistance among multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Drug Resist. 2020; 13: 323-332.
28. Abbas, H.A., El-Ganiny, A.M., Kamel, H.A. Phenotypic and genotypic detection of antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. Afr. Health Sci. 2018; 18(1); 11-21.
29. Yamani, L., Alamri, A., Alsultan, A., Alfifi, S., Ansari, M.A., Alnimr, A. Inverse correlation between biofilm production efficiency and antimicrobial resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Microb. Pathog. 2021; 157: 104989.
30. Morgan, S.J., Lippman, S.I., Bautista, G.E., Harrison, J.J., Harding, C.L., Gallagher, L.A., Cheng, A.C., Siehnel, R., Ravishankar, S., Usui, M.L., Olerud, J.E., Fleckman, P., Wolcott, R.D., Manoil, C., Singh, P.K., 2019. Bacterial fitness in chronic wounds appears to be mediated by the capacity for high-density growth, not virulence or biofilm functions. PLoS Pathog. 2019; 15(3): e1007511.
31. Sun, Z., Jiao, X., Peng, Q., Jiang, F., Huang, Y., Zhang, J., Yao, F. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness. Cell Physiol. Biochem. 2013; 31 (2-3): 347-354.
32. Pearson, J.P., Pesci, E.C., Iglewski, B.H. Roles of *Pseudomonas aeruginosa* las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. J. Bacteriol. 1997; 179(18): 5756-5767.

33. Kostylev, M., Kim, D.Y., Smalley, N.E., Salukhe, I., Greenberg, E.P., Dandekar, A.A. Evolution of the *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing hierarchy. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2019; 116(14): 7027-7032.
34. Davies, J., Spiegelman, G.B., Yim, G. The world of subinhibitory antibiotic concentrations. Curr. Opin. Microbiol. 2006; 9(5): 445-453.
35. Guay, I., Boulanger, S., Isabelle, C., Brouillette, E., Chagnon, F., Bouarab, K., Marsault, E., Malouin, F., 2018. Tomatidine and analog FC04-100 possess bactericidal activities against *Listeria*, *Bacillus* and *Staphylococcus* spp. BMC Pharmacol Toxicol. 2018; 19(1): 7.