CC BY

DOR 20.1001.1.17354226.1400.16.3.5.2

Review article

# Multidrug efflux pumps and their rules in plant associated bacteria

**Sina Nourizadeh [1], Reza Khakvar [2,*]**

1. Ex-PhD student of Plant Pathology, Plant Protection Department, University of Tabriz, Iran
2. Associated Professor, Plant Protection Department, University of Tabriz, Iran

***Corresponding author**: e-mail: khakvar@tabrizu.ac.ir, Tel: 0413-3392036; Mobile: 09147366670

Received: 02/20/2022 Accepted: 04/27/2022

**Abstract**

Plant Associated Bacteria are one of the most important elements of plant ecosystems. These bacteria live internally (endophytes) or externally (epiphytes) in different plants organs and have various effects on the life cycle of plants. These bacteria are constantly exposed to different antibacterial compounds which are secreted from plants and other epiphytic microorganisms in their natural habitat. Plant-associated bacteria deal with these toxic compounds in a variety of ways, one of which is the use of efflux systems. An active efflux mechanism is responsible for the transportation of antibacterial compounds out of the cell. This process is associated with energy consumption which is provided from ATP hydrolysis or electrochemical gradient. These pumps are protein vectors that express from chromosome or plasmid and not only have critical rule in drug resistance, also have other physiological proceeds. The rule of efflux systems in plant-associated bacteria and their relation with transcription regulatory are to discuss in this article.

**Keywords:** Bacterial Resistance, Active Efflux, Antibiotics, Xenobiotics

**مقاله مروری**

# سیستم‌های تراوشی در باکتری همراه گیاهان و نقش آنها در مقاومت دارویی چندگانه

**سینا نوری‌زاده [۱]، رضا خاک‌ور [۲،*]**

۱. دانشجوی سابق دکتری باکتری شناسی گیاهی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

***مسئول مکاتبات:** آدرس الکترونیکی: khakvar@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۲/۰۷

**چکیده**

یکی از مهم‌ترین عناصر اکوسیستم‌های گیاهی، باکتریهای همراه گیاهان می‌باشند. این باکتری‌ها بصورت داخلی (اندوفیت) و یا به صورت خارجی (اپی‌فیت) در اندام‌های مختلف گیاهان زندگی می‌کنند و تاثیرات متفاوتی در چرخه زندگی گیاهان دارند. این باکتری‌ها در محیط طبیعی خود پیوسته در معرض ترکیبات شیمیایی ضد میکروبی گیاهان یا مواد سمی تولید شده توسط دیگر میکروارگانیسم‌های قرار دارند. باکتری‌های همراه گیاهان با روش‌های گوناگونی به مقابله با این ترکیبات سمی می‌پردازند که یکی از این روش‌ها استفاده از سیستم‌های تراوشی است. در همه باکتری‌ها نوعی مکانیسم تراوش فعال، مسئول انتقال و دفع مواد ضد میکروبی به خارج از سلول می‌باشد. این فرایند سلولی همراه با مصرف انرژی می‌باشد که انرژی آن از هیدرولیز آدنوزین تری فسفات (ATP) یا از شیب الکتروشیمیایی ایجاد شده در اثر انتقال یون‌های سدیم یا هیدروژن به خارج از سلول تامین می‌شود. این پمپ‌ها، ناقل‌های پروتئینی هستند که از روی کروموزوم یا پلاسمید کد می‌شوند و علاوه بر اینکه نقش کلیدی در مقاومت دارویی دارند، دارای عملکردهای فیزیولوژیکی دیگری نیز هستند. این مقاله نقش سیستم‌های تراوشی در باکتری‌های همراه گیاهی را مرور کرده و به طور مختصر ارتباط تنظیم‌گرهای رونویسی را با این سیستم‌ها مورد بررسی قرار می‌دهد.

**واژه های کلیدی:** مقاومت باکتریایی، تراوش فعال، آنتی بیوتیک، زنوبیوتیک

**مقدمه**

باکتری‌های همراه گیاهان[۱] پیوسته در معرض ترکیبات شیمیایی مخربی هستند که به طور طبیعی در محیط آنها وجود دارند، از جمله این ترکیبات می‌توان به متابولیت‌های ضد میکروبی تولید شده توسط خود گیاهان (نظیر مواد فنلی و یا فیتوآلکسین‌ها)، توکسین‌ها و مواد سمی مترشحه از بندپایان، قارچها و یا آغازیان دیگر و نیز باکتریوسین ها و مواد مضر دیگر تولید شده توسط سایر باکتری‌ها اشاره کرد. گذشته از این فعالیت‌های انسانی منجر به تولید طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی معدنی و آلی سمی شده است که بسیاری از آن‌ها برای باکتری‌ها بسیار کشنده می‌باشند (۱). پس چگونه باکتری‌ها قادر به زنده ماندن در چنین محیط‌های سمی هستند؟

باکتری‌ها عموماً از چند روش برای فرار از تاثیرات سمی مواد ضد میکروبی استفاده می‌کنند.

[۱] Plant Associated Bacteria

اولین روش که دگرگونی آنزیمی[1] نامیده می‌شود خود به دو گروه تقسیم می‌شود: گروه اول شامل آنزیم‌هایی هستند مانند بتا لاکتاماز (β-lactams) که مواد دارویی وارد شده را تجزیه کرده و آن را بی‌اثر می‌کنند و گروه دوم آنهایی هستند که به لحاظ شیمیایی ماده مضر را اصلاح می‌کنند، مانند CueO (اکسیدکننده پری‌پلاسمایی مس[2]) که قادر است با تبدیل $CU^{+}$ به $CU^{2+}$ سمیت آن را برای سلول کاهش دهد (۳،۲). روش دگرگونی آنزیمی برای همه مواد سمی کاربرد ندارد، چراکه برخی از مواد سمی نظیر فلزات به لحاظ شیمیایی قادر به تجزیه شدن یا بی اثر شدن نیستند بنابراین باکتری‌ها باید راه‌های جایگزینی را برای سمیت زدایی از این گونه مواد پیدا کنند (۴). برای سم زدایی از یون‌های فلزی نظیر مس یا نقره روش دیگری وجود دارد بنام دگرگونی آنزیمی اهداف داروها[3] است. بر خلاف روش اول که بسیار اختصاصی است و تنها به یک نوع دارو یا محل اتصال به دارو محدود می‌شود، روش دوم به مراتب دارای طیف وسیع‌تری است و در این روش باکتری با تغییر یا حذف محل اثر دارو اثرات آن را به حداقل می‌رساند (شکل ۱) (۶،۵). در کنار این دو روش، راه سوم و متداول دیگری نیز برای مقابله با مواد مضر وجود دارد و آن تغییر در پروتئین‌های لایه پپتیدوگلیکان (در باکتری‌های گرم مثبت) و غشای خارجی (در باکتری-های گرم منفی) است (۷).

لایه پپتیدوگلیکان در واقع اولین لایه دفاعی برای تمامی باکتری‌ها به شمار می رود و قادر به حفاظت باکتری‌ها از برخی مواد مضر می‌باشند. با این وجود، منافذ لایه پپتیدوگلیکان بسیار ضخیم‌تر از آن هستند که بتواند انتشار مولکول‌های بسیار کوچک را محدود کنند، بنابراین به طور غریزی باکتری‌های گرم منفی بعلت داشتن لایه‌های اضافی حساسیت کمتری نسبت به مواد سمی دارند، ولی چه در باکتری‌های گرم منفی و چه باکتری‌های گرم مثبت، این امکان وجود دارد که باکتری در مواجهه با مواد دارویی مضر، با تغییر در پروتیئن‌های سطحی مانع ورود این مواد به داخل سلول شود و یا حتی‌الامکان سرعت ورود این مواد به داخل سلول کاهش دهند (۹،۸) (شکل ۱).

در کنار این سه روش عمومی، روش چهارم و بسیار پیشرفته‌ای نیز برای دفع مواد مضر در باکتری‌ها تعبیه شده است و آن دفع فعال از طریق پمپ‌های تراوشی[4] می‌باشد. انتقال فعال بر خلاف انتشار، نقش مهمی را در مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی بازی می‌کند (۱۰،۶). برای حذف مولکول سمی وارد شده از طریق پورین‌ها یا سیستم‌های انتقال شبه پورینی[5]، سلول از مکانیسم‌های پمپی قدرتمندی استفاده می‌کند. این پمپ‌ها متشکل از یک یا چند ترکیب از پروتئین‌هایی در عرض غشاء هستند و باعث پمپ کردن مواد سمی وارد شده (در برخی موارد به صورت مستقیم از سیتوپلاسم) به خارج سلول می‌شود. در ابتدا تصور بر این بود که این ویژگی به طور اتفاقی از طریق انتقال افقی ژن‌ها بوجود آمده است، اما با گذشت زمان، مشخص شد که این ژن‌ها در کروموزوم سایر باکتری‌ها و حتی برخی از آرکی‌ها و یوکاریوت‌ها (از قبیل قارچ ها) نیز یافت می‌شود (۱۳-۱۱). پس از پی بردن به این موضوع، این سوال که آیا این پمپ‌ها نقش‌های دیگری هم دارند، برای بسیاری از پژوهشگران پیش آمد. در طی سالیان اخیر مشخص شده است که این پمپ‌ها علاوه بر توانایی حذف آنتی بیوتیک‌ها قادر هستند مواد دیگری نظیر فلزات سنگین[6]، مواد گندزدا (Antiseptic)، حلال‌ها و پاک کننده‌ها (۱۷-۱۴) را نیز از سلول خارج سازند. پمپ (ناقل) های تراوشی می‌توانند به دو صورت عمل کنند؛ در حالت اول به طور کاملا اختصاصی عمل کنند و باعث ایجاد مقاومت به یک دارو یا رده‌ای از داروها شوند که به آنها مقاومت دارویی ویژه[7] یا به اختصار SDR گفته می‌شود، و در حالت دوم به طور عمومی عمل کرده و توانایی انتقال ترکیبات مختلفی را داشته باشند (که به لحاظ ساختار شیمیایی متفاوت هستند).

[1] enzyme alternation
[2] periplasmic copper oxidase
[3] enzyme alternation of the target of the drug
[4] active efflux
[5] Porin-Like Transport System
[6] heavy metals
[7] specific drug resistance

گروه اخیر با مقاومت چند دارویی[1] یا به اختصار MDR همراه می‌شوند که یکی از مهم‌ترین علت‌های مقاومت باکتری‌ها به طیف وسیعی از ترکیبات سمی غیر مرتبط به هم وجود همین پمپ‌های MDR است (۱۸،۵) (شکل ۲).

تعداد پمپ‌های MDR با اندازه ژنوم موجودات مرتبط است (۱۹)، در حالی که اندازه ژنوم باکتری‌ها به رفتارهای اکولوژیکی آنها بستگی دارد (۲۰). معمولا موجودات آزادزی که گرایش به سمت ژنوم‌های بزرگتر دارند، همه ژن‌های مورد نیاز برای کلنیزه کردن در محیط‌های گوناگون را حمل می کنند و شامل تعداد زیادی از فاکتورهای رونویسی است که باعث افزایش سازگاری آنها می‌شود، ولی در مقابل باکتری‌های هم‌زیست همانند اندوسیمبیونت‌ها (endosymbionts) و بسیاری از باکتری‌های بیماری‌زا با فرآیند تکاملی کمتری را در ژن‌های خود روبرو بوده‌اند (۲۱). وجود تعداد فراوانی از پمپ‌های MDR در موجودات آزادزی، احتمالا، نشان دهنده این موضوع است که این پمپ‌ها دارای عملکردهای فیزیولوژیکی دیگری نیز هستند (۲۲). در این مقاله جنبه‌های فیزیولوژیک این پمپ‌ها را مورد بررسی قرار داده و نحوه تنظیم آنها را در باکتری‌های همراه گیاهی به طور مختصر مرور می-کنیم.

## سیستم های تراوشی باکتریایی

سیستم‌های تراوشی باکتریایی[2] مسئول ترشح مواد سمی و آنتی بیوتیک‌های تولید شده بوسیله خود سلول در محیط اطراف باکتری است. این پمپ‌ها در باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت وجود دارند و از یک (در باکتری‌های گرم مثبت) یا چند جز (در باکتری‌های گرم منفی) تشکیل شده‌اند که شامل موارد ذیل هستند: یک ناقل (پمپ) پروتئینی که در غشای سیتوپلاسمی داخلی باکتری جای دارد، یک پروتئین همراه[3] (که به عنوان پروتئین فیوژن غشائی (member fusion protein) هم معروف است: مانند AcrA، EmrA و MacA) که در فضای پری پلاسمایی مستقر است و پروتئین غشای خارجی (که به عنوان کانال پروتئینی غشای خارجی هم معروف است، برای مثال TOLC و OprM) که در غشای خارجی باکتری (گرم منفی) جای دارد (۲۳،۱۳). برای درک بهتر این سیستم مثالی آورده می‌شود: عقیده بر این است که در سیستم AcrAB-TolC (که حاوی AcrA، AcrB و TolC است) AcrB پس از گرفتن سوبسترای مورد نظر، آن را از طریق TolC (کانال پروتئینی موجود در غشای خارجی) به خارج از سلول انتقال می‌دهد که این همکاری با واسطه یک پروتئین همراه مانند AcrA صورت می‌پذیرد. بر اساس تشابه توالی، عملکرد ناقل، اختصاصیت سوبسترا و نیاز به انرژی، ده خانواده از پروتئین‌های تراوشی تحت پنج خانواده بزرگ[4] طبقه بندی می‌شوند (۵)(شکل ۳):

**۱) خانواده بزرگ ABC**[5]: ناقل‌های این خانواده بزرگ از ATP به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند و در تمامی هر سه شاخه اصلی حیات وجود دارند. اعضای این خانواده در انتقال مواد سمی، متابولیت‌ها و مواد دارویی نقش دارند (۲۴).

**۲) خانواده بزرگ RND**[6]: اعضای این خانواده عمدتاً در باکتری‌های گرم منفی دیده شده است و در انتقال مولکول‌های چربی‌دوست و آمفی‌فیلیک (amphiphilic) و یا یون‌های دو ظرفیتی سمی، همچنین در برخی از باکتری‌ها در تحمل به حلال‌ها نیز نقش دارند (۲۵). ناقلین این خانواده توانایی تشکیل ساختارهای قدرتمند، مشارکتی و چند پروتئینی را دارا هستند که باعث ارتباط بین غشای خارجی و داخلی می‌شود، و با توجه به ساختار سه قسمتی که دارند توانایی انتقال بسیاری از مواد سمی را از سیتوزول یا فضای پری پلاسمایی به خارج از سلول باکتری‌ها را دارا هستند. پمپ‌های تراوشی RND از برخی جهات به سیستم ترشحی نوع یک باکتریایی شباهت دارند، هر دو سیستم تشکیل یک

[1] multidrug resistance
[2] Bacterial efflux systems
[3] Accessory protein
[4] Super Family
[5] the adenosine triphosphate binding cassette
[6] the resistance-nodulation-cell division

سیستم سه جزیی را می‌دهند که ایجاد کننده یک کانال گسترش دهنده غشایی [1]است، اما به لحاظ منبع انرژی با همدیگر تفاوت دارند؛ پمپ های RND از شیب پروتون و سیستم ترشح نوع یک از ATP به عنوان منبع انرژی استفاده می‌کنند (۲۵).

**۳) خانواده بزرگ MFS**[2]: این خانواده دارای یکی از بزرگترین ناقل‌های پروتئینی است و در انتقال قندها، متابولیت‌های ثانویه و مواد دارویی دخالت دارد. این سیستم بیشترین نقش را در مقاومت چند دارویی در باکتری‌های گرم مثبت ایفا می‌کند مانند پمپ‌های Bmr و Blt در *Bacillus subtitles* (۲۳).

**۴) خانواده بزرگ SMR**[3]: این خانواده کوچکترین پروتئین‌های تراوشی شناخته شده را دارند، اعضای این خانواده در تراوش یون‌های (دارو) چربی دوست در باکتری‌ها دخیل هستند (۵). سه خانواده اخیر از شیب پروتونی به عنوان منبع انرژی خود استفاده می‌کنند.

**۵) خانواده بزرگ MATE**[4]: اعضای این خانواده خانواده در تمامی سه شاخه اصلی موجودات زنده ( باکتری‌های حقیقی، یوکاریوت‌ها و آرکی‌ها) یافت می-شوند. سوبسترای اصلی برای این گروه ترکیبات کاتیونی و آروماتیک می‌باشد. این گروه بر خلاف سه گروه قبلی از شیب یونی $Na^+$ یا $H^+$ برای منبع انرژی خود استفاده می‌کند (۲۷). تحقیقات متعدد نشان داده در باکتری‌های گرم مثبت پمپ‌های تراوشی خانواده بزرگ ABC از فراوان ترین و غیر اختصاصی ترین پمپ‌ها هستند که طیف وسیعی از مواد سمی را به خارج دفع می کنند؛ در حالیکه در باکتری‌های گرم منفی پمپ‌های RND فراوانی بیشتری داشته و تعداد زیادی از مواد مضر را دفع می‌کنند (۲۴) (شکل ۴).

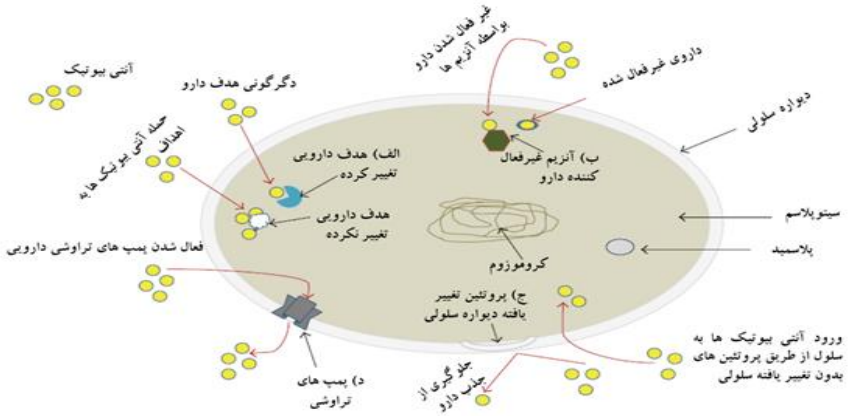
## نقش پمپ‌های MDR در باکتری‌های همراه گیاهی

خاک در مقایسه با سایر اکوسیستم‌ها حاوی بیشترین و متنوع‌ترین تعداد جمعیت باکتریایی است (۲۴). تعامل باکتری‌ها با مواد شیمیایی موجود در خاک و هم چنین با دیگر اعضای بیوسفر خاکی، تشکیل دهنده ساختار جمعیت باکتری‌ها در این اکوسیستم است. در این بین ریزوسفر از اکوسیستم پیچیده‌ای تشکیل شده است که در آن موجودات تشکیل یک جامعه بسیار نزدیک و مرتبط با ریشه گیاهی را می‌دهند. در این مکان ترشحات ریشه و دیگر ترشحات گیاهی شامل ترکیباتی مانند مواد غذایی و هورمون‌ها هستند که نقش مثبت یا منفی در تعاملات باکتری-گیاه بازی می‌کنند (۲۸). در این بین، ترکیبات ضد میکروبی پیش ساخته شده (مشهور به فیتوآنتی‌سیپین‌ها (Phytoanticipins)) یا ترکیباتی که بعد از حمله عامل بیماریزا ساخته می شوند (مشهور به فیتوالکسین‌ها (Phytoalexins))، برای باکتری‌ها سمی هستند (۳۰،۲۹). بر اساس یافته‌های پژوهشگران مشخص شده است که پمپ‌های MDR در تعاملات باکتری‌ها با گیاهان میزبان از اولین مرحله کلونی شدن (۱۰) تا مرحله بقا (۳۱) باکتری در میزبان نقش دارند. بررسی ژن‌های باکتری *Pseudomonas putida* بیانگر این موضوع است که این باکتری برای تنظیم کردن برنامه ژنی خود جهت استقرار بر روی ریشه ذرت نیازمند بیان شدن چندین پمپ تراوشی است (۳۲).

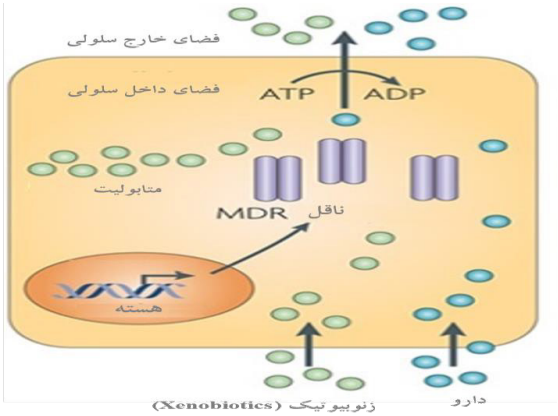
مطالعات اخیری که بر روی تعدادی از باکتری های همراه گیاهی صورت گرفته است نشانگر این مطلب است که از دست دادن یا غیر فعال شدن پمپ های تراوشی، استقرار اولیه باکتری و هم چنین بیماری زایی آنها را با اخلال روبرو می‌سازد. باکتری *Erwinia amylovora* عامل بیماری آتشک در بسیاری از گیاهان خانواده روزاسه (Rosaceae) است (۳۳)، چهار پمپ از اعضای خانواده RND برای پرآزاری بیشتر در اختیار دارد (۳۴). جهش یافتگانی از پمپ تراوشی AcrAB از سویه‌های این باکتری به مواد سمی موجود در سیب نظیر فلورتین (phloretin)، نارینجنین (naringenin)، کوئرستین (quercetin) و

[1] double-membrane-spanning channel
[2] the major facilitator
[3] the small multidrug resistance
[4] the multidrug and toxic compound extrusion

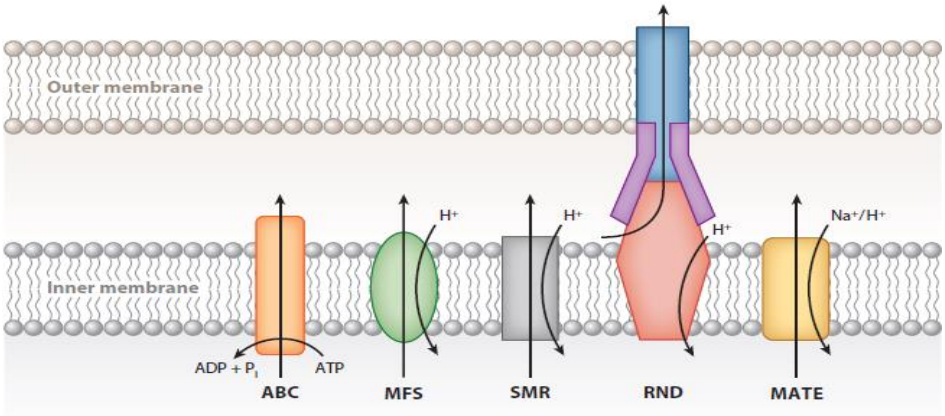
کاتشین (catechin) بسیار حساس بودند و به طور چشمگیری از بیماری‌زای کمتری برخوردار بودند (۳۵). بعلاوه همان مطالعه نشان می‌دهد که نارینجنین و فلورتین سبب القای بیان ژن *acrAB* می-شود.



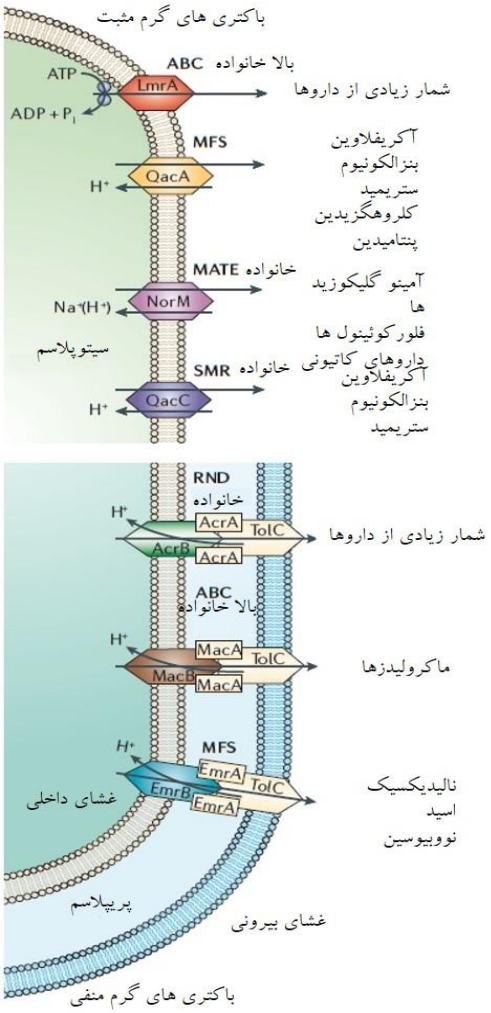

شکل **۱** - نمای شماتیک از چهار روش مختلف دفع اثر مواد مضر در باکتری ها (۸).




شکل ۲ - نمای شماتیک از نحوه عمل پمپ های تراوشی چند دارویی (۱۸).




شکل ۳ - نمای شماتیک از پنج نوع مختلف پمپ‌های تراوشی (۵).




شکل ۴ - مقایسه شماتیک از ساختار پمپ های تراوشی در باکتریهای گرم مثبت و منفی و مواد مضر دفعی توسط آنها (۲۴).

باکتری *E. amylovora* در میزبان گیاهی خود در هنگام آلودگی اقدام به ترشح پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی نظیر آمیلورین و لوان می‌کند که در بیماریزایی نقش مهمی دارند. اخیرا مشخص شده است که پمپ-های تراوشی علاوه بر مشارکت در مکانیسم‌های دخیل در ترشح پلی ساکاریدهای خارج سلولی (۳۶)، در تولید آمیلورین هم نقش دارند به طوری که در جهش یافتگانی از *acrB* و *mdtABC*، میزان تولید آمیلورین به ترتیب ۵۰ و ۴۰ درصد کاهش نشان می دهد (۳۷).

پالمو و همکاران نشان دادند باکتری بیماریزای گیاهی *Agrobacterium tumefaciens* از سیستم IfeABR برای خارج سازی کامسترول (coumestrol) که یک ایزوفلاونوئید (isoflavonoid) ضد میکروبی در ترشحات ریشه‌ای است (همین ترکیب باعث القای بیان *ifeABR* نیز می‌شود) استفاده می‌کند. جهش یافتگانی از این باکتری که فاقد ژن مذکور بودند به دلیل تجمع کامسترول با اخلال در رقابت، جهت استقرار بر روی ریشه مواجه می‌شدند (۱۲).

*Ralstonia solanacearum* یک باکتری بیماری‌زای گیاهی گرم منفی است. این باکتری دارای یک کروموزوم بزرگ ۳/۷ مگا جفت‌باز و یک مگا پلاسمید ۲/۱ مگا جفت‌باز است (۳۸). بوسیله تکنولوژی بیان ژن در شرایط آزمایشگاهی، چندین ژن که در هنگام رشد و بیماری زایی تنظیم می‌شوند، شناسایی شده‌اند، که تعدادی از این ژن‌ها مربوط به پمپ‌های MDR از خانواده‌های بزرگ RND، MATE، MFS و ABS هستند. برون و همکاران با ایجاد جهش در برخی از ژن‌ها اثبات کردند دو ژن *acrAb* و *dinf* (که به ترتیب روی کروموزوم و مگاپلاسمید مستقر هستند و پمپ‌های MDR متعلق به بالاخانواده RND و MATE کد می‌کنند) در هنگام رشد در گیاه میزبان بیان می‌شوند و برای پرآزاری کامل نیاز هستند. بعلاوه غیرفعال شدن این دو ژن باعث حساس شدن باکتری به ترکیبات سمی تولید شده توسط گیاهان نظیر کافئیک اسید (caffeic acid)، رزورسینول (resorcinol)، اسکولتین (esculetin)، توماتین (tomatine) و بربرین می شود (۳۸).

*Pseudomonas syringe* یکی دیگر از بیمارگرهای مهم محصولات کشاورزی است که باعث تولید بیماری‌های مختلفی در گیاهان زراعی و باغی می شود. مطالعات مختلف صورت گرفته نقش پمپ-های تراوشی که توسط جزایر بیماری زای syr-syp کد می شوند را برای پرآزاری کامل در این باکتری مشخص کرده است (۳۹). این باکتری فیتوتوکسین های لیپوپپتیدی تولید می کند که در پرآزاری باکتری نقش دارند و باعث بوجود آمدن نکروز در طیف وسیعی از گیاهان تک لپه و دو لپه می شود (۴۰). این ترکیبات علاوه بر سمیت برای سلول‌های گیاهی، برای سلول‌های باکتریایی تولید کننده آنها نیز سمی و خطرناک هستند (۴۱). بنابراین مادامی که این باکتری به تولید این فیتوتوکسین‌های لیپوپپتیدی ادامه می-دهد، باید به طور موثری این ترکیبات سمی را از سلول به سمت بیرون هدایت کند که بسیاری از سیستمهای انتقالی در این کار مشارکت دارند. سیستم‌های PseABC (ناقل RND)، SyrD وPseEF (ناقل ABS) در ترشح دو فیتوتوکسین سیرینگومایسین و سیرینگوپپتین مورد نیاز هستند. با حذف این پمپ‌های تراوشی از ترشح فیتوتوکسین‌ها کاسته می شود و بدنبال آن، میزان پرآزاری جهش یافته‌ها نیز کم می‌شود. در مطالعه دیگری نیز نقش پمپ تراوشی RND در پاتوارهای دیگر این باکتری مشخص شده است، با شناسایی پمپ‌های MexAB-OprM در سه پاتوار *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*، *P. syringae* pv. *syringae* و *P. syringae* pv. *tomato* در مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها (بتا لاکتام ها، سفالوسپورین ها (cephalosporins)، کوئینولون‌ها (quinolones)، تتراسایکلین و کلرامفنیکل (chloramphenicol))، متابولیت‌های ثانویه‌ای گیاهی (فلاونوئیدهایی مانند بربرین، کاتکچین، مورین، نارینپنین، فلوریدزین (phloridzin) و فلورتین) و زیست کش‌ها (biocides) (بوتیل پارابن (butylparaben)، متیل پارابن (methylparaben)) مشارکت دارند. از طرفی دیگر، استرین‌های جهش یافته پمپ مذکور، در برابر طیف وسیعی از ترکیبات ضد میکروبی دارای حساسیت بالایی هستند و از توانایی آنها در استقرار یافتن در گیاهان میزبان کاسته شده و در نتیجه، از میزان جمعیت باکتری در گیاه کاسته و هم چنین از علایم بیماری در گیاه کم می-شود (۴۲).

## نقش در مقاومت به فلزات سنگین و ارتباط آن با بیوفیلم

تقریبا در ۴۰ درصد آنزیم‌ها، فلزات واسطه[1] مانند منیزیوم، آهن، روی، منگنز، کلسیم، کبالت، مس و حتی کادمیوم به کار رفته است (۴۴،۴۳). با وجود این که این فلزات بسیار لازم و حیاتی هستند، اما در غلظت‌های بالا بسیار سمی هستند، بنابراین باکتری-های باید از مکانیسم‌های خاصی برای حذف مقادیر اضافی این فلزات استفاده کنند (۱۷). باکتری‌ها از تدابیر مختلفی برای مقاومت به فلزات سنگین استفاده می‌کنند که باعث تراوش مقدار اضافی این فلزات از

[1] transition metals

سلول می‌شود. پمپ‌های تراوشی بخشی از یک سیستم پیشرفته هستند که باعث مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها می شوند (۴۳). علاوه بر جلوگیری و محدود کردن نفوذ مواد ضد میکروبی به درون سلول، باکتری‌ها برای تنظیم میزان یون‌های فلزی درون سلولی که در کوفاکتورهای (cofactor) آنزیمی به کار می‌رود، از پمپ‌های تراوشی استفاده می‌کنند.

مکانیسم دیگری که در این مقاومت نقش دارد تولید بیوفیلم است. بیوفیلم‌ها باعث افزایش مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی می‌شوند و اکثر آلودگی‌های پایدار و خطرناک باکتری‌ها که با تشکیل بیوفیلم همراه می‌شود، باعث گسترش سریع مقاومت‌های چند دارویی در باکتری‌ها می‌شود. بیوفیلم‌ها با تشکیل پلی‌ساکاریدهای خارج سلولی (EPS) قادر به جذب فلزات سنگین اطراف خود هستند (۱۵)، علاوه بر آن به نظر می‌رسد مقاومت‌های بالای بیوفیلم با پمپ‌های MDr، P-type ATPases و دیگر مکانیسم‌ها مرتبط باشد (۴۵). مطالعات اخیر بیانگر این موضوع است که مقاومت به مس در بیوفیلم باکتری *Xylella fastidiosa*، به غیر از سایر مکانیسم‌های شناخته شده، به تنظیم تعدادی دیگر از سیستم‌های تراوشی از جمله ژن‌های مرتبط با پمپ‌های RND، ABC، MFS و MATE مرتبط می‌باشد (۴۶،۴۵).

## شبکه تنظیمی پمپ‌های تراوشی

با اینکه ژن‌های پمپ‌های تراوشی تقریبا در ژنوم-های باکتریایی شایع هستند، بیان اکثریت آنها توسط چندین تنظیم کننده رونویسی شدیدا کنترل می‌شود. از آنجا که پمپ‌های تراوشی توانایی خارج کردن طیف وسیعی از ترکیبات شیمیایی غیر مرتبط به هم را دارند، به نظر می رسد بیان بیش از اندازه پمپ‌های تراوشی ممکن است باعث تراوش ناخواسته متابولیت‌ها و یا دیگر مولکول‌های سیگنال شود که در نتیجه آن تاثیرات مخربی روی فیزیولوژی سلولی وارد می‌سازد (۳). این تنظیم کننده‌ها به طور کلی در سه گروه قابل تقسیم بندی هستند؛ سرکوب‌گرهای موضعی[1]، تنظیم‌کننده‌های پاسخ سراسری[2] و سیستم‌های دو جزئی[3]. نقش این تنظیم کننده در باکتری‌های مرتبط با آلودگی‌های بالینی به خوبی مشخص شده است (۴۷،۲۳). در مورد باکتری‌های همراه گیاهی اخیرا تحقیقاتی صورت گرفته است که جامع‌ترین آن طی چند سال اخیر در ارتباط با عامل آتشک سیب و گلابی بوده و نقش سیستم‌های تنظیم دو جزئی در آن به خوبی مشخص شده است.

به دلیل آنکه بیشتر سیستم‌های انتقال سیگنال دارای دو بخش هستند لذا این سیستم‌ها، سیستم‌های تنظیم دو جزئی (TCS) نامیده می‌شود. به طور مشخص چنین سیستم‌هایی شامل یک پروتئین کیناز حسگر مخصوص، معمولا در غشای سیتوپلاسمی و یک پروتئین تنظیم کننده پاسخ، موجود در سیتوپلاسم هستند. این سیستم‌ها نقش مهمی را در تنظیم فرآیندهای فیزیولوژیکی در پاسخ به پارامترهای سلولی یا محیطی بازی می‌کنند و به باکتری در سازش یافتن به تغییرات شرایط محیطی کمک می-کنند؛ نقش سیستم انتقال دو جزئی به نام BaeSR در تنظیم بیان پمپ‌های تراوشی چند دارویی در *E amylovora*. روشن شده است. تنظیم کننده‌های فوق هر دو در پاسخ به آسیب پوشش سلولی ( damage of the cell envelope) فعال می‌شوند. رگولون BaeSR شامل سیستم دو جزئی BaeSR ، ناقل‌هایی از خانواده بزرگ RND شامل AcrD و MdtABS و چاپرون Spy پری‌پلاسمایی است، که به طیف وسیعی از استرس-های محیطی از جمله: تشکیل اسفروپلاست (spheroplast)، و قرارگیری در معرض اندول‌ها، تانین-ها، فلاوونوئیدها و روی پاسخ می‌دهد (۴۸).

ارتباط تنظیم‌کننده سراسری PhcA که به طور مثبت و منفی بسیاری از ژن‌های مسئول در بیماری‌زایی باکتری *R.solanacearum*، از جمله ترشح پلی ساکاریدهای خارج سلولی، را کنترل می

[1] local repressors
[2] global response regulators
[3] two component systems

کند (۴۹) و همچنین تنظیم کننده سیستم ترشحی نوع سوم، HrpA (۵۱،۵۰)، با سیستم‌های تراوشی AcrAB و DinF نیز مشخص شده است. به موازات بیان شدن *PhcA* در شرایط غلظت بالای بیان سلولی، از میزان بیان *acrAB* کاسته می‌شود، همچنین HrpB به صورت منفی باعث کنترل بیان *dinf* می‌شود. علاوه بر این فاکتور سیگما پاسخ دهنده به استرس نیز برای بیان *acrAB* در شرایط غلظت بالای سلولی نیاز است (۳۸).

## نتیجه گیری و پیشنهاد

وجود پمپ‌های MDR برای باکتری‌های همراه گیاهی ضروری به نظر می‌رسد، از آنجا که یکی از مهم‌ترین مراحل در برهمکنش باکتری‌های همراه گیاهی به خصوص بیمارگرها، استقرار اولیه روی میزبان است باکتری‌ها باید توانایی چیره شدن بر ترکیبات ضدمیکروبی موجود در ریزوسفر گیاهی را داشته باشند، بنابراین مکانیسم‌های مقاومتی در باکتری‌ها نقش بسیار مهمی را در این خصوص ایفا می‌کنند، که در این بین سیستم‌های تراوشی چند دارویی، یکی از این مکانیسم‌های مهم در سم زدایی سلولی در باکتری‌هاست. علاوه بر آن، از دیگر نقش-های این سیستم در باکتری‌های همراه گیاهی می‌توان به نقش در رقابت، پرآزاری، مقاومت بیوفیلم به ترکیبات ضد میکروبی، تولید گره و تثبیت نیتروژن دانست. پس می‌توان گفت که پمپ‌های MDR با تسهیل در بقای اولیه باکتری در زیست‌گاه، استقرار یافتن در میزبان و بعلاوه خارج کردن مواد ضد میکروبی، شرایط رقابت با دیگر باکتری‌های اپی‌فیت را مهیا کرده و هم چنین با مشارکت در ترشح عوامل پرآزاری مانند فیتوتوکسین‌ها در میزبان، نقش مهم خود را باکتری‌های های همراه گیاهی نشان می‌دهند. از آنجایی که در ارتباط با باکتری‌های همراه گیاهی نسبت به باکتری‌های بیماری‌زای بالینی تحقیقات کمتری در رابطه با پمپ‌های تراوشی صورت گرفته است، بنابراین پیشنهاد می‌شود برای درک هرچه بهتر سیگنال‌های پیچیده‌ای که بین پاتوژن و گیاه بوجود می‌آید تحقیقات گسترده‌تری در این خصوص صورت گیرد، علاوه بر آن در خصوص کنترل بیولوژیک باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی پیشنهاد می‌شود به دنبال بازدارنده‌های طبیعی برای این پمپ‌های تراوشی در باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی بود.

## منابع مورد استفاده


1. Nikaido H. (1994). Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 264:382–88.
2. Singh S. K., Grass G., Rensing C. & Montfort W. R. (2004). Cuprous oxidase activity of CueO from Escherichia coli. Journal of Bacteriology 186(22): 7815–7817.
3. Singh S. K., Roberts S. A., McDevitt S. F., Weichsel A. & Wildner G. F. (2011). Crystal structures of multi-copper oxidase CueO bound to copper (I) and silver (I): functional role of a methionine-rich sequence. Journal of Biological Chemistry 286(43): 3849–3857.
4. Nies D. H. (2013). RND efflux pumps for metal cations. pp. 79–121. In: E.W. Yu, Q. Zhang & M.H. Brown(eds). Microbial Efflux Pumps: Current Research 1. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
5. Delmar J. A., Su C. C., & Yu E. W. (2014). Bacterial Multidrug Efflux Transporters, Annual Review of Biophysics 43, 93–117.
6. Routh M. D., Zalucki Y., Su C., Long F. & Zhang Q. (2011). Efflux pumps of the resistance nodulation division family: a perspective of their structure, function, and regulation in gram-negative bacteria. Pp. 109–46. In: E.J.Toone (ed.). Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology, Vol. 77. Hoboken, NJ, Wiley.

7. Nikaido H. (1989). Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 33(11):1831–36.
8. Kumar S., Mukherjee M. M. & Varela M. F. (2013). Modulation of bacterial multidrug resistance efflux pumps of the major facilitator superfamily. International Journal of Bacteriology 1-13.
9. Nikaido H. (1996). Multidrug efflux pumps of gram-negative bacteria. Journal Bacteriology 178(20): 5853–5859.
10. Higgins C. F. (2007). Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature 446: 749–57.
11. Ninio S. & Schuldiner S. (2003). Characterization of an archaeal multidrug transporter with a unique amino acid composition. The Journal of Biological Chemistry 278: 12000–12005.
12. Palumbo J. D., Kado C. I. & Phillips D. A. (1998). An isoflavonoid-inducible efflux pump in Agrobacterium tumefaciens is involved in competitive colonization of roots. Journal of Bacteriology 180:(12)3107-3113.
13. Piddock L. J. (2006). Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clinical Microbiology Reviews 19: 382–402.
14. Chuanchuen R., Beinlich K., Hoang T. T., Becher A., Karkhoff-Schweizer R. R. and Schweizer H. P. (2001). Cross-resistance between triclosan and antibiotics in Pseudomonas aeruginosa is mediated by multidrug efflux pumps: exposure of a susceptible mutant strain to triclosan selects nfxB mutants overexpressing MexCD-OprJ. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45: 428–432.
15. Harrison J. J., Rabiei M., Turner R. J., Badry E. A., Sproule K. M. & Ceri H. (2006). Metal resistance in Candida biofilmes. FEMS Microbiology Ecology 3: 479–491.
16. Silver S & Phung L. T. (1996). Bacterial heavy metal resistance: new surprises. Annual Review of Microbiology 50: 753–789
17. Silver S & Phung L. T.( 2005). A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 32: 587–605.
18. Fletcher J. I., Haber M., Henderson M. J. & Norris M. D. (2010). ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. Nature Reviews Cancer 10(2): 147-156.
19. Ren Q. & Paulsen I. T. (2005). Comparative analyses of fundamental differences in membrane transport capabilities in prokaryotes and eukaryotes. PLOS Computational Biology 1: e27.
20. Mira A., Ochman H. & Moran N. A. (2001). Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. Trends in Genetics 17: 589–596.
21. Cases I., de Lorenzo V. & Ouzounis C. A. (2003). Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. Trends in Microbiology 11: 248–253.
22. Martinez J. L., Fajardo A., Garmendia L., Hern´andez A., Linares J. F., Mart´ınez-Solano L. & S´anchez M. B. (2009). A global view of antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews; 33: 44–65.
23. Li X. Z. & Nikaido H. (2010). Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. Drugs. 69: 1555–1623.
24. Piddock L. J. (2006). Multidrug-resistance efflux pumps–not just for resistance. Nature Reviews Microbiology 4: 629–636.
25. Fernando D. M. & Kumar A. (2013). Resistance-Nodulation-Division Multidrug Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: Role in Virulence. Antibiotics 2: 163-181.
26. Costa Tiago R. D., Felisberto-Rodrigues C., Meir A., Marie S., Prevost A., Redzej-Trokter M. & Waksman G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights, Nature Review 13: 343-359.
27. Kuroda T. & Tsuchiya T. (2009). Multidrug efflux transporters in the

MATE family. Biochimica et Biophysica Acta 1794: 763-768.
28. Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S. & Vivanco J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57: 233–266.
29. Dixon R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance, interactions with plants and other organisms. Annual Review of Plant Biology 57: 233–266.
30. Harborne J. B. (1999). The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. Biochemical Systematics and Ecology 1999; 27: 335-367.
31. Barabote R. D., Johnson O. L., Zetina E., San Francisco S. K., Fralick J. A. & San Francisco M. J. (2003). Erwinia chrysanthemi tolC is involved in resistance to antimicrobial plant chemicals and is essential for phytopathogenesis. Journal of Bacteriology 185: 5772–5778.
32. Matilla M. A., Espinosa-Urgel M., Rodriguez-Herva J. J., Ramos J. L. & Ramos-Gonzalez M. I. (2007). Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. Genome Biology 8: R179.
33. Vanneste J. (2000). Fire blight: The disease and its causative agent, Erwinia amylovora. CABI Publishing, Oxon, UK.
34. Valecillos A. M., Palenzuela P. R. & Lopez-Solanilla E. (2006). The role of several multidrug resistance systems in Erwinia chrysanthemi pathogenesis. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 19: 682-694.
35. Burse A., Weingart H. & Ullrich M. S. (2004). The phytoalexininducible multidrug efflux pump AcrAB contributes to virulence in the fire blight pathogen, Erwinia amylovora. Molecular Plant-Microbe Interactions. 17: 43–54.
36. Wang D., Korban S. S. & Zhao Y. (2009). The Rcs phosphorelay system is essential for pathogenicity in Erwinia amylovora. Molecular Plant Pathology 10: 277–290.
37. Pletzer D., Stahl A., Elisabet-Oja1 A. & Weingart H. (2015). Role of the cell envelope stress regulators BaeR and CpxR in control of RND type multidrug efflux pumps and transcriptional cross talk with exopolysaccharide synthesis in Erwinia amylovora. Archives of Microbiology 197(6): 185-190.
38. Brown D. G., Swanson J. K. & Allen C. (2007). Two host-induced Ralstonia solanacearum genes, acrA and dinF, encode multidrug efflux pumps and contribute to bacterial wilt virulence. Applied and Environmental Microbiology 73: 2777–2786.
39. Cho H. & Kang H. ( 2012). The PseEF Efflux system is a virulence factor of Pseudomonas syringae pv. syringae. Journal of Microbiology 50(1): 79–90.
40. Bradbury J. F. (1986). Guide to Plant Pathogenic Bacteria. CAB International, England, 332p.
41. Hutchison M. L. & Gross D. C. (1997). Lipopeptide phytotoxins produced by Pseudomonas syringae pv. syringae: Comparison of the biosurfactant and ion channel-forming activities of syringopeptin and syringomycin. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 10: 347–354.
42. Vargas P., Felipe A., Micha´n C. & Gallegos M. T. (2011). Induction of Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 MexAB-OprM multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor PmeR. Molecular Plant-Microbe Interactions Journal 10: 1207–1219.
43. Nies D. H. (2003). Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. FEMS Microbiology Reviews 27: 313–339.
44. Waldron K. J., Rutherford J. C., Ford D. & Robinson N. J. (2009). Metalloproteins and metal sensing. Nature 460: 823–830.
45. Muranaka L. S., Takita M. A., Olivato J. C., Kishi L. T. & de Souzaa A. A. (2012). Global Expression Profile Biofilm Resistance to Antimicrobial Compounds in the Plant-Pathogenic Bacterium Xylella fastidiosa Reveals

Evidence of Persister Cells. Journal of Bacteriology 194(17): 4561–4569.
46. Rodrigues CM, Takita MA, Coletta-Filho HD, Olivato JC, Caserta R, Machado MA, and de Souza, A. (2008). Copper resistance of biofilm cells of the plant pathogen Xylella fastidiosa. Applied Microbiology and Biotechnology 77: 1145–1157.
47. Sun J., Deng Z. & Yan A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations, Biochemical and Biophysical Research Communications 453: 254-267.
48. Zoetendal E. G., Smith A. H., Sundset M. A. & Mackie R. I. (2008). The BaeSR two-component regulatory system mediates resistance to condensed tannins in Escherichia coli. Applied and Environmental Microbiology 74: 535–539.
49. Schell M. A. (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of Ralstonia solanacearum by an elaborate sensory array. Annual Review of Phytopathology 38, 263–292.
50. Cunnac S., Occhialili A., Barberis P., Boucher C. & Genin S. (2004). Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in Ralstonia solanacearum: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. Molecular Microbiology 53: 115–128.
51. Mukaihara T., Naoyuki T., Murata Y. & Iwabuchi M. (2004). Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in Ralstonia solanacearum. Molecular Microbiology 54: 863–875.