



Synergistic effect of silver oxide nanoparticles and probiotic *Lactobacillus plantarum* on gene expression of MexX component of pump efflux system in drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains

Oumaima AL-Hilli¹, Farahnaz Molavi², Maryam Tehranipoor³

¹ Master student of Cellular and Molecular Sciences, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran. ² Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

³ Associate Professor, Department of Biology, Mashhad Branch, Islamic Azad University, Mashhad, Iran.

Abstract

Background & Objectives: An important part of drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is related to efflux pump systems. In this study, the antimicrobial effect of silver oxide nanoparticle and *Lactobacillus plantarum* probiotic on MexX gene expression has been studied.

Materials & Methods: In this descriptive cross-sectional study, 49 samples were collected from Mashhad and identified using standard methods. Strains with multidrug resistance were selected to determine MIC and check the frequency of MexX gene by PCR method. Broth dilution method was performed for probiotics, silver oxide nanoparticles and combination of both to obtain MIC and MBC. Microdilution method and Real time-PCR technique were used to determine the effective dilution of silver oxide nanoparticles and probiotics and MexX gene expression, respectively. The data related to the changes in MexX gene expression were analyzed by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method using the independent T test in two groups.

Results: All strains had MexX gene and all of them were resistant to more than two antibiotics. The minimum concentration of growth inhibition in the dilution method in agar was for silver oxide nanoparticles up to a dilution of 500 $\mu\text{g/ml}$ and for probiotics up to a dilution of 16 $\mu\text{g/ml}$. Compared to probiotics, silver nanoparticles had a greater effect in inhibiting the growth of bacteria, and the amount of this effect is greater than the combined effect of probiotics and silver nanoparticles ($P > 0.05$).

Conclusion: Silver oxide nanoparticle and probiotic have antibacterial effect to reduce MexXY-OprM efflux pump function in *Pseudomonas aeruginosa* bacteria.

Keywords: efflux pump, *Pseudomonas aeruginosa*, Silver oxide nanoparticles, *Lactobacillus*.

Received: 10 May 2021

Revised: 31 August 2021

Accepted: 26 November 2021

Correspondence to: Farahnaz Molavi

Tel: +98 9155116504

E-mail: aFarahmolavi@gmail.com

Journal of Microbial World 2020, 14(3): 47-58

DOI: 10.30495/jmw.2021.690448



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.



بررسی اثر هم‌افزایی نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان ژن جزء MexX سیستم افلاکس پمپ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو

امیمه مظفر مرزه الحلی^۱، فرحناز مولوی^{۲*}، مریم طهرانی پور^۳

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد رشته علوم سلولی و مولکولی، گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ^۲ استادیار گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. ^۳ دانشیار گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: در سودوموناس آئروژینوزا بخشی مهمی از مقاومت دارویی مربوط به سیستم‌های پمپ افلاکس است. در این مطالعه، اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر بیان ژن MexX مطالعه شده است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی-توصیفی ۴۹ نمونه از شهر مشهد جمع‌آوری و با استفاده از روش‌های استاندارد تعیین هویت شدند. سویه‌های دارای مقاومت چند دارویی برای تعیین MIC و بررسی فراوانی ژن MexX به روش PCR انتخاب شدند. روش رقت‌سازی در برات برای پروبیوتیک، نانوذرات اکسید نقره و ترکیب هر دو انجام شد تا MIC و MBC بدست آید. از روش میکروداپلوشن و تکنیک Real time-PCR به ترتیب برای تعیین رقت اثربخش نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک و بیان ژن MexX استفاده شد. داده‌های مربوط به تغییرهای بیان ژن MexX با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با استفاده از آزمون آماری T مستقل در دو گروه تحلیل شد.

یافته‌ها: تمام سویه‌ها واجد ژن MexX بودند و تمام آن‌ها به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند. حداقل غلظت مهار رشد در روش رقت در آگار برای نانوذرات اکسید نقره تا رقت ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پروبیوتیک تا رقت ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. نانوذرات نقره در مقایسه با پروبیوتیک تاثیر بیشتری در مهار رشد باکتری داشت و میزان این تاثیر نسبت به اثر ترکیبی پروبیوتیک و نانوذرات نقره نیز بیشتر بود ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری: نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک اثر آنتی باکتریال برای کاهش عملکرد پمپ افلاکس MexXY-OprM در باکتری سودوموناس آئروژینوزا دارد.

واژگان کلیدی: پمپ افلاکس، سودوموناس آئروژینوزا، نانوذرات اکسید نقره، لاکتوباسیلوس.

پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۹/۵

ویرایش مقاله: ۱۴۰۰/۶/۹

دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۲/۲۰

مقدمه

موقعی که در حضور نیتراژت رشد می‌کند، در شرایط دیگر یک باکتری هوازی اجباری می‌باشد (۲). این باکتری فرصت طلب به بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است و مقاومت چند دارویی ذاتی و اکتسابی در این باکتری وضعیت درمان عفونت‌های مرتبط با آن را بسیار دشوار می‌کند (۳). گزارشات دهه‌های

سودوموناس آئروژینوزا یک باسیل گرم منفی، اکسیداز مثبت، متحرک و دارای یک تا سه فلاژل قطبی می‌باشد (۱) و به جز

(* آدرس برای مکاتبه: گروه زیست‌شناسی، واحد مشهد، دانشگاه آزاد اسلامی، مشهد، ایران. تلفن: ۰۹۱۵۵۱۱۶۵۰۴ پست الکترونیک: Farahmolavi@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (<http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/>) در فصلنامه دنیای میکروباها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.



مواد و روش‌ها

الف) جداسازی و شناسایی جدایه‌های سودوموناس آئروژینوزا: مطالعه حاضر به صورت توصیفی-مقطعی در یک بازه زمانی ۹ ماهه (۱۳۹۸-۱۳۹۹) اجرا شد. ۴۹ سویه باکتریایی سودوموناس آئروژینوزا از ۱۱ آزمایشگاه تشخیص طبی شهر مشهد جمع‌آوری شدند. سپس نمونه‌های باکتریایی به آزمایشگاه تحقیقات زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد منتقل شدند. ابتدا نمونه‌ها در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرماگذاری شدند. سپس برای شناسایی سودوموناس آئروژینوزا در نمونه‌ها، در کنار رنگ‌آمیزی گرم، از تست‌های بیوشیمیایی مختلف شامل رشد در محیط مک‌کانکی آگار، MB، SIM، تست اکسیداز، کاتالاز، اوره‌آز، واکنش در محیط TSI، تست OF، بررسی تحرک، رشد در محیط ستریماید آگار و رشد در دمای ۴۲ درجه سلسیوس مولر هینتون آگار استفاده شد (۱۰). جدایه‌ها در محیط کشت تجاری LB Broth حاوی ۲۰ درصد گلیسرول در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. نمونه استاندارد مورد استفاده در این تحقیق *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 بود که بصورت لیوفیلیزه از شرکت یاسین طب خریداری گردید (۱۱). شایان ذکر است که پژوهش حاضر مطابق با پروتکل کمیته اخلاق پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد با کد اخلاق IR.IAU.MSHD.REC.1400.043 انجام شده است.

ب) تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی: برای انجام تست آنتی‌بیوگرام، نخست کلنی‌های سودوموناس آئروژینوزای تلقیح شده در محیط نوترینت برات را با سوسپانسیون استاندارد نیم مک فارلند سنجیده و وقتی به کدورت مورد نظر و مطابق استاندارد رسید (حاوی $10^8 \times 1/5$ باکتری) بر روی محیط مولر هینتون آگار کشت داده و دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی به فاصله ۲/۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۵ میلی‌متر نسبت به یکدیگر قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت گرماگذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قطر هاله عدم رشد اندازه‌گیری و میزان حساسیت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها مطابق با روش CLSI 2018 تعیین شد (۱۲).

اخیر نشان داده است که حساسیت دارویی این باکتری مربوط به سیستم‌های افلاکس فعال از جمله MexXY-OprM است (۱). سودوموناس آئروژینوزا دارای پتانسیل بیان ۱۲ نوع پمپ افلاکس به نام‌های Mex می‌باشد. سیستم افلاکس Mex متعلق به خانواده RND بوده و پنج پمپ به نام‌های MexXY-OprM، MexJK-OprM، MexAB-OprM، MexCD-oprj، MexEF-oprN، MexXY-OprM در سودوموناس آئروژینوزا منحصراً به فرد است چون با خروج آنتی‌بیوتیک‌ها از سلول، مانع اثربخشی آن‌ها می‌شوند (۴). آنتی‌بیوتیک‌ها با اینکه جزو داروهایی هستند که در طب مدرن برای درمان بیماری‌ها استفاده فراوان دارند (۵) ولی مقاومت ذاتی باکتری‌ها به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها مشکلات جدی برای مصرف آن‌ها ایجاد کرده است (۶). به این دلیل در سال‌های اخیر توجه عمومی به سمت موادی غیر آنتی‌بیوتیکی مانند نانومواد معطوف شده است (۷). فناوری نانو مورد استفاده روز افزون در سطح جهانی است و برای کاهش عفونت‌های میکروبی پوست و زخم‌های پوستی در ابزارهای مختلفی همانند پروتز یا چسب زخم استفاده می‌شود. خواص ضد میکروبی نقره سال‌هاست که کشف شده است. نانوذرات نقره به علت داشتن بار سطحی و نسبت سطح به حجم بالا، آنزیم‌ها و DNA باکتری‌ها را با تعادل الکترون بین گروه‌های دهنده الکترون مانند تیول یا هیدروکسیل غیرفعال ساخته و در نهایت موجب مرگ باکتری می‌شوند (۸) همچنین استفاده از پروبیوتیک به علت داشتن خصوصیات ضد میکروبی خصوصاً تجمع‌پذیری، از اتصال و استقرار باکتری‌ها در بدن میزبان جلوگیری می‌کنند و راهکار امیدبخشی برای درمان بسیاری از عفونت‌ها محسوب می‌گردد. مهم‌ترین سویه‌های پروبیوتیک از باکتری‌های اسید لاکتیکی (LAB) از جنس بیفیدوباکتر و لاکتوباسیلوس هستند (۹). هدف از این مطالعه، بررسی اثر هم‌افزایی نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتروم بر بیان ژن جزء MexX سیستم افلاکس پمپ در سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو است.

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده در Real-Time PCR و PCR.

اندازه	محصول	Tm [°] c	توالی نوکلئوتیدی	ژن
380 (bp)	59.76	MexX-F	CTCTACCCCATCTACGTC	MexX
	59.69	MexX-R	GTCGTCACGTCGACACC	
199 (bp)	55.63	16S	F:CCAACCTTTTCCTTACTTGC	rRNA
199 (bp)	55.73	R:	CATCAACTTCACCTTCACGC	

(برند ARMINANO) از شرکت مهندسی پایدار ابتکار آرمینا خریداری شد. برای تهیه سری رقت از نانوذرات از روش رقت سازی سریال از نانوذره نقره، رقت‌های ۳۱، ۶۲.۵، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ تهیه شد. سویه پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم PTCC 1058 از مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی ایران خریداری شد.

با توجه به روش استاندارد کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه بالینی (CLSI)، تعیین حداقل غلظت ممانعت کننده رشد (MIC) برای تعیین اثر ضد میکروبی نانوذره اکسید نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم، با روش براث دیلوشن انجام شد. حداقل غلظت ممانعت کننده رشد به عنوان کم‌ترین غلظت نانوذره اکسید نقره و پروبیوتیک که از رشد باکتری در محیط کشت ممانعت می‌کند در نظر گرفته شد.

ه) استخراج RNA و ساخت cDNA: استخراج RNA با استفاده از کیت Total RNA Extraction mini Kit (یکتا تجهیز آزما، ایران) و بعد از تیمار کردن با نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک (رقت بعد از MIC) صورت گرفت. برای حذف DNA ژنومی از کیت RNase-free DNase (Qiagen, Hilden, Germany) استفاده شد. بعد از استخراج RNA، برای اطمینان از صحت استخراج و نمونه مورد نظر، توسط دستگاه نانودراپ جذب نوری ۲۳۰/۲۶۰ و ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر ارزیابی کمی شد. در حالی که نسبت بین ۱/۸ تا ۲ بود مولکول RNA دارای کیفیت مناسب برای انجام PCR در نظر گرفته شد. RNA استخراج شده تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (۱۴).

سنتر cDNA با استفاده از کیت cDNA Synthesis Kit (یکتا تجهیز آزما، تهران) و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده

دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استفاده شده در این مطالعه شامل: جنتامایسین (10 µg)، ایمی‌پنم (10 µg)، تراسایکلین (30 µg)، سفنازیدیم (30 µg)، کلرامفنیکل (30 µg)، اریترومایسین (15 µg) و سولفامتوکسازول (10 µg) بود که از شرکت پادتن طب خریداری شدند. سویه‌های دارای مقاومت چنددارویی شناسایی شده و از آن‌ها برای ادامه کار استفاده شد.

ج) استخراج DNA و شناسایی ژن MexX پمپ افلاکس با تکنیک PCR: برای شناسایی مولکولی ژن پمپ افلاکس مورد نظر از سویه‌های انتخاب شده، استخراج DNA با استفاده از کیت استخراج (Qiagen, Hilden, Germany) DNA و مطابق دستورالعمل شرکت تولید کننده انجام شد. یک جفت پرایمر توسط نرم افزار الیگو ۷ (oligo 7.60) طراحی و برای سنتز به شرکت سیناکلون سفارش داده شد (جدول ۱). پس از ساخت پرایمرها، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲ میکرولیتر (ایران، سیناکلون) PCR master mix 5X، ۲/۵ mM Taq DNA polymerase، ۵ میکرولیتر از هر جفت از پرایمرها، ۱ dNTPs، ۶ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادپانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) با برنامه دمایی، ۱ سیکل دناتوراسیون اولیه شامل: ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه، واسرشته شدن ۹۴ درجه سلسیوس ۳۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۵۳ درجه برای ۳۰ ثانیه، طولی شدن ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه و یک بسط نهایی ۷۲ درجه سلسیوس برای ۱۰ دقیقه انجام شد. الکتروفورز محصول PCR با ژل آگارز ۱ درصد و در کنار DNA Ladder 100bp در بافر TBE به مدت ۶۰ دقیقه در ولتاژ ۱۰۰ انجام شد (۱۰). برای رنگ آمیزی ژل، آن را به مدت ۱۵ دقیقه در تانک حاوی اتیدیوم بروماید قرار داده و نتایج توسط دستگاه Geldocument با نور uv مشاهده شد در کل واکنش‌های PCR از آب به عنوان کنترل منفی و از سویه استاندارد دارای ژن MexX به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (۱۳).

د) آماده‌سازی سوسپانسیون نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم: پودر نانوذرات نقره

انجام شد.

آنتی بیوتیکهای رایج انجام شد. قطر هاله‌های ایجاد شده در اطراف دیسک‌های آنتی بیوتیکی برای جدایه‌های جمع‌آوری شده با کولیس اندازه‌گیری شد. بررسی هاله با توجه به استاندارد CLSL انجام و نتایج به صورت حساس (S) نیمه حساس (IM) و مقاوم (R) گزارش گردید (جدول ۲). در این بررسی تمام سویه‌ها به بیش از دو آنتی بیوتیک مقاوم بودند لذا همه سویه‌ها برای ادامه کار استفاده شدند.

جدول ۲: نتایج آزمون تست حساسیت آنتی بیوتیکی.

مقاوم (درصد)	نیمه حساس (درصد)	حساس (درصد)	دیسک آنتی بیوتیک
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	جتتامایسین (GM ₁₀)
۱۷ (۶۹/۲۴)	۹ (۳۶/۲۵)	۱۳ (۵۳/۲۹)	ایمی پنم (IMP ₁₀)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	تتراسایکلین (TE ₃₀)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	سفتازیدیم (CAZ ₃₀)
۱۱ (۴۴/۲۲)	۷ (۲۸/۲۴)	۳۱ (۳۶/۵۳)	کلرامفنیکل (CH ₃₀)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	اریترومایسین (E ₁₅)
۴۹ (۱۰۰)	۰ (۰)	۰ (۰)	سولفامتوکسازول (SXI)

ج) نتایج تکثیر ژن به روش PCR: واکنش PCR روی ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده انجام شد. تکثیر ژن پمپ افلاکس MexX در سویه‌های باکتری، وجود باند ۳۸۰ bp در ژل الکتروفورز را نشان داد (شکل ۱). نتایج بررسی مولکولی سویه‌ها نشان داد که تمام سویه‌ها دارای ژن مورد نظر بودند.

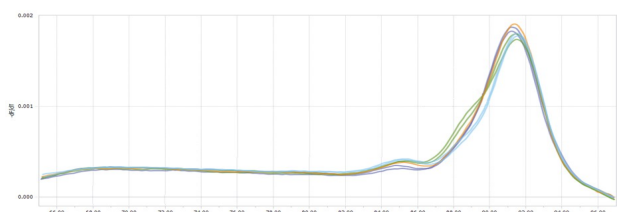
د) نتایج آزمون MIC: بهترین غلظت کشندگی ۵۰ درصدی سلول‌ها برای نانوذرات اکسید نقره ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و برای پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلاننتاروم ۱۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. بهترین غلظت، غلظتی است که توان کشندگی حدود ۵۰ درصد سلول‌ها را داشته باشد تا با مابقی سلول‌ها که

و) سنجش بیان ژن توسط تکنیک Real-Time PCR: واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت Genet کره جنوبی به صورت زیر انجام شد: ده میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with SYBER green، پنج میکرولیتر از Depc water، یک میکرولیتر از هر پرایمر (۱۶)، یک میکرولیتر از Rox dye و دو میکرولیتر از cDNA استفاده شد. تکثیر قطعه مورد نظر در دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus با برنامه واسرشت اولیه ۹۴ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه، تکثیر شامل واسرشت در ۹۴ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه، اتصال در ۵۸ درجه سلسیوس برای مدت ۳۰ ثانیه و گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس برای ۳۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد از ژن خانگی 16s rRNA به عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. آنالیز منحنی ذوب (Melting curve) برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن انجام شد. آنالیز داده‌ها در نمونه‌های تیمار شده و کنترل به کمک معادله داده‌ها و برای رسم نمودارهای مربوطه از LightCycler Relative Quantification Software استفاده شد. داده‌های مربوط به تعبیر بیان ژن MexX با روش $2^{-\Delta\Delta CT}$ با فرض کارایی ۱۰۰ درصد و با استفاده از آزمون آماری T مستقل در چهار گروه تحلیل شد.

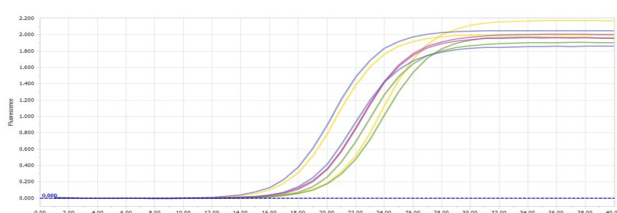
یافته‌ها

الف) تشخیص سویه‌ها: ۴۹ سویه سودوموناس آئروژینوزا جمع‌آوری شده، توسط تست‌های تشخیصی و تاییدی میکروبیولوژی و بیوشیمیایی به عنوان باکتری سودوموناس آئروژینوزا تایید هویت شدند.

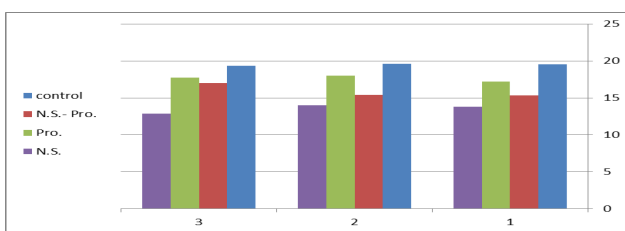
ب) نتایج تست حساسیت آنتی بیوتیکی: از سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 به عنوان سویه کنترل استفاده شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی برای انجام آزمایش تعیین حساسیت میکروبی به روش دیسک دیفیوژن آگار ابتدا توسط سودوموناس آئروژینوزا ATCC 27853 کنترل کیفی و سپس برای سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا تست حساسیت آنتی بیوتیکی نسبت به



شکل ۲: آنالیز منحنی ذوب (برای اطمینان از اختصاصی بودن قطعه‌های تکثیر شده ژن که منحنی ژن مورد سنجش در تمام نمونه‌ها با هم منطبق و بصورت یک قله است).



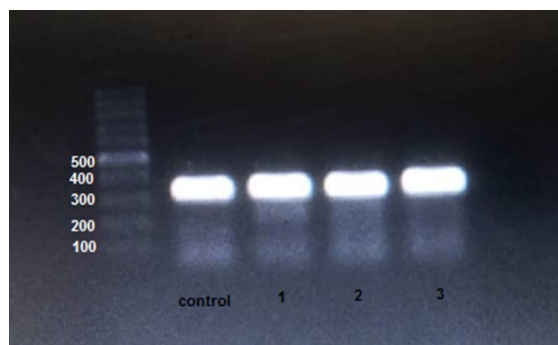
شکل ۳: نتایج منحنی تکثیر محصول در Real time PCR بر حسب سیکل.



شکل ۴: نمودار مقایسه بیان ژن *MexX* در نمونه‌های کنترل و نمونه‌های تیمار شده. محور طولی میزان بیان ژن و محور افقی نمونه‌های تیمار شده با نانوذره اکسید نقره (N.S.)، پروبیوتیک (Pro.) و هم‌افزایی نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک (N.S.-Pro.) را نشان می‌دهد. تفاوت معناداری در تمام گروه‌های تیمار سطح $P > 0.05$ مشاهده شد.

بحث

سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی و فرصت طلب است (۱۷) که به دلیل ایجاد عفونت‌های شدید و مرگ و میر گسترده‌ای که در بیماران دارای ضعف سیستم ایمنی ایجاد می‌کند مورد بررسی و تحقیق فراوان قرار گرفته است (۱۸) و اطلاعات زیادی در خصوص ماهیت زیستی و کنترل عفونت‌های آن وجود دارد اما با وجود پیشرفت‌های فراوان در خصوص شناخت این باکتری و تهیه آنتی‌بیوتیک‌ها، هنوز موفقیت لازم برای کنترل عفونت این باکتری حاصل نشده است (۱۹). زیرا مقاومت چند دارویی این باکتری، درمان آنتی‌بیوتیکی را دچار اختلال و شکست می‌کند (۲۰). در سال‌های اخیر شیوع سویه‌های سودوموناس



شکل ۱: نتایج الکتروفورز حاصل تکثیر ژن *MexX* (از چپ به راست: مارکر، کنترل مثبت، نمونه‌های مثبت حاوی ژن *MexX*، طول قطعه مورد نظر ۳۸۰ جفت باز است).

زنده مانده‌اند بتوان بخش آنالیز مولکولی را انجام داد.

بیان ژن *MexX* بعد از تیمار با مهارکننده‌های پمپ افلاکس: برای مقایسه تاثیر نانوذره اکسید نقره و پروبیوتیک و اثر هم‌افزایی آن‌ها بر بیان ژن *MexX*، بیان ژن در چهارگروه سلولی تیمار شده با نانوذره نقره، تیمار شده با پروبیوتیک، تیمار شده با اثر هم‌افزایی نانوذره نقره و پروبیوتیک و تیمار نشده با استفاده از آنالیز منحنی ذوب (Melting curve analysis) و منحنی تکثیر با سه بار تکرار بررسی گردید.

در منحنی تکثیر دستگاه Real time PCR نمونه‌های باکتری قبل و بعد از تیمار با نانوذره اکسید نقره و پروبیوتیک و ژن کنترل داخلی بررسی شده‌اند که با رنگ‌های مختلف نشان داده شده‌اند. همانطور که در شکل مشاهده می‌شود ژن‌هایی که دارای بیان بیشتر بوده‌اند دارای Ct کمتر بوده که در اینجا Ct نمونه‌های کنترل داخلی (16s rRNA) کمتر شده و در منحنی زودتر وارد فاز Exponential شده است و نمونه‌های باکتری پس از تیمار با نانوذره اکسید نقره و اکسید نقره- پروبیوتیک دارای بیان کمتر در ژن و Ct بیشتری می‌باشند.

بیان ژن *MexX* در سویه‌های تیمار شده با مهارکننده نانوذره و اثر هم‌افزایی نانوذرات نقره و پروبیوتیک تفاوت معنادار دارد ولی نانوذرات اکسید نقره نسبت به اثر هم‌افزایی آن با پروبیوتیک تاثیر بیشتری بر روی بیان ژن دارد. کمترین تغییر در نمونه‌های تیمار شده با پروبیوتیک بود و بر اساس نتایج به دست آمده از سنجش بیان ژن (Pvalue) اختلاف آماری معنادار در بیان ژن در بین چهار گروه وجود داشت.

مطالعات گذشته نشان داده است که نانوذرات فلزی مانند اکسید نقره به دلیل داشتن توان ضد میکروبی می‌توانند به عنوان یک جایگزین برای آنتی‌بیوتیک‌ها مورد بررسی باشند (۳۱) و نتایج این بررسی این خاصیت نانوذرات را تایید می‌کند. در مورد تاثیر نانوذرات بر بیان ژن‌های پمپ افلاکس *سودوموناس آئروژینوزا*، دودی و همکارانش نشان دادند که نانوذرات نقره با غلظت ۵۰ppm در *سودوموناس آئروژینوزا* بزرگترین قطر هاله عدم رشد را تشکیل دادند (۳۲). رشید و همکارانش نیز در سال ۲۰۲۱ همین نتیجه را با غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر گزارش نمودند (۳۳). نانوذرات روی و اکسید روی نیز تاثیر مشابهی در *سودوموناس آئروژینوزا* داشتند (۳۴ و ۳۵). نانوذرات آهن نیز با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر می‌توانند اثر مهار کنندگی بر روی *سودوموناس آئروژینوزا* نشان دهند (۳۶). مکانیسم عملکرد ضد میکروبی نانوذرات در باکتری‌ها با دو مکانیسم اتفاق می‌افتد: ۱) نانوذرات به غشای باکتری متصل می‌شوند و نفوذپذیری آن را کاهش می‌دهند و در تنفس مشکل ایجاد می‌کنند. ۲) نانوذرات به داخل باکتری نفوذ می‌کنند و با ترکیبات حاوی گوگرد و فسفر واکنش می‌دهند (۳۷). در مورد اثر هم‌افزایی نانوذرات با سایر مواد ضد میکروبی، شریف و امینی در سال ۲۰۱۹ بیان کردند که هم‌افزایی نانوذره اکسید آهن و پروبیوتیک *بیفیدوباکتریوم بیفیدیوم* در *سودوموناس آئروژینوزا* بر روی بیان ژن *MexA* تاثیر ندارد (۳۸) که این نتیجه بر خلاف تحقیق حاضر است که نشان می‌دهد نانوذرات نقره و پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس پلانتراروم* بیان ژن *MexX* را کاهش می‌دهند. پروبیوتیک راهکار امیدبخشی برای درمان بسیاری از عفونت‌ها هستند. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که می‌توانند در سلامتی میزبان مؤثر باشند. مهم‌ترین سویه‌های پروبیوتیک متعلق به باکتری‌های اسید لاکتیکی (LAB) مانند جنس *بیفیدوباکتر* و *لاکتوباسیلوس* هستند (۹) *لاکتوباسیلوس پلانتراروم* اثر بازدارنده روی تولیدات مولکولی، هموسرین لاکتون و تولید الاستاز در *سودوموناس آئروژینوزا* دارد و مکانیسم‌های عملکردی متنوع پروبیوتیک‌ها و متابولیت‌های

مقاوم به چند دارو (MDR) در تمام جهان افزایش چشمگیری داشته است (۲۱) در مطالعه حاضر نیز ارزیابی الگوی حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌ها، از روش انتشار دیسک نشان داد که تمام ۴۹ سویه به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مقاوم بودند این نتیجه در مطالعات دیگری نیز مانند مطالعه شاهچراغی و همکاران که سال ۲۰۰۳ در بیمارستان سوانح سوختگی شهید مطهری اجرا گردید، گزارش شده است (۲۲). در سال ۲۰۱۴ در گیلان شیرانی و همکاران مقاومت جنتامایسین را ۹۷ درصد گزارش کردند (۲۳) که مشابه مقاومت نسبت به جنتامایسین از این مطالعه است. در مطالعه‌ای که توسط طباطبایی و همکاران انجام شد، اثر ضد میکروبی جنتامایسین علیه *سودوموناس آئروژینوزا* پس از آمینوگلیکوزیدهای توبرامایسین و آمیکاسین قرار داشت که با نتایج مطالعه حاضر مطابقت ندارد (۲۴). درصد مقاومت چند دارویی در مطالعه حاضر حدود چهار برابر میزان گزارش شده در مطالعات مشابه است (۲۵). در خصوص مکانیسم مقاومت *سودوموناس* مطالعات زیادی انجام شده است. *سودوموناس آئروژینوزا* با مکانیسم‌های متفاوتی مقاومت به داروهای ضد باکتریایی را بدست می‌آورد. در بین این مکانیسم‌های گوناگون، سیستم‌های پمپ افلاکس غشایی نقش مهمی در کسب مقاومت ذاتی این باکتری به انواع آنتی‌بیوتیک‌ها دارند (۲۶ و ۲۷). *سودوموناس آئروژینوزا* توان بیان ۱۲ پمپ تراوشی مقاومت چند دارویی با نام Mex-Type Multidrug Resistance Efflux Pump را دارد که پنج پمپ MexXY- OprM MexCD-، MexAB-oprM، MexEF-oprN، oprT، MexJK-oprM فراوان‌تر و مهم‌تر می‌باشند (۲۸). این تحقیق نیز نشان داد که تمام جدایه‌هایی که نسبت به بیش از دو آنتی‌بیوتیک مختلف مقاومت داشتند دارای ژن *MexX* بودند. و پمپ MexXY- OprM، اهمیت بسیار بالایی در مقاومت *سودوموناس آئروژینوزا* دارد چون می‌تواند آنتی‌بیوتیک‌های چون آمینوگلوکوزیدها، تتراسایکلین‌ها و کلرامفنیکل را به خارج از سلول پمپ کند (۲۹). لذا این پمپ مانع رسیدن آنتی‌بیوتیک‌ها به سلول هدف و باعث مقاومت باکتری نسبت به آن آنتی‌بیوتیک می‌شود (۳۰).

لاکتوباسیلوس پلانتاروم بر مهار رشد سودوموناس آئروژینوزا می‌توان از این ترکیب به عنوان ترکیب موثر برای کنترل عفونت‌های این باکتری بهره برد.

ملاحظات اخلاقی

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

تشکر و قدردانی

این مطالعه حاصل بخشی از پایان نامه سرکار خانم امیمه مظفر مرزه الحلی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته زیست‌شناسی سلولی و مولکولی از دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد بود. بدینوسیله از سرکار خانم بهاره سرگزی که در تمام مراحل اجرای پایان نامه مشاور طرح بوده‌اند و سرکار خانم فائزه غلامی بهار و آقای علی قرایی و تمام کارشناسان محترم آزمایشگاه گروه زیست‌شناسی به خاطر همکاری در تمام مراحل سپاسگزاری می‌گردد.

تعارض منافع

وجود ندارد.

تولید شده از آن‌ها، بیان ژن‌های عامل ویرولانسی میکروب‌ها را کاهش می‌دهند. امروزه از لاکتوباسیلوس پلانتاروم برای جلوگیری از تولید بیوفیلم استفاده می‌شود و توانایی سویه‌های مختلف لاکتوباسیلوس در مهار سوارمینگ و فعالیت آنزیم اوره‌آز پروتئوس‌ها ثابت شده است (۳۹). در این تحقیق لاکتوباسیلوس پلانتاروم اثر ضد میکروبی بر روی سودوموناس آئروژینوزا را نشان داد البته اثر مهارکنندگی آن در مجاورت نانوذرات نقره افزایش چشمگیری دارد. نتایج بررسی MIC و بیان ژن MexX در این پژوهش نشان داد که نانوذرات اکسید نقره به تنهایی یا همراه با پروبیوتیک لاکتوباسیلوس پلانتاروم توانایی کاهش بیان ژن MexX را دارند ولی پروبیوتیک به تنهایی اثر مهار کمی دارد. ارشادیان در سال ۲۰۱۵ نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌های بیماریزا را دارند و شاید بتوان از آن به عنوان گزینه مناسبی به منظور کنترل بیماری استفاده کرد (۴۰). صدری و همکارانش در سال ۱۳۹۵ نشان دادند که لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در جلوگیری از اتصال، تشکیل بیوفیلم و بیماری‌زایی باکتری /شریشیا کلی یوروپاتوژنیک دارای آثار چشمگیری هستند و استفاده از آن‌ها برای پیشگیری و درمان عفونت دستگاه ادراری به‌عنوان شیوه مهم و عملی، منطقی و قابل قبول می‌باشد (۴۱). چراغی در سال ۲۰۱۹ نشان داد که اثر نانوذرات بیشتر از پروبیوتیک‌هاست (۴۲) که این نتیجه مشابه نتیجه بدست آمده از این پژوهش است.

نتیجه‌گیری

شناسایی مکانیسم‌های ایجاد مقاومت در بین باکتری‌ها مانند سیستم‌های افلاکس پمپ برای دست‌یابی به راهکارهای درمانی مناسب در جلوگیری از انتشار سویه‌های مقاوم ضروری است. با توجه به حضور ژن‌های افلاکس MexXY-OprM به صورت کروموزومی در نمونه‌های سودوموناس آئروژینوزا، اجزای ژنی این سیستم می‌تواند ابزار تشخیصی در شناسایی مولکولی سودوموناس آئروژینوزا مقاوم به دارو باشند. همچنین با توجه به پتانسیل بالای نانوذرات اکسید نقره و پروبیوتیک

References

1. Shahcheraghi F, Faizabadi MM, Yamin V, et al. Serovar determination, drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients at two hospitals of Tehran. Burns 2003; 29(6): 547-551.
2. Japoni A, Alborzi A, Kalani M, Nasiri J, Hayati M, Farshad S. Susceptibility patterns and crossresistance of antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in the South of Iran. Burns 2006; 32(3): 343- 7
3. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. perspectives in medicinal chemistry. 2014;6: PMC. S14459.
4. Dreier J, Ruggerone P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2015; 6:660.
5. Yu H, Chen S, Cao P. Synergistic bactericidal effects and mechanisms of low intensity ultrasound and antibiotics against bacteria. Ultrason Sonochem 2012; 19 (3):377–382.
6. Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. Clinical microbiology and infection. 2007;13(6):560-78.
7. Albadiri V, Molavi F, Tehranipoor M. 2021. The effect of silver nanoparticles on blaTEM gene expression in beta-lactamase-resistant samples in *Escherichia coli*. Biology journal. of Microorganism. 2021;39(2):87-100.
8. Humberto HL, Garzatreveno EN, Ixtepanurrent L, Singh DK. Silver nanoparticles are broad spectrum bactericidal and virucidal compounds. J Nanobiotechnol 2011; 9: 1-8. doi: 10.1186/1477-3155-9-30.
9. Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermudez-Humaran LG. Probiotic Strain *Lactobacillus Casei* BL23 Prevents Colitis-Associated Colorectal Cancer. Frontiers in Immunology. 2017; 8:1553.
10. Gaby W, Hadley CJ. Job. Practical laboratory test for the identification of *Pseudomonas aeruginosa*. J bacteriol 1957;74(3):356.
11. Annear D, Black J, Govender S. Multilocus sequence typing of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients presenting at port Elizabeth hospitals, south Africa. Afr J Infect Dis. 2017;11(2):68-74.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th ed. CLSI supplement M100S. CLSI, PA. 38-40.
13. Tang Y, Li B, Dai J, Dai J, Wang X, Si J, et al. Genotyping of *pseudomonas aeruginosa* type III secretion system using magnetic enrichment multiplex polymerase chain reaction and chemiluminescence. J Biomed Nanotechnol. 2016;12(4):762-9.

14. Heera R, Sivachandran P, Chinni SV, Mason J, Croft L, Ravichandran M, et al. Efficient extraction of small and large RNAs in bacteria for excellent total RNA sequencing and comprehensive transcriptome analysis. BMC Res Notes. 2015;8(1):754.
15. Parigharaghie T and Sadatshandiz A. The inhibitory effects of silver nanoparticles on Baggene expression in antibiotic-resistant *acientobacter bumanni* isolates using Real-Time PCR J. of Ilam university of medical science. 2018; 26(26): 175-185.
16. Arvanitidou M, Katikaridou E, Douboyas J, Tsakria A, Prognostic factors for nosocomial bacteraemia outcome: a prospective study in a Greek teaching hospital. J Hosp Infect 2005; 61 (3): 219-24.
17. Bonten MJ, Bergmans DC, Ambergen AW, De Leeuw PW, Van der Geest S, Stobberingh EE, et al Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. Am J Respir Crit Care Med 1996; 154(5):1339-46.
18. Clarke I, Millar BC and Moore JC. Extraction of genomic DNA from *pseudomonas aeruginosa*: a comparison of three methods. Br j Biomed. 2003; 60(1):34-5.
19. Tang Y, Li B, Dai J, Dai J, Wang X, Si J, et al. Genotyping of *pseudomonas aeruginosa* type III secretion system using magnetic enrichment multiplex polymerase chain reaction and chemiluminescence. J Biomed Nanotechnol. 2016;12(4):762-9.
20. Plant AJ, Dunn A, Porter RJJ Erola-it. Ceftolozane-tazobactam resistance induced in vivo during the treatment of MDR *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Expert Rev Anti Infect Ther 2018;16(5):367-8.
21. Shahcheraghi F, Faizabadi MM, Yamin V, et al. Serovar determination, drug resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* from burn patients at two hospitals of Tehran. Burns 2003; 29(6): 547-551. Romao CM, Faria YN, Pereira LR, et al. Susceptibility of clinical isolates of multiresistant 13P. *aeruginosa* a hospital disinfectant and molecular typing. Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro 2005; 100: 54- 548.
22. Salimi chirani A, Dabiri H, Nikokar I, Ebrahim pour komleh M, Dousdar F, Goudarzi H, et al. Evaluation of type IV pilin sub groups in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from environmental samples, cystic fibrosis and burn patients. Iran J Med Microbiol. 2014; 8 (3) : 1-7
23. Siasi E, Rafiei Tabatabaai R, Moslehi Mehr F. Isolation of bla_vim gene in Antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospitals. New Cellular and Molecular Biotechnology Journal. 2018;8(29):97-106
24. Kato K, Iwai S, Kumasaka K, Horikoshi A, Inada S, Inamatsu T, et al. Survey of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by The Tokyo Johoku Association of Pseudomonas Studies. J Infect Chemother 2001; 7(4): 258-62.
25. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. Microbiology spectrum. 2016;4(2).

26. Webber MA, Coldham NG. Measuring the activity of active efflux in Gram-negative bacteria. Antibiotic resistance protocols: Springer; 2010. p. 173-80.
27. Goli HR, Nahaei MR, Rezaee MA, Hasani A, Kafil HS, Aghazadeh M, et al. Role of MexAB-OprM and MexXY-OprM efflux pumps and class 1 integrons in resistance to antibiotics in burn and Intensive Care Unit isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of infection and public health. 2018;11(3):364-72.
28. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. MexXY multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Frontiers in microbiology. 2012;3:408. Epub 2012/12/13.
29. YP, Xu YH, Wang ZX, Fang YP, Shen JL. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Archives of microbiology. 2016;198(6): 565-71. Epub 2016/04/10.
30. Hemeg HA. Nanomaterials for alternative antibacterial therapy. International journal of nanomedicine. 2017; 12:8211.
31. Doudi M, Naghsh N, Heiedarpour A. The effect of silver nanoparticles on Gram-negative Bacilli Resistant to Extended Spectrum B-Lactamase Enzymes. Medical Laboratory Journal. 2011;5(2):44-51.
32. Rashid A, Molavi F, Mahmoudzadeh H. The effect of silver nanoparticles on mecA gene expression in methicillin-resistant samples of *Staphylococcus aureus*. NCMBJ. 2020; 11 (41) :67-82
33. Dosunmu E, Chaudhari AA, Singh SR, Dennis VA, Pillai SR. Silver-coated carbon nanotubes downregulate the expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes: a potential mechanism for their antimicrobial effect. International journal of nanomedicine. 2015; 10:5025.
34. Lee J-H, Kim Y-G, Cho MH, Lee J. ZnO nanoparticles inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence factor production. Microbiological research. 2014;169 (12):888-96.
35. Haney CE. Effects on Iron Nanoparticles on *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms: University of Dayton; 2011.
36. 30
37. Quang H T, Van Q N, and Anh- Tuan L “Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives”. Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. 2013: 4(20):1-20.
38. Sharif R, Amini K. Effect of Iron Oxide Nanoparticles and Probiotic Bifidobacterium bifidum on MexA Gene Expression in Drug Resistant Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Research in Medicine. 2019; 43 (3) :118-123
39. Kasa-Kermanshahi R, Rezai P. Probiotics and Prebiotics in medicine and dentistry. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :1-13.

40. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajodani Far H, Vaezi Khakhki M R. The Co-aggregation effects of probiotic lactobacillus against some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :14-22
41. Saderi H Hoseini SS, Niakan M & Eini ME. Comparison of cefoxitin disk diffusion and per for meca gene methods for detection of methicillin resistant *staphylococcus aureus*. Daneshvar Medicine 2015; 22(114): 41-6[Article in Persian].
42. Cheragia S, Rashidian E, Birjandi M, Mahmoodnia L. Antagonistic effect of isolated probiotic bacteria from natural sources against intestinal *Escherichia coli* pathotypes. Electronic physician. 2019;10(3):6534.