فصلنامه علمی پژوهشی فیزیولوژی و تکوین جانوری
شماره پیاپی ۵۷، جلد۱۵ شماره ۱، زمستان ۱۴۰۰، صفحه ۴۷تا ۵۹
Qjaphd.sinaweb.net ISSN: ۹۸۸۰-۱۷۳۵

مطالعه فلور میکروبی روده جوجه های محلی برای یافتن پروبیوتیک های باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس و بررسی تاثیر آن بر بیان ژن های بیماری زای ctxm و luxs در جدایه های بیماری زای اشریشیاکولی

زهرا الهیان فیروز[۱]، **مجید باصری صالحی**[۲]، مسعود قانع[۳]
۱- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، کشاورزی و فناوری‌های نوین، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران
۲- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران. **majidbaseri@hotmail.com**
۳- گروه میکروب‌شناسی، دانشکده علوم، واحد تنکابن، دانشگاه آزاد اسلامی، تنکابن، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۵/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

چکیده

زمینه و هدف: از آنتی‌بیوتیک‌ها به‌طور گسترده‌ای در سراسر جهان استفاده می‌شود. بااین‌حال، به دلیل ظهور مقاومت آنتی‌بیوتیکی در طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، استفاده از آن‌ها در سطح جهانی دچار شکست بزرگی شده است. استفاده از پروبیوتیک‌ها به‌عنوان درمان مکمل و جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها مطرح‌شده‌اند. هدف از پژوهش حاضر بررسی اثرات پروبیوتیک‌های جداشده از مرغ‌های محلی بر بیان ژن‌های luxS, ctxM در اشریشیاکلی مقاوم به درمان بود.

روش کار: ۳۰۰ نمونه مدفوعی در فاصله اردیبهشت تا مهرماه سال ۱۳۹۹ از بیماران مراجعه‌کننده به بیمارستان امام خمینی تهران اخذ شد و با محیط‌های کشت اختصاصی و آزمایش‌های بیوشیمیایی نمونه‌های اشریشیاکلی جداسازی شد و سپس توسط PCR با پرایمرهای اختصاصی وجود ژن‌های luxS و ctxM مورد شناسایی قرار گرفت. جهت استخراج سویه‌های بومی باسیلوس کوآگولانس و باسیلوس سوبتلیس محتویات روده تعداد ۹ قطعه جوجه محلی که هیچ آنتی‌بیوتیکی مصرف نکرده بودند کشت، جداسازی و توسط روش‌های بیوشیمیایی و PCR شناسایی شد. سویه‌های تجاری باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس برای مقایسه اثرات با باکتری‌های بومی خریداری شده و در ادامه این سویه‌ها در کشت هم‌زمان با سویه‌های اشریشیاکلی مقاوم به درمان حاوی ژن‌های ctxm و luxs قرار گرفتند. جهت بررسی تأثیر این پروبیوتیک‌ها بر بیان ژن‌ها از ریل تایم PCR استفاده شد.

یافته ها: از ۳۰۰ نمونه مدفوعی گرفته‌شده ٤٠ جدایه(۷/۵ درصد) اشریشیاکلی به دست آمد؛ که ۱۳ نفر از نمونه‌ها(۳۲/۵ درصد) مربوط به بیماران سرپایی و ۲۷ نفر را(٦٧/٥ درصد) بیماران بستری تشکیل می‌دادند. همه ایزوله‌ها از زنان و مردان با رنج سنی بین ۲۱ تا ٦٢ سال جداشده بودند. ٤ سویه اشریشیاکلی جداشده از بیماران حامل ژن‌های ctxM, luxS, بودند. جداسازی باسیلوس کوآگولانس و باسیلوس سوبتلیس از نمونه‌ها با آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تائید شد. سویه تجاری باسیلوس کوآگولانس بیان ژن‌های، ctxM, luxS را به ترتیب به میزان ۳/۳، ۲/۷ برابر کاهش و سویه بومی بیان این ژن‌ها را به ترتیب ۳/٦، ۲/۲ برابر نسبت به گروه کنترل در باکتری اشریشیاکلی کاهش داد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که بین حضور پروبیوتیک‌های بومی و تجاری موجود درکشت و کاهش بیان ژن‌های ctxM و luxS ارتباط معنی‌داری وجود دارد.

نتیجه‌گیری: مصرف مکمل باسیلوس کوآگولانس و باسیلوس سوبتلیس با کم کردن بیان ژن‌های مقاومت باعث افزایش تأثیر آنتی‌بیوتیک‌ها بر اشریشیاکلی مقاوم به درمان می‌شوند.

واژه های کلیدی: پروبیوتیک، اشریشیاکلی، باسیلوس کوآگولانس، باسیلوس سوبتلیس ctxm، luxs.

مقدمه

استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها راحت‌ترین و در دسترس‌ترین راه برای مقابله با عفونت‌هاست(۳۷). در سال ۲۰۱۶ میزان

مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها در ایران ۱۱۷۸.۱ تن در سال گزارش‌شده است؛ که باعث شده این کشور در رتبه سوم مصرف آنتی‌بیوتیک در دنیا بعد از برزیل و ترکیه قرار بگیرد(۲۶). مطالعات آینده‌نگر پیش‌بینی کرده‌اند که عفونت‌های مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها تا سال ۲۰۵۰ بیشتر از سرطان‌ها باعث مرگ‌ومیر خواهد شد و هزینه‌ای حدود ۱۰۰ تریلیون دلار به سیستم‌های درمانی تحمیل خواهد کرد که این باعث کاهش درآمد ۲/۵ تا ۳/۵ درصدی کشورها خواهند شد(۱۴). بسیاری از تکنیک‌های پزشکی مثل سزارین، شیمی‌درمانی، ایمپلنت‌های مفصلی و پیوند عضو شدیداً به آنتی‌بیوتیک‌ها وابسته هستند که با کاهش کارآیی آنتی‌بیوتیک‌ها، این بخش‌ها به شکل روزافزون آسیب‌پذیرتر می‌شوند که احتمالاً در آینده بعضی از این روش‌ها و درمان‌های پزشکی به‌طور کامل غیرممکن خواهد شد(۲۷). به احتمال زیاد عفونت‌هایی مانند سل، مالاریا و اشریشیاکلی مشکلات آینده سلامتی جهان خواهند بود و بیشتر از بسیاری از سرطان‌ها انسان‌ها را به کام مرگ خواهند کشاند(۲۵). جستجوی آنتی‌بیوتیک‌های جدید و جایگزین با توجه به روند کند و چالش‌برانگیز آن برای شرکت‌های داروسازی جذاب نیست و سرمایه‌گذاری در این حوزه با مشکلات جدی مواجه است(۲۰). بنابراین تولید آنتی‌بیوتیک‌های جدید با از دست رفتن کارایی آنتی‌بیوتیک‌های موجود متناسب نیست؛ که این روند باعث توجه به روش‌هایی جایگزین یا مکمل برای آنتی‌بیوتیک درمانی است(۲۱). در سال‌های اخیر مطالعات زیادی درباره موادی که اثرات آنتی‌بیوتیکی داشته باشند شده است که ازجمله می‌توان به نانو ذرات، مایعات یونی، عصاره‌های مختلف و پروبیوتیک‌ها اشاره نمود(۸). پروبیوتیک‌ها جزء جدانشدنی غذاهای انسان از اوایل دوران تکامل بودند و بسیاری از این سویه‌ها در بدن موجودات مختلف به‌صورت همزیست وجود دارند و به همین دلیل نسبت به ترکیبات صناعی مثل نانو ذرات اثرات جانبی کمتری برای میزبان به همراه دارند(۱۱). پروبیوتیک‌ها از طریق تعدیل میکروبی روده، حذف عوامل بیماری‌زا، تأثیر بر بیان برخی از ژن‌ها و تنظیم سیستم ایمنی سلامتی میزبان را بهبود می‌بخشند(۱۰). با این حال، برای این که یک سویه پتانسیل پروبیوتیک شدن را دارا باشد، باید بیماری‌زا نباشد، شرایط گوارشی(اسید و صفرا) را تحمل کند، قادر باشد به مخاط دستگاه گوارش بچسبد و فعالیت‌های ضدمیکروبی در برابر عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش را داشته باشد(۵). توأم شدن ژن‌های بیماری‌زا با مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی باعث افزایش شدید طول درمان و مرگ‌ومیر مبتلایان به عفونت‌ها شده است(۲). در سال‌های اخیر عفونت‌های مکرری از اشریشیاکلی مقاوم به درمان در کشورهای مختلف گزارش‌شده است(۳۸) که بررسی‌های مولکولی این عفونت‌ها نشان داده است که ژن‌های بیماری‌زایی مانند luxs، eae و flu در این پاتوژن‌ها با ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی مثل ctxm SHV, TEM, OXA, همراه شده‌اند(۲۸). تشکیل بیوفیلم یکی از عوامل اصلی افزایش قدرت بیماری‌زایی و مقاومت به درمان در باکتری اشریشیاکلی است. یکی از عوامل اصلی تولید بیوفیلم در باکتری اشریشیاکلی ژن luxs می‌باشد با فرآیند کروم‌سنسیگ باعث تجمع باکتریایی و تشکیل بیوفیلم می‌شود(۲۳). ژن‌های بتالاکتاماز وسیع‌الطیف گروه CTX-M نیز به‌عنوان یک مکانیسم مهم مقاومت در مقابل سفالوسپورین در اشریشیاکلی شناخته‌شده‌اند و به‌سرعت در حال افزایش‌اند که باعث مقاومت جدی به درمان در این باکتری‌ها شده است(۳۰). گزارش‌ها نشان داده است که توأم شدن هم‌زمان ژن luxs با CTX-M قدرت بیماری‌زایی و مقاومت به درمان را در باکتری اشریشیاکلی به‌شدت افزایش داده است(۲۸). با توجه بر این‌که

آنتی‌بیوتیک‌ها کارایی چندانی در مقابله با این نوع از باکتری‌ها ندارند هدف از مطالعه حاضر غربالگری پروبیوتیک‌های اسپوردار با پتانسیل ممانعتی بر بیان ژن‌های بیماری‌زا ctxm و luxs در باکتری اشریشیاکلی جداشده از عفونت‌های گوارشی بود.

مواد و روش ها

پس از اخذ مجوزهای لازم و کد اخلاق به شماره Ir.iau.shiraz.rec.1398.023 از دانشگاه آزاد اسلامی واحد شیراز از ۳۰۰ بیمار که به دلیل مشکلات گوارشی به بیمارستان امام خمینی تهران از تاریخ اردیبهشت تا مهرماه سال ۱۳۹۹ مراجعه کرده بودند نمونه مدفوعی بعد از کسب رضایت و پر کردن پرسشنامه دموگرافیک گرفته شد؛ و بر روی دو محیط پایه آگار خونی و مک کانکی آگار کشت داده شد. پس از گرمخانه گذاری دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت تعداد ۵ کلنی لاکتوز مثبت و ۲ کلنی لاکتوز منفی از روی محیط مک‌کانکی انتخاب کرده جداگانه در محیط TSI کشت داده شدند(۱۳,۲۲)؛ آزمون‌های SIM، MR/VP، TSI اوره و سیمون سیترات و لیزین دکربوکسیلاز، اوره‌آز، آرابینوز، اورنیتین انجام گردید و نتایج را بعد از مدت‌زمان ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس جهت جداسازی اشریشیاکلی موردبررسی قرار گرفت(۲۲). DNA نمونه‌ها با استفاده از کیت (peqGOLD Bacterial DNA Kit peQlab, Erlangen, Germany) استخراج شد. عملیات PCR Multiplex با پرایمرهای جدول ۱ که توسط نرم‌افزار Oligo 7 طراحی و با Primer Blast پایگاه داده NCBI ارزیابی قرارگرفته بودند و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی سنتز شدند انجام گرفت. الکتروفروز محصولات PCR در آگارز ۱٪ انجام گرفت و ژن‌های مرتبط بر اساس وجود باند با وزن مشخص ثبت و تحلیل شد و نمونه‌هایی که هر دو ژن luxS و ctxm را داشتند جهت آزمایش‌های بعدی فریز و نگهداری شدند. در مرحله بعد تعداد ۱۰ عدد جوجه محلی با سن ۶ تا ۱۸ ماهه از مناطق روستایی نوشهر استان مازندران، ایران در مهرماه ۱۳۹۹ خریداری شدند. سن این جوجه‌ها بین ۶ تا ۱۸ ماه بود و به‌صورت خانگی بزرگ‌شده بودند و هیچ‌گونه آنتی‌بیوتیک و پروبیوتیک در غذای آن‌ها استفاده‌نشده بود. بعد از یوتانایز کردن طبق اصول اخلاقی در شرایط استریل محتویات روده در فالکون‌های استریل جمع‌آوری گردید. محتویات روده در آب پپتون بافری (Buffered peptone-water) رقیق شدند و با استفاده از حرارت ۸۰ درجه سلسیوس باکتری‌های بدون اسپور از بین رفته و اسپور موجود در نمونه‌ها جمع‌آوری گردید. ۰/۱ میلی‌لیتر از هر سوسپانسیون بر روی محیط کشت آگار مغذی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد و کلنی‌های به‌دست‌آمده به‌صورت خطی کشت مجدد داده شد. با انجام تست API هویت این باسیلوس‌ها بعد از تائید در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در LB یا DSM رشد داده شدند. تست کاتالاز، هیدرولیز آرژینین، همولیز، مقاومت به اسیدهای صفراوی و تحمل اسید برای سنجش قابلیت پروبیوتیک بودن بر روی جدایه‌ها انجام گرفت و جدایه‌هایی که شرایط پروبیوتیک بودن را داشتند انتخاب و تحت استخراج DNA با کیت قرار گرفتند. از پرایمرهای SrRNA۱۶ (جدول ۱) برای انجام PCR استفاده شد و الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۲٪ مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت و درنهایت نمونه‌ها برای انجام توالی‌یابی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال شد. نتایج به‌دست‌آمده از توالی‌یابی، در پایگاه اطلاعاتی GenBank توسط الگوریتم BLAST آنالیز شد. در این آزمایش از باکتری‌های اشریشیاکلی انتروهموراژیک O157: H7 و باسیلوس سوبتلیس ATCC: 6633 که از انستیتوپاستور ایران، تهران خریداری‌شده بود جهت نمونه‌های کنترل

مثبت استفاده شد. برای بررسی بیان ژن‌های ctxm و luxs در باکتری اشریشیاکلی و پروبیوتیک‌ها تحت کشت هم‌زمان (Co-culture) قرار گرفتند به این صورت که باکتری‌های اشریشیاکلی و پروبیوتیک‌های تجاری و بومی اسپوردار بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید(۲۹). بعد از مدت ۲۴ ساعت کلنی‌های تازه پروبیوتیک‌ها به محیط نوترینت براث برده شد. بعد از ۲۴ ساعت سوسپانسیون باکتری‌ها سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت باکترهای موردنظر جدا شد و پس از فیلتر کردن به محیط کشت نوترینت براث اضافه شد. سپس در لوله‌های حاوی محیط کشت و سوپرناتانت سویه‌های اشریشیاکلی کشت داده شدند(۹). برای انجام آزمایش بیان ژن‌های موردنظر از روش ریل تایم PCR استفاده شد. به این منظور RNA باکتری در فاز لگاریتمی رشد با جذب نوری ۰/۰۸ تا ۰/۱ از باکتری‌های اشریشیاکلی توسط کیت (ساخت شرکت Roch) استخراج شد. از ژن SrRNA۱۶ نیز به‌عنوان اینترنال کنترل استفاده شد. برای سنجش نسبت بیان ژن‌های ctxm,luxS نسبت به ژن کنترل SrRNA۱۶ در نمونه‌های تیمار شده با پروبیوتیک بومی و نمونه‌های تیمار شده با پروبیوتیک تجاری از دستگاه Rotor gene استفاده شد. میزان معنی‌داری آماری در تمام مراحل ۰/۰۵ در نظر گرفته شد و از نرم‌افزار REST© (Relative expression software tool 2009) برای مقایسه بین گروه‌ها استفاده شد.

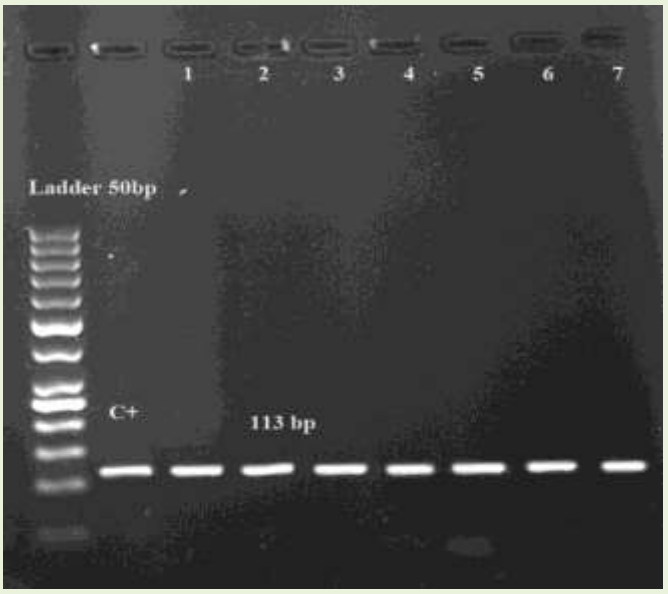
نتایج

از ۳۰۰ نمونه مدفوعی گرفته‌شده ۴۰ جدایه (۷/۵ درصد) خالص اشریشیاکلی به دست آمد که با آزمایش‌های بیوشیمیایی و مولکولی تائید شد. بررسی اطلاعات دموگرافیک نشان داد که ۱۳ نفر از نمونه‌ها (۳۲/۵ درصد) مربوط به بیماران سرپایی و ۲۷ نفر را (۶۷/۵ درصد) بیماران بستری تشکیل می‌دادند. همه ایزوله‌ها از زنان و مردان با رنج سنی بین ۲۱ تا ۶۲ سال جداشده بودند.نتایج PCR ژن‌ها، luxS, ctxM نشان داد که ۴ سویه اشریشیاکلی (۱۰٪ جدایه‌ها) حامل ژن‌های ctxM, luxS, بودند (شکل ۱ و ۲). نتایج آزمایش‌های بیوشیمیایی و API حاکی از این بود که باکتری‌های جداشده از محتویات روده جوجه‌های بومی باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس بود؛ نتایج نشان داد هر دو باسیلوس شناسایی‌شده کاتالاز مثبت و توانایی تحمل اسید و صفرا را دارا بودند. جدایه‌ها توانایی هیدرولیز آرژنین را نداشتند و همولیز منفی بودند.بررسی میزان بیان ژن‌های luxS, ctxM در نمودار ۱ و نمودار ۲ و همچنین شکل های ۳ و ۴ آورده شده است همان‌گونه که نمودار ۱ و شکل ۳ نشان می‌دهد سویه تجاری باسیلوس کوآگولانس میزان بیان ژن luxS در سویه اشریشیاکلی جداشده از بیماران را ۳/۳ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش داد (P=0.018) و اما سویه بومی آن بیان ژن را در سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از بیماران ۳/۶ برابر نسبت به حالت کنترل کاهش داد (P=0.021). سویه تجاری باسیلوس سوبتلیس میزان بیان ژن luxS در سویه اشریشیاکلی جداشده از بیماران را ۱/۱ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش داد (P=0.025) و سویه بومی آن بیان این ژن را در سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از بیماران ۱/۳۷ برابر نسبت به حالت کنترل کاهش یافت (P=0.028).سویه تجاری باسیلوس کوآگولانس میزان بیان ژن ctxM در سویه اشریشیاکلی جداشده از بیماران را ۲/۷ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش داد (P=0.026) و اما سویه بومی بیان این ژن را در سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از بیماران ۱/۵۹ برابر نسبت به حالت کنترل کاهش داد (P=0.02). سویه تجاری باسیلوس سوبتلیس میزان بیان ژن ctxM در سویه اشریشیاکلی جداشده از بیماران را ۲/۸ برابر نسبت به گروه کنترل کاهش داد

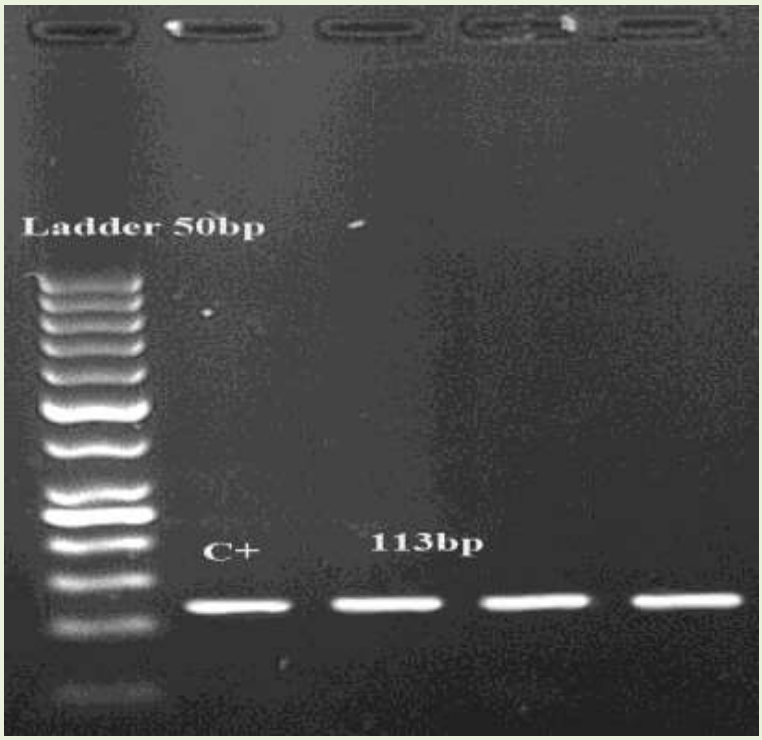
(P=0.031) و سویه بومی بیان این ژن را در سویه‌های اشریشیاکلی جداشده از بیماران ۲/۲ برابر نسبت به حالت کنترل کاهش داد (P=0.014) (نمودار ۲ و شکل ۴). همچنین مشاهده شد که باسیلوس سوبتلیس میزان بیان ژن، ctxM را نسبت به باسیلوس کولاگولانس بیشتر کاهش داد (P=0.031)؛ اما باسیلوس کوآگولانس اثر کاهش بیشتری روی بیان ژن luxS داشت (P=0.041). نتایج حاکی از اثر بهتر هر دو سویه بومی بر کاهش بیان ژن luxS نسبت به سویه تجاری بود (P<0.05)؛ اما در مورد ژن ctxM سویه تجاری عملکرد بهتری بر کاهش بیان ژن داشت (P=0.031).

جدول ۱- پرایمرهای مورداستفاده در پژوهش حاضر

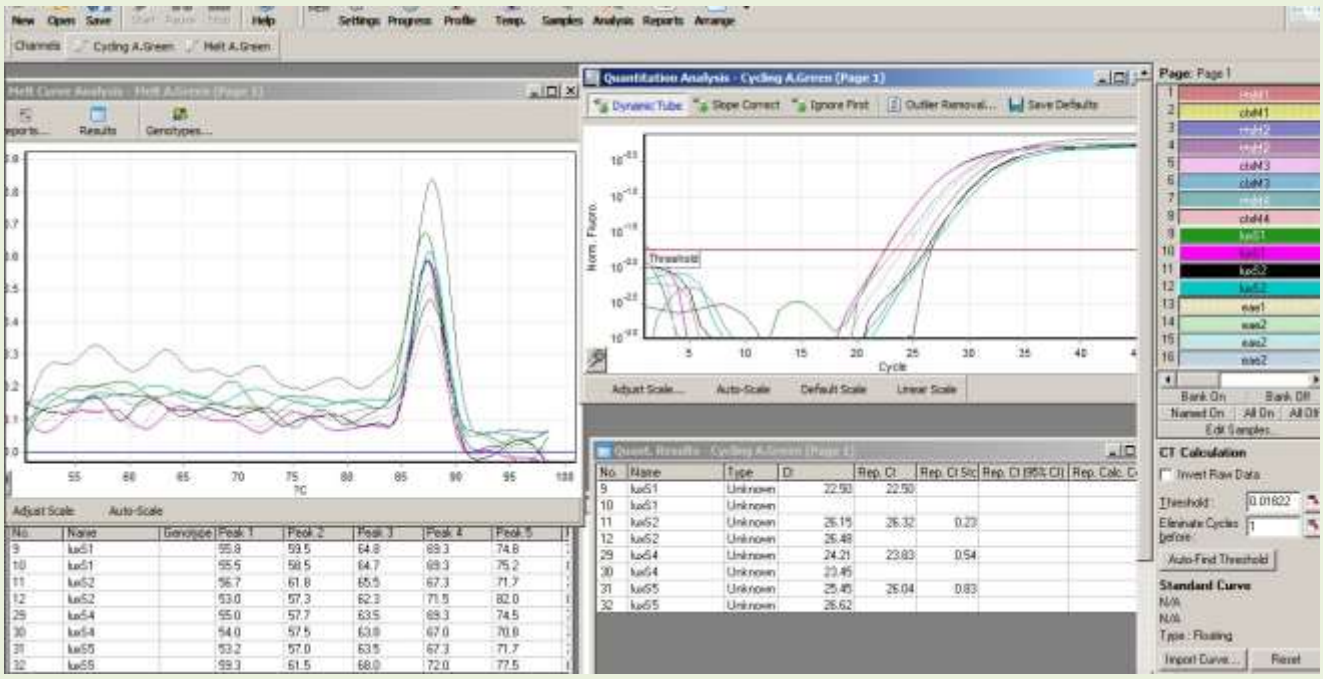
باکتری	ژن	توالی	اندازه محصول
Escherichia coli	*flu*	F; ACGGTAAATGGCGGACTGTT R; CACGGATGGTCAGGGTATCG	۱۲٤ bp
	luxS	F; GTGCCAGTTCTTCGTTGCTG R; GAACGTCTACCAGTGTGGCA	۱۱۳ bp
	16 srRNA	F;CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC R; CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	۱۹۰ bp
Bacillus coagulans	*16 srRNA*	AAAAGACATTGCCACCCCCA R: GGACCGATTTCAACAACGCC	۱٦٥ bp
Bacillus subtilis	*16 srRNA*	TGTTGATCACGCGGAAGTGA RAATGCCACGACCTTTTTCGC	۱۰۸ bp



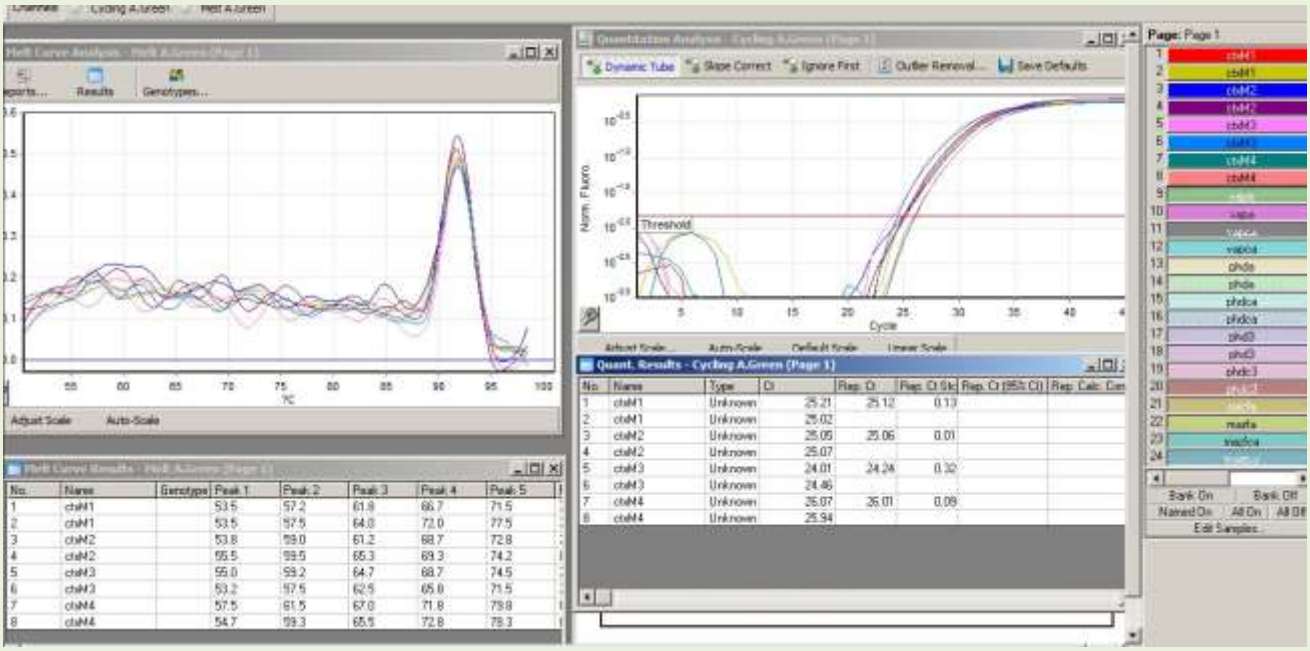
شکل ۱- باندهای اختصاصی ژن *luxS* *اشریشیاکلی* روی ژل الکتروفورز



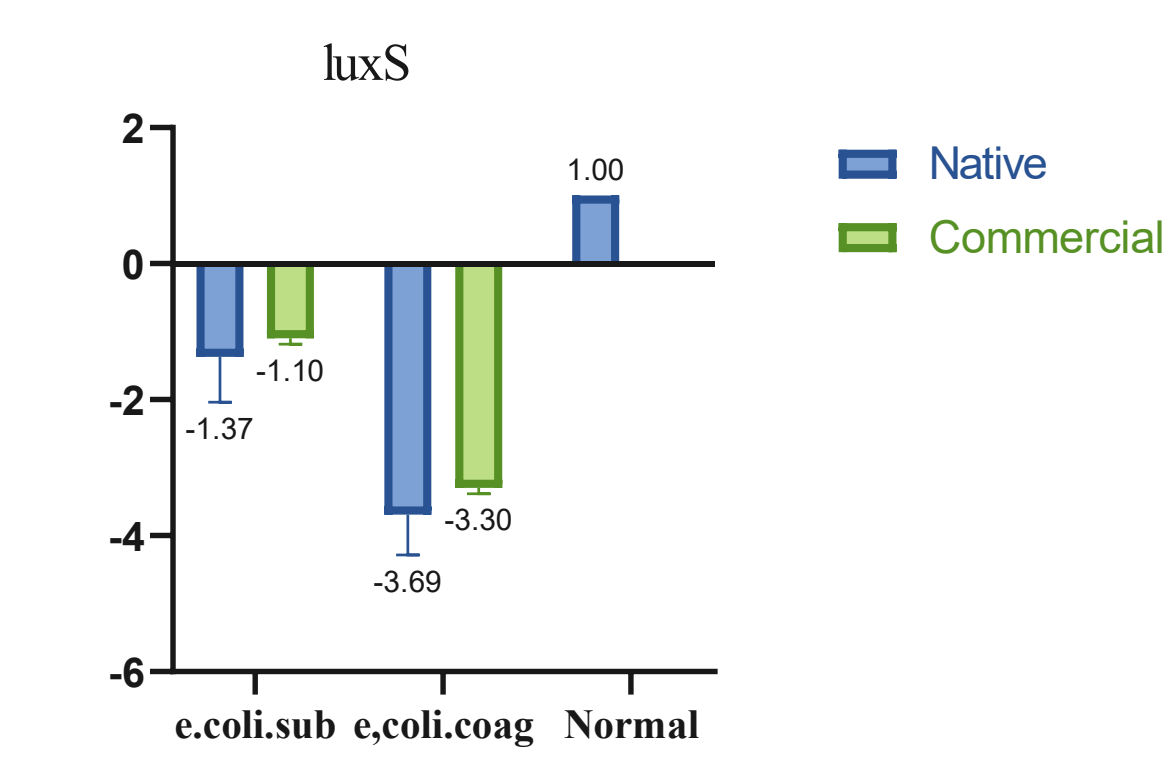
شکل ۲- باندهای اختصاصی ژن *ctxM* *اشریشیاکلی* روی ژل الکتروفورز.



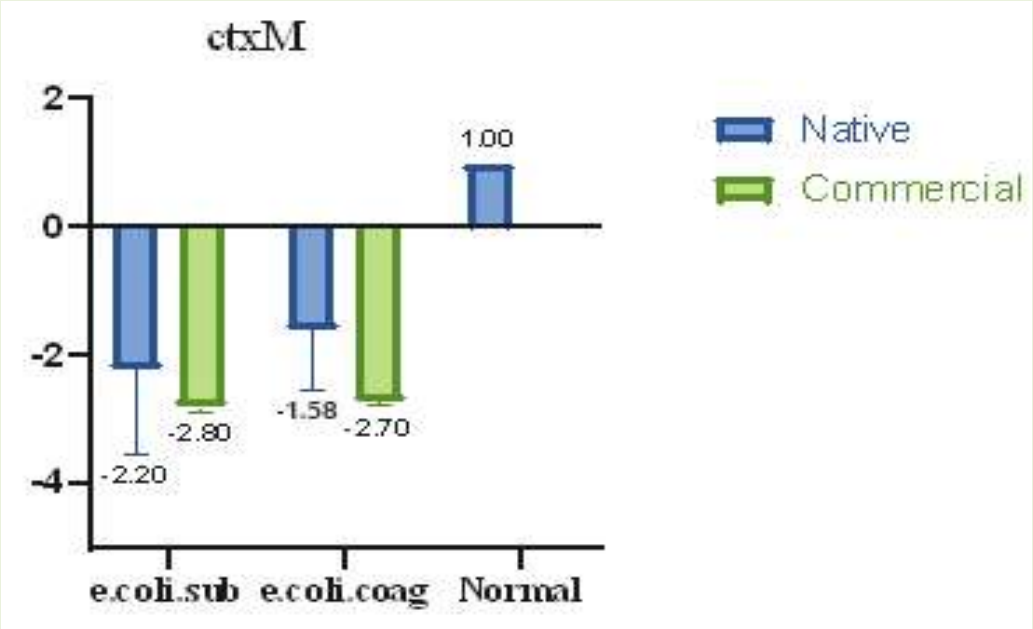
شکل ۳- منحنی ذوب و واکنش ژن *luxS*



شکل ٤- منحنی ذوب و واکنش ژن ctxM



نمودار ۱- مقایسه بیان ژن *luxS* در سویه کنترل و سویه‌های تیمار شده با پروبیوتیک



نمودار ۲- مقایسه بیان ژن *ctxM* در سویه کنترل و سویه‌های تیمار شده با پروبیوتیک

بحث و نتیجه گیری

اشریشیاکلی در سال‌های اخیر توانسته است که ژن‌های مقاومت و پاتوژن را در کنار هم قرار داده و همراه با افزایش قدرت بیماری‌زایی در مقابل درمان مصونیت پیدا کند(۲۸). یکی از راه‌های مقابله با چنین باکتری‌هایی استفاده از روش‌های جایگزین یا مکمل برای آنتی‌بیوتیک‌ها است. پژوهش حاضر باهدف غربال گری پروبیوتیک‌های اسپوردار با پتانسیل ممانعتی بر بیان ژن‌های بیماری‌زctxM، luxS در باکتری اشریشیاکلی جداشده از عفونت‌های گوارشی انجام یافت. بررسی نتایج نشان داد که باکتری اشریشیاکلی یکی از دلایل مهم ایجاد بیماری گوارش منجر به بستری در بیمارستان امام خمینی تهران است و ۱۰٪ از جدایه‌های اشریشیاکلی دارای ژن ctxM و luxS به‌صورت توأم هستند که باعث مقاومت شدید این باکتری‌ها به درمان و افزایش طول درمان می‌شود. فو و همکاران(۲۰۱۹) در پژوهشی سویه‌هایی از اشریشیاکلی جداسازی کردند که تقریباً به همه آنتی‌بیوتیک‌های موجود مقاوم بود و نیز حاوی بسیاری از ژن‌های بیماری‌زا بود(۱۲). در پژوهشی دیگر سئو و همکاران(۲۰۱۰) وجود هم‌زمان دو ژن ctxM و luxS را در جدایه‌های اشریشیاکلی برابر ۴٪ گزارش نمودند(۳۳). پژوهش شاوا و همکاران(۲۰۲۱) نشان داد که ۷٪ سویه های جدا شده اشریشیاکولی حامل هر دو ژنctxM، luxS بودند(۳۴). پژوهش دوا و همکاران نیز نشان داد که ۷٪ از اشریشیاکولی جدا شده از نمونه ها دارای هر دو ژن ctxM، luxS بودند و هم زمانی این ژن ها با ژن های مقاومت آنتی بیوتیکی باعث مقاومت بسیار شدید این باکتری ها نسبت به درمان می شود(۶). مطالعه حاضر هم چنین نشان داد که باکتری‌هایی در روده جوجه‌های محلی وجود دارند که این جانداران را که همه‌چیزخوار بوده و احتمال آلودگی بالایی دارند را محافظت می‌کند(۱۵) و این عوامل قابل جداسازی و استفاده است که در پژوهش حاضر دو جدایه باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس به دست آمد. آلتون و همکارش(۲۰۲۱) جدایه‌های باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس را از منابع محیطی جداسازی کردند و اثرات پروبیوتیک

آن‌ها را اثبات نمودند(۳). در پژوهشی آپاجلاهتی و همکاران در فنلاند باکتری های مختلفی از مرغ های محلی جداسازی کردند در بین این باکتری ها باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس نیز وجود داشت(۴). پژوهش ها نشان داده است که رژیم غذایی قوی ترین عامل تعیین کننده ساختار جامعه باکتریایی روده است. هم منبع خوراک و هم خوراک محلی، مشخصات باکتریولوژیکی را به طور قابل توجهی تغییر می‌دهند(۲۴)، ترکیبات خوراک مورد استفاده نقش به سزایی در تعدیل میکرو فلور روده و در نتیجه در پیش‌گیری از اختلالات گوارشی در حیوانات مزرعه دارد(۴). نتایج پژوهش حاضر نشان داد که پروبیوتیک‌ها در کشت هم‌زمان با اشریشیاکلی بیان ژن‌های luxS, ctxM نسبت به نمونه‌های تیمار نشده کاهش می‌دهند. تامتاجی و همکاران(۲۰۱۷) نیز مطالعه مبنی بر مقایسه اثر پروبیوتیک‌های بومی جداشده از ماست محلی با سویه‌های تجاری بر بازدارندگی رشد و بیان ژن‌های پاتوژن اشریشیاکلی انجام دادند، نتایج نشان داد که حضور پروبیوتیک‌ها با کاهش بیان ژن‌های موردبررسی همراه بوده است(۳۵). جیانگ و همکاران مطالعه بر روی اثر پروبیوتیک و ژن‌های مؤثر در کوروم‌سنسینگ سودوموناس آئروژینوزا که نقش مهمی در تنظیم ژن بیماری‌زایی این باکتری دارد انجام دادند پس از کشت هم‌زمان این باکتری با پروبیوتیک مشاهده کردند که بیان این ژن luxS و به دنبال آن بیان ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری کاهش یافت(۱۸). در تائید نتایج حاصل از پژوهش حاضر امر ریگوبلو و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطالعه‌ای با هدف بررسی یک ترکیبی از پروبیوتیک‌های بر میزان شیگا توکسین(STEC) در اشریشیاکلی موجود در مدفوع گوسفند و بیان ژن‌های ctxM، stx2 و eae مربوط به اتصال این سویه‌ها انجام دادند. نتایج مطالعه حاکی از روند رو به کاهش تعداد باکتری اشریشیاکلی در مدفوع و هم چنین متقابلاً کاهش بیان ژن‌های بیماری‌زایی و ژن ctxM دخیل در فرآیند بیماری زایی باکتری به بود(۳۱). مطالعه حاضر نیز نشان دهنده نقش مهم دو پروبیوتیک باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس کوآگولانس در کاهش بیان ژن‌های دخیل در اتصال باکتری به سلول‌های میزبان بود؛ و با توجه به این که سویه‌های بومی مورد استفاده در این مطالعه اثری مشابه و در مواردی بهتر از سویه تجاری مورداستفاده داشتند می‌توان با استفاده از منابع حاوی این دو پروبیوتیک در صورت در دسترس نبودن نوع تجاری از این منابع استفاده کرد و باعث کاهش بار پاتوژن شد. بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های پروبیوتیک فعالیت مهاری را بر ویژگی‌های مختلف پاتوژنز باکتری‌های بیماری‌زا نشان می‌دهند(۲۷). در همین راستا کوتار و همکاران مطالعه بر روی اثر ترکیبی پروبیوتیک و ژن‌های مؤثر در کوروم سنسینگ سودوموناس آئروژینوزا که نقش مهمی در تنظیم ژن بیماری‌زایی این باکتری دارد انجام دادند پس از کشت هم‌زمان این باکتری با پروبیوتیک مشاهده کردند که بیان این ژن luxS و به دنبال آن بیان ژن‌های بیماری‌زایی این باکتری کاهش یافت(۷) در مطالعه حاضر نتایج کشت هم زمان اشریشیاکلی جداشده از بیماران دارای عفونت گوارشی و باسیلوس سوبتیلیس و باسیلوس کوآگولانس حاکی از اثر کاهشی این پروبیوتیک‌ها بر بیان ژن luxS که نقش مهمی در تنظیم سیگنالینگ باکتری دارد داشت. در نتیجه، این نتایج ثابت کرد که مهار مکانیسم‌های تنظیم‌کننده عوامل بیماری‌زایی توسط مولکول‌های محلول ترشح شده توسط پروبیوتیک‌ها می‌تواند یک راه خوب برای تضعیف بیماری‌زایی در سویه‌های بیماری‌زا باشد. یکی از ژن‌های دیگری که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت luxS بود. luxS از سیستم‌های شناخته‌شده QS است که در متابولیسم متیونین و AI-2 دخیل است و فعال‌کننده چرخه متیل جهت کاتالیز S-ribosylhomocysteine (SRH) هموسیستئین

هست(۱۸). luxS هم چنین دارای نقش حیاتی در برخی از اعمال فیزیولوژیک باکتری‌ها از قبیل تشکیل بیوفیلم، بیان ژن، حرکت و مقاومت آنتی‌بیوتیکی هست. در مطالعات صورت گرفته luxS در تشکیل بیوفیلم چندین باکتری از قبیل اشریشیاکلی، استرپتوکوکومونانس، استافیلوکوکوس اورئوس، ایکنلا کورودنس و استرپتوکوکوس گوردنه نقش داشته است(۲۳). این ژن همراه ژن ctxM از جمله مهم‌ترین ژن‌های دخیل درحیات باکتری هستند. تا به امروز، مطالعات بسیار اندکی جهت ارزیابی اثر برهم کنش باکتری-باکتری در زمینه بیان فاکتورهای حدت باکتری اشریشیاکلی به ویژه میزان بیان ژن‌های بیماری‌زا توسط باکتری‌های پروبیوتیک اسپوردار انجام شده است. لذا بایستی ره یافت‌های مولکولی به‌منظور افزایش درک مکانیسم‌های درگیر در مهار رشد و بیان عوامل حدت آن در تقابلات کمپلکس میکروبی به کار گرفته شود(۳۲). ونسنزی و همکاران(۲۰۲۱) گزارش کردند که لاکتوباسیل‌ها با ترشح تعدادی از مواد می‌توانند بیان برخی از ژن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند(۳۶). آدجه و همکاران(۲۰۱۸) با نتیجه‌گیری مشابه بیان کردن که لاکتوباسیل ها بیان ژن‌های TLR تحت تأثیر قرار داده و پاسخ‌های التهابی را از این طریق کنترل می‌کنند(۱). کیم و همکاران در سال ۲۰۱۵ گزارش کردند که لاکتوباسیل‌ها توانایی کاهش بیان ژن‌های پاتوژن در سالمونلاتیفی موریم را نداشتند که هم سو با پژوهش حاضر نیست(۱۹). باکتری‌های پروبیوتیک دارای اثرات ضد میکروبی علیه باکتری‌های پاتوژن روده‌ای می‌باشند. این باکتری‌ها نقش خود را از طریق تولید اسیدهای آلی، پر اکسید هیدروژن، باکتریوسین و ممانعت از اتصال باکتری‌های پاتوژن به مخاط روده اعمال می‌نمایند(۲۳). در مطالعه‌ای که هارون آبادی و همکاران در این مطالعه، پاتوژن های گرم منفی در اسهال جداسازی شد؛ و اثر ۹ سویه پروبیوتیک بومی بر این پاتوژن‌ها سنجیده شد. نتایج نشان داد که هر ۹ سویه پروبیوتیک دارای اثرات ضدمیکروبی علیه پاتوژن‌های گرم منفی می‌باشند. به طوری که بیشترین اثر ضد میکروبی مربوط به سویه پروبیوتیک باسیلوس سوبتلیس برروی اشریشیاکلی بود(۱۶). حسین و همکاران نیز مطالعه مبنی بر مقایسه اثر پروبیوتیک‌های بومی جداشده از منابع محلی با سویه‌های تجاری بر بازدارندگی رشد و تکثیر اشریشیاکلی انجام دادند. سپس، از بین ۱۸ باکتری مقاوم به اسید از طریق روش انتشار در ژل اثر ممانعتی جدایه‌ها روی بیماری‌زاهایی نظیر اشریشیاکلی و عامل عفونت‌های سوختگی سودوموناس آئروژینوزا بررسی و نتایج با نتایج سویه‌های تجاری مقایسه شد. نتایج نشان داد بیش‌ترین اثر مهاری علیه عوامل بیماری‌زا به جدایه‌ی های محلی مربوط است(۱۷). این مطالعات نتایجی مشابه مطالعه حاضر داشتند به طوری که نتایج آنالیز آماری نیز اطلاعات حاصله از این پژوهش حاکی از معنی‌دار بودن حضور این پروبیوتیک‌ها و کاهش بیان ژن‌های موردبررسی بود. نتایج سنجش بیان ژن‌های مورد بررسی در این مطالعه و مقایسه اثر سویه‌های تجاری و بومی نشان دهنده این امر بود که سویه‌های بومی باسیلوس سوبتیلیس جداشده از روده مرغ‌های محلی اثر مشابه و قدرتی تقریباً همسان با سویه تجاری تهیه شده در کاهش بیان ژن‌های مورد بررسی داشتند؛ و با توجه به آنالیزهای صورت گرفته روی این سویه‌های بومی آن‌ها را کاندید برای تجاری شدن می‌کند. هم چنین در مورد سویه تجاری باسیلوس کوآگولانس و سویه بومی آن در ارتباط با دو ژن سویه بومی اثر بهتری نسبت به تجاری داشت و در مورد یک ژن اثر مشابهی در کاهش بیان ژن داشتند. این سویه نیز با توجه به پتانسیل‌ها مشاهده شده که در مواردی بهتر از سویه تجاری شدن از خود نشان داد می‌تواند کاندید خوبی برای تجاری شدن باشد. مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده‌ی نقش مهم دو پروبیوتیک باسیلوس سوبتلیس و باسیلوس کوآگولانس در کاهش بیان ژن‌های دخیل در اتصال باکتری به سلول‌های میزبان بود؛ و با توجه

به این که سویه‌های بومی مورد استفاده در این مطالعه اثری مشابه و در مواردی بهتر از سویه تجاری مورداستفاده داشتند می‌توان بامطالعه بیشتر از منابع محیطی و محلی پروبیوتیک‌هایی جداسازی کرد که نسبت به پاتوژن‌های مقاوم و بیماری‌زا اثرات بهتری را داشته باشند.

منابع

1.Adjei-Fremah, S., Ekwemalor, K., Asiamah, EK., Ismail, H., Ibrahim, S., Worku, M. (2018). Effect of probiotic supplementation on growth and global gene expression in dairy cows. Journal of Applied Animal Research, 46(1); 257–263.

2.Ahmad , M., Khan, AU. (2019). Global economic impact of antibiotic resistance: A review. 2019 Epub.

3.Altun, GK., Erginkaya, Z. (2021). Identification and characterization of *Bacillus coagulans* strains for probiotic activity and safety. Epub.

4.Apajalahti, JH., Kettunen, A., Bedford, MR., Holben, WE. (2001). Percent G+ C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. Applied and Environmental Microbiology, 67(12); 5656–5667.

5.Asaithambi, N., Singh, SK., Singha, P. (2021). Current status of non-thermal processing of probiotic foods: A review. Epub.

6.Baho, S., Samarasinghe, S. (2018). Gene expression analysis of the AI-2-controlled genes and biofilm formation-related genes of the antibiotic-resistant *Escherichia coli* at Different Growth Stages.

7.Cotar, AI., Chifiriuc, MC., Dinu, S., Pelinescu, D., Banu ,O., Lazăr, V. (2010). Quantitative real-time PCR study of the influence of probiotic culture soluble fraction on the expression of Pseudomonas aeruginosa quorum sensing genes. Romanian archives of Microbiology and Immunology, 69(4); 213–223.

8.Czarnik, AW., Mei, H-Y. (2007). How and Why to Apply the Latest Technology*. In: Taylor JB, Triggle DJ, editors. Comprehensive Medicinal Chemistry II. Oxford: Elsevier, 289–557.

9.Darvishi, N., Fard, NA., Sadrnia, M. (2021). Genomic and proteomic comparisons of bacteriocins in probiotic species Lactobacillus and Bifidobacterium and inhibitory ability of *Escherichia coli* MG 1655. 2021 Epub.

10. El-Saadony, MT., Alagawany, M., Patra, AK. (20121). The functionality of probiotics in aquaculture: An overview. Epub.

11. Federation, FWD. (2015). Communications Sessions 01-04. Epub.

12. Fu, L., Wang, S., Zhang, Z. (2019). Co-carrying of KPC-2, NDM-5, CTX-M-3 and CTX-M-65 in three plasmids with serotype O89: H10 *Escherichia coli* strain belonging to the ST2 clone in China. Epub.

13. Fu, P., Zhao, Q., Shi, L. (2021). Identification and characterization of two bacteriophages with lytic activity against multidrug-resistant *Escherichia coli*. Epub.

14. Goel ,N., Fatima, SW., Kumar, S., Sinha, R., Khare, SK. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. Epub.

15. Hai ,NV. (2015). Research findings from the use of probiotics in tilapia aquaculture: A review. Fish & Shellfish Immunology, 45(2); 592–597.

16. Harounabadi, S. (2016). The survey of molecular and antimicrobial activity of isolated bacteria from the Caspian Sea. Iranian Journal of Medical Microbiology, 10(1); 16–23.

17. Hussein, SA. (2013). Antimicrobial activity of probiotic bacteria. Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, G Microbiology, 5(2); 21–34.

18. Jiang, L., Luo, Y., Cao, X., Liu, W., Song, G., Zhang, Z. (2021). Lux,S quorum sensing system mediating *Lactobacillus plantarum* probiotic characteristics. Epub.

19. Kim, JY., Young, JA., Gunther, IV NW., Lee, J. (2015). Inhibition of Salmonella by bacteriocin-producing lactic acid bacteria derived from us kimchi and broiler chicken. Journal of Food Safety, 35(1); 1–12.

20. Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C. (2013). Antibiotic resistance—the need for global solutions. The Lancet Infectious Diseases, 13(12); 1057–1098.

21. Lezotre, P-L. (2014). Part I - state of play and review of major cooperation initiatives. In: Lezotre P-L, editor. International Cooperation, Convergence and Harmonization of Pharmaceutical Regulations. Boston: Academic Press, 7–170.

22.Li, Y-K., Chen, H., Shu, M. (2021). Isolation, characterization and application of an alkaline resistant virulent bacteriophage JN01 against *Escherichia coli* O157:H7 in milk and beef. Epub.

23. Ling, H., Kang, A., Tan, MH., Qi, X., Chang,, MW. (2010). The absence of the luxS gene increases swimming motility and flagella synthesis in *Escherichia coli* K12. Biochemical and Biophysical Research Communications, 401(4); 521–526.

24. Mejía-Pitta, A., Broset, E., Fuente-Nunez, C. (2021). Probiotic engineering strategies for the heterologous production of antimicrobial peptides. Epub.

25. Melnikov, SV., Stevens, DL., Fu, X. (2020). Exploiting evolutionary trade-offs for posttreatment management of drug-resistant populations. Proceedings of the National Academy of Sciences, 117(30); 17924–17931.

26. Mirzaei, R., Mesdaghinia, A., Hoseini, SS., Yunesian, M. (2019). Antibiotics in urban wastewater and rivers of Tehran, Iran: Consumption, mass load, occurrence, and ecological risk. Epub.

27. Moini, J., Ahangari, R., Miller, C., Samsam, M. (2020). Chapter 10 - gynecologic problems. In: Moini J, Ahangari R, Miller C, Samsam M, editors. Global Health Complications of Obesity. Elsevier, 223–256.

28. Percival, SL., Williams, DW. (2014). Chapter Six - *Escherichia coli*. In: Percival SL, Yates MV, Williams DW, Chalmers RM, Gray NF, editors. Microbiology of Waterborne Diseases (Second Edition). London: Academic Press, 89–117.

29. Redweik, GAJ., Stromberg, ZR., Goor, AV., Mellata, M. (2020). Protection against avian pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella kentucky* exhibited in chickens given both probiotics and live *Salmonella vaccine*. Poultry Science, 99(2); 752–762.

30. Rehman, N., Azam, S., Ali, A. (2021) Molecular epidemiology of antibiotic-resistant genes and potent inhibitors against TEM, CTX-M-14, CTX-M-15, and SHV-1 proteins of *Escherichia coli* in district Peshawar, Pakistan. Epub.

31. Rigobelo, E., Karapetkov, N., Maestá, SA., Ávila, F de., McIntosh, D. (2015). Use of probiotics to reduce faecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in sheep. Beneficial Microbes, 6(1); 53–60.

32. Sales, A., Fathi, R., Mobaiyen, H., Bonab, F., Kondlaji, K. (2017). Molecular study of the prevalence of CTX-M1, CTX-M2, CTXM3 in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical samples in tabriz town, iran. Electronic J Biol, 13(3); 253–259.

33. Seo ,M-R., Park, YS., Pai, H. (2010). Characteristics of plasmid-mediated quinolone resistance genes in extended-spectrum cephalosporin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Korea. Chemotherapy, 56(1); 46–53.

34. Shawa, M., Furuta ,Y., Mulenga, G. (2021). Novel chromosomal insertions of ISEcp1-blaCTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of Enterobacter cloacae and *Escherichia coli*. Antimicrobial Resistance & Infection Control, 10(1); 79.

35. Tamtaji, OR., Kouchaki, E., Salami, M. (2017). The effects of probiotic supplementation on gene expression related to inflammation, insulin, and lipids in patients with multiple sclerosis: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Journal of the American College of Nutrition, 36(8); 660–665.

36. Vincenzi, A., Goettert, MI., Souza, CFV de. (2021). An evaluation of the effects of probiotics on tumoral necrosis factor (TNF-α) signaling and gene expression. Epub.

37. Wang, G., Liu, J., Xia, Y., Ai, L. (2021). Probiotics-based interventions for diabetes mellitus: A review, Epub.

38. Wu, C-F., Valdes, JJ., Bentley, WE., Sekowski, JW. (2003). DNA microarray for discrimination between pathogenic 0157:H7 EDL933 and non-pathogenic *Escherichia coli* strains. Biosensors and Bioelectronics, 19(1);1–8.

Isolation and identification of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* from intestines of local chickens and its effect on ctxm and luxs gene expression in *Escherichia coli* pathogenic isolates

Z. Elahyan Firooz[1], **M. Baseri Salehi[2]**, M. Ghaneh[3]

1.Department of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran.

2.Department of Microbiology, Kazeroun Branch, Islamic Azad University, Kazeroun, Iran.

3.Department of Microbiology, Tonekabon Branch, Islamic Azad University, Tonekabon, Iran.

majidbaseri@hotmail.com:

Received:2021. 10. 8 **Accepted: 2022.20.1**

Abstract

Inroduction & Objective: The aim of this study was to investigate the effects of probiotics isolated from local chickens on the expression of luxS, ctxM genes in resistant *Escherichia coli*.

Material and Methods: Biochemical tests of *Escherichia coli* samples were isolated and then the presence of luxS and ctxM genes was detected by PCR with specific primers. In order to extract the native strains of *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis*, the intestinal contents of 9 local chickens were cultured, isolated and identified by biochemical and PCR methods.

Results: Commercial strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus coagulans* were isolated along with isolates of resistant *Escherichia coli* strains containing ctxm and luxs genes. Real-time PCR was used to evaluate gene expression. From 300 fecal samples taken, 40 isolates(7.5%) of *Escherichia coli* were obtained; Four *Escherichia coli* strains were isolated from patients carrying ctxM and luxS genes. Isolates of *Bacillus coagulans* and *Bacillus subtilis* were confirmed by molecular experiments. Decreased by 2.2 times, equal to the control group in *Escherichia coli*.

Conclusion: The results of statistical analysis showed that there was a significant relationship between the presence of native and commercial probiotics in culture and reduced expression of ctxM and luxS genes.

Keywords: Probiotics, *Escherichia coli*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis,* Ctxm, Luxs.