

بررسی اثر باکتری پروبیوتیک *E. coli Nissle 1917* بر شکل گیری بیوفیلم ناشی از سویه های بالینی سودوموناس آئروژینوزا و ارزیابی بیان ژن های *algD* و *PpyR* به منظور جلوگیری از تشکیل بیوفیلم

محدثه فرنقی زاده^۱، یاسمن عیسی زاده^۲، سروناز فلسفی^۳، آوا بهروزی^{۴*}

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

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

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

۴- استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

ava.behrouzi@gmail.com

*صندوق پستی: ۱۹۳۹۵۱۴۹۵۴، شهر تهران ایران

پذیرش: ۱۴۰۲/۰۱/۲۱

دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۴

چکیده

باکتری *Pseudomonas aeruginosa* یکی از مهم ترین عوامل عفونت در پزشکی محسوب می شود که در سال های اخیر جزء باکتری های مقاوم به آنتی بیوتیک ها شناخته شده است. یکی از استراتژی های اصلی مقاومت این باکتری در برابر آنتی بیوتیک ها بیان دو ژن *algD* و *PpyR* برای تشکیل بیوفیلم می باشد. همچنین، در سال های اخیر نشان داده شده است، استفاده از میکروارگانیسم ها از جمله پروبیوتیک ها یکی از روش های مهار باکتری های پاتوژن است. از این رو، در این مطالعه برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری *P. aeruginosa* از باکتری پروبیوتیک *E. coli Nissle 1917 (EcN)* به عنوان یک گزینه درمانی جدید استفاده شد. از آنجایی که ارتباط مستقیمی میان مقاومت آنتی بیوتیکی و بیوفیلمازی وجود دارد، سویه هایی با بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی توسط تست آنتی بیوگرام انتخاب شدند. سپس، برای تعیین میزان بازدارندگی باکتری *EcN* در تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری *P. aeruginosa* تست بیوفیلمازی انجام شد و در انتها برای ارزیابی بیان دو ژن کلیدی (*PpyR* و *algD*) در تشکیل بیوفیلم، در حضور باکتری پروبیوتیک *EcN* از روش Real-time PCR استفاده شد. بر اساس نتایج تست بیوفیلمازی، باکتری *EcN* اثر بازدارندگی بالایی در تشکیل بیوفیلم ناشی از باکتری *P. aeruginosa* نشان داد. همچنین، در ارزیابی بیان دو ژن *PpyR* و *algD* در حضور پروبیوتیک *EcN* کاهش معنی داری در بیان ژن *PpyR* نسبت به گروه کنترل مشاهده شد. نتایج این مطالعه نشان داد پروبیوتیک *EcN* می تواند به عنوان یکی از گزینه های درمانی جدید و مناسب برای کاهش بیوفیلمازی *P. aeruginosa* عمل کند.

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

۱-مقدمه

باکتری *P. aeruginosa* باسیل گرم منفی، هوازی و فرصت طلب از خانواده سودوموناسه و عضوی از γ -proteobacteria است [۱]. این پاتوژن عامل اکثر عفونت‌های بیمارستانی به‌ویژه در افراد دچار زخم‌های سوختگی، افراد دارای نقص ایمنی و بیماران بستری در بخش‌های ICU است و یکی از مهمترین عوامل افزایش مرگ‌ومیر این بیماران محسوب می‌شود. از نظر اپیدمیولوژی این باکتری عامل اکثر عفونت‌های بیمارستانی را شامل می‌شود و به‌علت ایجاد مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی، درمان را مشکل ساخته و موجب افزایش هزینه درمان و افزایش مرگ‌ومیر بیماران در زمان بستری می‌شود. این باکتری فاکتورهای بیماری‌زایی مختلفی شامل، لیپوپلی ساکارید (LPS)، فلاژل نوع ۴، پیلی، آگزوتوکسین A، سیستم ترشحی نوع ۳ و ۶، پروتئاز و آلزینات دارد [۱۱ و ۱]. از مهمترین این فاکتورها می‌توان به ایجاد بیوفیلم اشاره کرد. توانایی تشکیل بیوفیلم در *P. aeruginosa*، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، زنده ماندن در شرایط سخت محیطی و فرار از سیستم ایمنی بدن را منجر می‌شود [۳]. بیوفیلم مجموعه‌ی میکروبی، شامل کلنی‌های میکروبی احاطه شده توسط ماتریکس پلی ساکاریدی خارج سلولی است، که توسط باکتری تولید می‌شود. ژن‌های متعددی از جمله، *pelA*، *pslA*، *algU*، *algD*، *algL* و *ppyR* در تولید بیوفیلم ناشی از این باکتری نقش دارند [۲]. آلزینات یکی از مهمترین فاکتورهای تولید کننده بیوفیلم است که توسط ژن کد کننده کپسول آلزیناتی یا *algD* تولید می‌شود و باعث ایجاد قابلیت چسبندگی در *P. aeruginosa* می‌شود و همچنین منجر به کاهش قابلیت ذره‌خواری باکتری توسط سلولهای میزبان می‌شود [۱]. یکی دیگر از ژن‌های

مؤثر در شدت بیماری‌زایی و تولید بیوفیلم *P. aeruginosa* ژن *ppyR* است، که با افزایش تولید آگزوپلی ساکاریدها و پیوریدین (یک سیدروفور که سه فاکتور بیماری‌زایی اندوتوکسین A، الاستاز را کنترل می‌کند به همین دلیل اهمیت زیادی در بیماری‌زایی *P. aeruginosa* دارد) منجر به افزایش تولید بیوفیلم می‌شود [۴].

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

باکتری *E. coli* Nissle 1917 (EcN) به‌عنوان یکی از پروبیوتیک‌های مورد مصرف است که در درمان عفونت‌ها یا بیماری‌های التهابی روده از جمله، کولیت اولسراتیو و بیماری کرون در بزرگسالان و نیز التهاب حاد روده در کودکان مؤثر می‌باشد [۶].

این باکتری برای اولین بار در سال ۱۹۱۷ در مدفوع یک سرباز آلمانی که به بیماری اسهال مقاوم و ایمن بود، شناسایی شد. از خواص باکتری *EcN* توانایی رقابت با باکتری بیماری‌زا در روده است. این رقابت از طریق آزدسازی فاکتورهای ازبین برندهی باکتری، میکروسین H47 و میکروسین M رخ می‌دهد که هر دو فاکتور گیرنده‌های جذب آهن در سایر باکتری‌های روده را تشخیص می‌دهند و از این طریق وارد سیتوپلاسم شده و منجر به مرگ باکتری‌های پاتوژن می‌شوند [۲۱ و ۶].

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

برای تهیه سویه باکتریایی پروبیوتیک *E. coli Nissle1917* از قرص Mutaflor ساخت کشور آلمان استفاده شد. برای کشت این سویه ابتدا مقداری از محتویات داخل کپسول به محیط کشت LB Broth انتقال داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوبه کردن در دمای اپتیمم ۳۷ درجه سانتی‌گراد این سوسپانسیون به محیط کشت LB Agar انتقال داده شد و در دمای اپتیمم ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعال شد. برای تایید سویه مورد نظر از رنگ‌آمیزی گرم و تست تشخیصی گالری استفاده شد.

۲-۳ تهیه مایع رویی باکتریایی

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

۲-۴ بیوفیلم زایی

پس از شناسایی سویه‌های مقاوم *P. aeruginosa*، از پلیت ۹۶ خانه برای بررسی تشکیل بیوفیلم استفاده شد. سویه‌های *P. aeruginosa* با غلظتی معادل McFarland ۰/۵ در مجاورت با سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۳ مایع رویی پروبیوتیک *E. coli Nissle1917* قرار داده شد و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون، پلیت از انکوباتور خارج شد. سپس، پلیت وارونه شد و محیط اضافی خارج شد. با استفاده از مولتی چنل سه مرتبه و هر بار با ۳۰۰ μ ل سرم فیزیولوژی فرآیند شست و شو انجام داده شد. پلیت به مدت ۱۰ دقیقه به صورت واژگون قرار داده شد تا خشک شود. سپس، ۱۰۰ μ ل از رنگ کریستال ویوله به هر چاهک اضافه شد. پلیت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. بعد از ۱۵ دقیقه پلیت را وارونه کرده و رنگ اضافی خارج شد و مجدداً سه مرتبه با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شد.

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

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

۲-مواد و روش‌ها

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

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

پرایمرهای رندوم هگزامر در حجم ۰/۵ ماکرولیتر به RNA (در غلظت ۵۰۰ میکروگرم) در مخلوط واکنش اضافه شد و سپس تمامی ترکیبات برای سنتز cDNA در واکنش دمایی ۲۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و در نهایت برای غیر فعال کردن آنزیم ریورس ترانسکریپتاز (برای ممانعت از ایجاد اختلال در واکنش Real-Time PCR) در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ثانیه طبق دستورالعمل کیت قرار گرفت. برای ارزیابی بیان دو ژن *algD* و *PpyR*، از تکنیک Real-time PCR بر پایه روش سایبرگرین استفاده شد.

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

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

مرحله Pre incubation (۹۵)، مرحله Denature (۹۵) درجه سانتی گراد)، مرحله Annealing (۶۰-۵۰ درجه سانتی گراد) و مرحله Extension (۷۲ درجه سانتی گراد).

پرایمرهای مورد استفاده در واکنش طبق جدول ۱ می باشد:

جدول ۱ پرایمرهای مورد نیاز برای Real-Time PCR

ریورس	فوروارد	ژن‌ها
5- TCCTCGATCAGCGGGATC -3	5- GCGACCTGGACCTGGGCT -3	<i>algD</i> (۱۸)
5- ACAGCAGACCTCCCAACCG -3	5- CGTGATCGCCGCCTATTTC -3	<i>ppyR</i> (۱۹)
5- AGGCCCGGGAACGTATTAC -3	5- GAGGAAGTTGGGGATGACGT -3	<i>16srRNA</i> (۲۰)

t-test و One Way ANOVA استفاده شد و داده‌هایی با *p value* کمتر از ۰/۰۵ معنی دار گزارش شد.

۳- نتایج

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

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

۲-۵ میکروسکوپ الکترونی

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

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

در ابتدا استخراج RNA از سویه‌های بالینی توسط محلول RnX شرکت سیناکلون ساخت کشور ایران بر پایه روش فنل-کلروفرم انجام شد. سپس، سنتز cDNA توسط پروتکل کیت تاکارا ساخت کشور ژاپن انجام شد. برای این کار، بافر 5X Prime Script در حجم ۲ میکرولیتر، آنزیم RT در حجم ۰/۵ میکرولیتر، پرایمر الیگو dT و

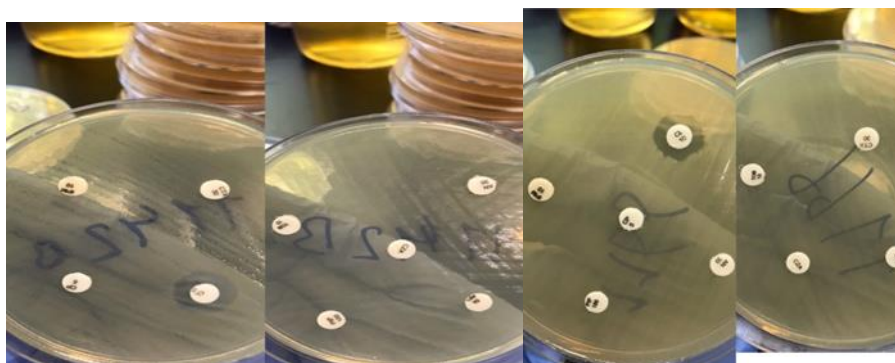
۲-۷ آنالیز آماری

در این مطالعه، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها توسط نرم افزار graph pad انجام شد. برای ارزیابی‌های بیان ژن از آزمون

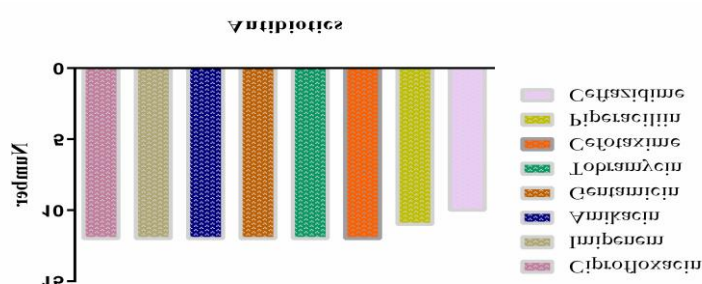
۱-۳ آنتی بیوگرام

از میان ۵۰ سویه بالینی مورد بررسی توسط تست آنتی بیوگرام، تعداد ۱۲ سویه یالینی با بیشترین میزان مقاومت آنتی بیوتیکی به داروهای خط در مان، انتخاب شدند (شکل ۱) از آنجایی که ارتباط مستقیمی میان مقاومت های چند دارویی و ایجاد بیوفیلم گزارش شده است، سویه هایی با بیشترین میزان مقاومت برای پژوهش حاضر انتخاب شدند. [۷-۹]. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، بررسی نتایج مقاومت در سویه های انتخاب شده در برابر

آنتی بیوتیک های مختلف نشان داد که، همه ۱۲ سویه ی انتخابی به آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، ایمپنم، آمیکاسین، جنتامایسین، توبرامایسین و سفوتاکسیم مقاومت داشتند در حالی که در مورد سفتازیدیم، تنها ۱۰ سویه از ۱۲ سویه مورد مطالعه به عنوان مقاوم شناخته شدند و ۲ سویه دیگر حساس به این آنتی بیوتیک بودند و همچنین در مورد پیراسیلین، ۱۱ سویه مقاوم شناخته شدند و تنها یک سویه نیمه حساس به این آنتی بیوتیک بود (شکل ۲).



شکل ۱ نتایج تست آنتی بیوگرام؛ بررسی میزان مقاومت سویه های *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیک های خط اول درمان و انتخاب ۱۲ سویه با بالاترین میزان مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک های خط اول درمان



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

۲-۳ بیوفیلم زایی

با توجه به ارزیابی های صورت گرفته علی رغم شکل گیری بیوفیلم پر قدرت توسط *P. aeruginosa*، سویه ها در

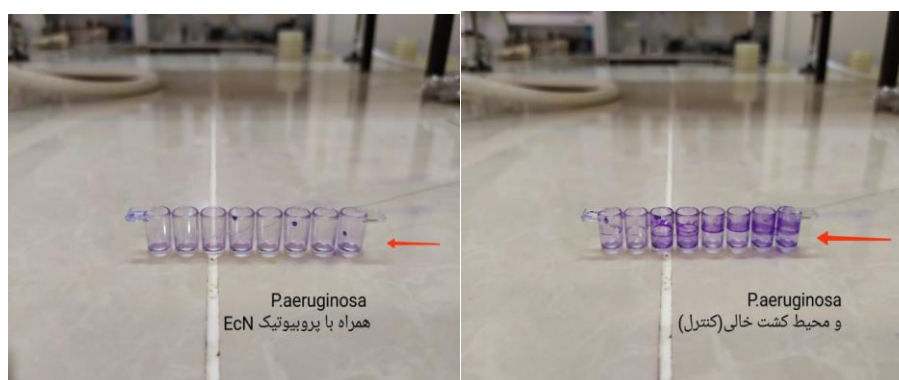
حضور *ECN* به عنوان پروبیوتیک مورد استفاده، قدرت تشکیل بیوفیلم کمتری را از خود نشان دادند و در برخی سویه ها در حضور پروبیوتیک به میزان قابل ملاحظه ای از

۳-۳ Real-time PCR

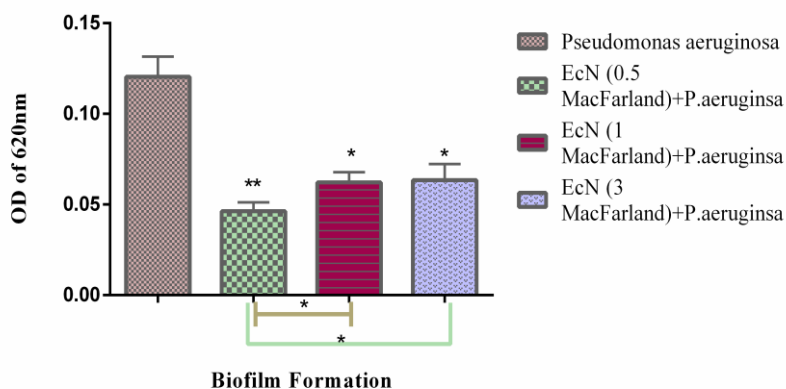
با توجه به نتایج به دست آمده از خوانش OD بیوفیلم زایی مشاهده شد، غلظت ۰/۵ McFarland از پروبیوتیک به عنوان بهترین غلظت مؤثر عمل کرده است و بیشترین میزان کاهش معنی دار را در ممانعت از رشد سویه های بالینی *P. aeruginosa* و مهار تشکیل بیوفیلم ناشی از سویه ها داشته است. از سوی دیگر نسبت به غلظت های بالاتر نیز کاهش معنی داری را نشان داده است و بنابراین به عنوان بهترین غلظت برای مطالعات بعدی و ارزیابی بیان ژن های *algD* و *PpyR* انتخاب شد. همانطور که در شکل ۵ قابل مشاهده است، کاهش بیان معنی داری در ژن *PpyR* نسبت به کنترل داخلی مشاهده شد ($p < 0/001$). در حالی که کاهش بیان در ژن *algD* مشاهده شد اما این کاهش نسبت به کنترل معنی دار گزارش نشد. این نکته نیز حائز اهمیت است که بیان ژن *PpyR* نسبت به *algD* نیز کاهش معنی داری را نشان داد (شکل ۵) ($p < 0/001$).

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

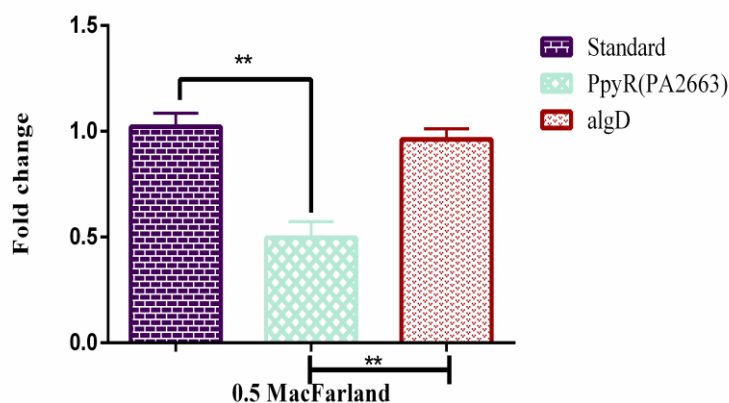
همانطور که در شکل ۴ قابل مشاهده است، خوانش در $OD = 620$ نشان داد که تشکیل بیوفیلم در هر سه غلظت ۰/۵ McFarland، ۱ و ۳ قابلیت ممانعت از شکل گیری بیوفیلم ناشی از سویه های بالینی *P. aeruginosa* را داشته است و در هر سه مورد نسبت به کنترل (*P. aeruginosa* در عدم حضور پروبیوتیک) دارای کاهش معنی داری می باشد، هرچند این کاهش در ارتباط با غلظت ۰/۵ McFarland با $p < 0/001$ و در دو غلظت ۱ و ۳ به میزان $p < 0/05$ گزارش شد. قابل ملاحظه است که کاهش بیان بیشتری که در ایجاد بیوفیلم در غلظت ۰/۵ McFarland نسبت به دو غلظت بالاتر مشاهده شد نیز معنی دار گزارش شد (شکل ۴) ($p < 0/05$).



شکل ۳ تصویر سمت راست نماینگر سویه های سودوموناس آئروژینوزا به همراه محیط کشت خالی است (به عنوان کنترل منفی - فاقد تیمار پروبیوتیکی) و بیوفیلم شکل گرفته توسط سودوموناس آئروژینوزا در دیواره چاهک ها با غلظت بالا می باشد و تصویر سمت چپ که سویه سودوموناس آئروژینوزا همراه با تیمار پروبیوتیکی می باشد که همانطور که در تصویر مشخص است و سویه پروبیوتیک به خوبی توانسته به میزان قابل قبولی از تشکیل بیوفیلم ناشی از سودوموناس آئروژینوزا جلوگیری کند.



شکل ۴ نتایج بیوفیلم‌زایی. بیوفیلم‌زایی در غلظت نیم فک فارلند از تیمار پروبیوتیکی نسبت به کنترل (سویه فاقد تیمار پروبیوتیکی) کاهش معنی‌داری را با $p = 0.001$ نشان داد. در غلظت‌های ۱ و ۳ مک فارلند از تیمار پروبیوتیکی نیز کاهش معنی‌داری را نسبت به سویه کنترل با $p = 0.01$ مشاهده شد، هر چند که این کاهش در مقایسه با غلظت نیم مک فارلند به میزان کمتری مشاهده شد. از سویه دیگر کاهش بیشتری که در تیمار با غلظت نیم مک فارلند مشاهده شد نسبت به هر دو غلظت ۱ ($p = 0.0102$) و غلظت ۳ ($p = 0.0710$) معنی‌دار گزارش شد.

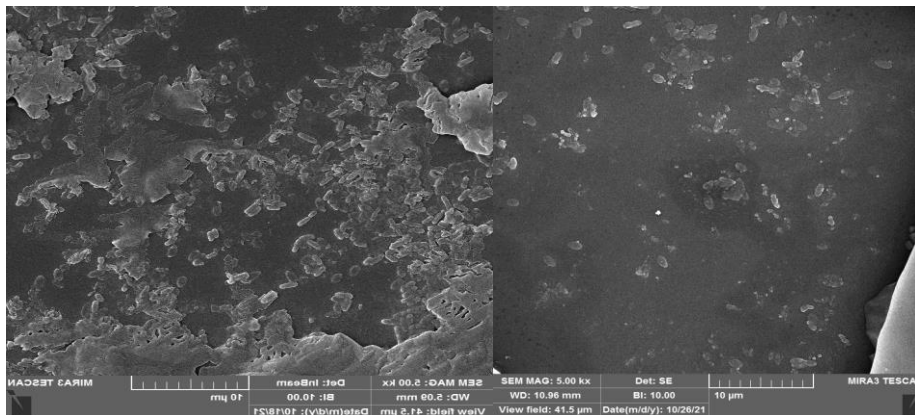


شکل ۵ نتایج Real Time PCR: ارزیابی‌های بیان دو ژن alg D و PpyR نشان داد که در حضور تیمار پروبیوتیکی بیان ژن Alg D به میزان معنی‌داری ($p = 0.001$) کاهش می‌یابد، گرچه در بیان ژن PpyR نیز نسبت به کنترل کاهش مشاهده شد. اما این کاهش معنی‌دار گزارش نشد. از سوی دیگر کاهش بیان alg D نیز نسبت به PpyR معنی‌دار گزارش شد ($p = 0.001$).

تصویر سمت راست عدم تجمع باکتری‌های *P. aeruginosa* به علت حضور باکتری *EcN* را نشان می‌دهد و نتایج حاکی از آن است که *EcN* توانست از تشکیل بیوفیلم ناشی *P. aeruginosa* به میزان بالایی جلوگیری کند (شکل ۶).

۳-۴ میکروسکوپ الکترونی

برای بررسی تاثیر *EcN* بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلم تصاویری توسط میکروسکوپ الکترونی گرفته شد طبق شکل شماره ۶ در تصویر سمت چپ نمونه تصویر برداری شده تجمع باکتری‌های *P. aeruginosa* را نشان می‌دهد و



شکل ۶ تصویر سمت چپ تصویر میکروسکوب الکترونی که تجمع باسیل های *P. aeruginosa* در آن دیده می شود و تصویر سمت راست عدم وجود تجمع باکتری *P. aeruginosa* به علت حضور EcN

۴- بحث و نتیجه گیری

همانطور که بیان شد، مقاومت های آنتی بیوتیکی امروزه تبدیل به چالش بزرگی در درمان شده است و وجود مکانیسم های متفاوت باکتری ها از جمله توانایی تشکیل بیوفیلم باعث مقاومت آنها در برابر آنتی بیوتیک ها می شود و در نتیجه درمان و کنترل عفونت ها را با مشکل مواجهه کرده است. مقاومت آنتی بیوتیکی می تواند از سه طریق، ذاتی، اکتسابی و فرایند جهش زایی به باکتری ها انتقال یابد [۱۰]. پیش تر بیان شد یکی از مهم ترین باکتری هایی که مقاومت آنتی بیوتیکی بالایی داشته و امروزه درمان را با مشکل مواجه کرده است *P. aeruginosa* می باشد که باکتری فرصت طلب و عامل اصلی عفونت های بیمارستانی است [۱۱]. باکتری *P. aeruginosa* به دلیل توانایی تشکیل بیوفیلم مقاومت زیادی نسبت به آنتی بیوتیک ها دارد. از این رو، به دلیل اهمیت بالای این موضوع در چند دهه اخیر دانشمندان زیادی مکانیسم های مقاومت باکتری ها در زمینه مهار و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم را مورد ارزیابی قرار دادند. از سوی دیگر علاقه روزافزون به ارتقای سلامت به روش طبیعی، تحقیقات در زمینه پروبیوتیک را در مقیاس جهانی در دو دهه اخیر تشدید کرده است، در نتیجه منجر به تولید صنعتی تعداد قابل توجهی از محصولات جدید شده است [۱۲]. با توجه به اثرات مفید پروبیوتیک ها در

زمینه های مختلف در مطالعات اخیر پروبیوتیک ها به عنوان یک گزینه ی مناسب در مانی در برابر مقاومت های آنتی بیوتیکی انتخاب شدند. مطالعه Dariush shokri et al نشان داد که *Lactobacillus* ها به دلیل تولید ترکیبات ضد باکتری مختلف به عنوان مثال، تولید متابولیت هایی مانند، اسیدهای استیک و لاکتیک، و کاهش pH، رشد باکتری های بیماری زا را مهار می کنند.

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

مقاومت دارویی این باکتری ۵۸ درصد تخمین زده شده است [۳۱]. همین امر ضرورت مطالعه بر روی این باکتری و معرفی فاکتورهای جدید با پتانسیل درمانی را ایجاد می‌کند. در تشکیل بیوفیلم *P. aeruginosa* ژن‌های زیادی از جمله دو ژن *algD* و *PpyR* دخیل هستند که طبق تحقیقات متاآنالیز در همه‌ی سویه‌های *P. aeruginosa* مقاوم به آنتی‌بیوتیک وجود دارند [۳]. بنابراین، برای بررسی اثر پروبیوتیک بر ارزیابی بیان ژن‌ها در این مطالعه انتخاب شدند. در طی مطالعاتی که بر روی تحقیقات اخیر در ارتباط با بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی و همچنین کاربرد پروبیوتیک‌ها به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی جدید انجام شده است، فرضیه‌ای شکل گرفت مبنی بر آنکه پروبیوتیک *E. coli Nissle1917* می‌تواند به‌عنوان یک گزینه‌ی درمانی جدید برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و کاهش مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌ها از جمله *P. aeruginosa* در نظر گرفته شود و برای اثبات این فرضیه در این مطالعه ۵۰ سویه *P. aeruginosa* از نمونه‌های بالینی جدا شد. از میان ۵۰ سویه بالینی *P. aeruginosa* که توسط تست آنتی‌بیوگرام مورد بررسی قرار گرفتند، ۱۲ سویه بالینی که بیشترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی به داروهای خط اول درمان را داشتند انتخاب شدند، زیرا بسیاری از مطالعات گزارش کردند که ارتباط معنی‌داری میان مقاومت آنتی‌بیوتیکی و ایجاد بیوفیلم وجود دارد [۹-۱۷]. این موضوع در نتایج حاصل از پژوهش حاضر نیز دیده شد و به‌طور جالبی سویه‌هایی که دارای رنج مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالاتری بودند بیوفیلم بیشتری را نسبت به سویه‌های دیگر داشتند، از این‌رو برای ادامه بررسی‌ها در این مطالعه به انتخاب سویه‌هایی با بالاترین میزان مقاومت آنتی‌بیوتیکی پرداخته شد. با مشاهده کاهش چشمگیر شکل‌گیری بیوفیلم در حضور سویه پروبیوتیک به ارزیابی دو ژن کلیدی در تشکیل بیوفیلم پرداخته شد که آیا این مشاهده فنوتیپی می‌تواند ارتباط با بین این دو ژن کلیدی

در مطالعه‌ای دیگر که توسط Da-hye lee و همکاران انجام شد، نشان داده شد که باکتریو سین HW01 باعث کاهش تولیدفاکتورهای ویروالانس مانند پیوسیانین، پروتئاز و رامنولپید در *P. aeruginosa* KCTC 2004 می‌شود [۲۲]. بر اساس گزارش مطالعات مختلف در ارتباط با کارایی پروبیوتیک‌ها و باتوجه به افزایش نرخ مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی و ناکارآمدی آنتی‌بیوتیک‌ها در پژوهش حاضر تلاش شد تا به ارزیابی اثر پروبیوتیک *EcN* بر روی شکل‌گیری بیوفیلم ناشی از *P. aeruginosa* پرداخته شود؛ زیرا بیوفیلم ناشی از *P. aeruginosa* یکی از مشکلات رایج در پزشکی می‌باشد و ارتباطی مستقیم با مقاومت آنتی‌بیوتیکی دارد. در سال‌های اخیر مطالعاتی در مورد کارایی باکتری *EcN* به انجام رسیده است و پژوهشگران این باکتری را در زمینه‌های مختلف در برابر باکتری‌های پاتوژن و بیوفیلم آنها ارزیابی کردند. مطالعه‌ی انجام شده توسط yang et al نشان داد که، گونه‌های *Lactobacillus* و *Bifidobacterium* با استفاده از روش انتشار چاه آگار، توانستند رشد باکتری *E. coli* مقاوم به دارو را کاهش دهند. به عبارت دیگر، فعالیت مهار پروبیوتیک‌های غنی شده با سلنیوم در برابر باکتری *E. coli* بیماری‌زا در شرایط *in vitro* و *in vivo* به خوبی مستند شده است [۱۴]. همچنین، وجود *EcN* به شدت تولید بیوفیلم *C. perfringens* CP4 و تعداد *Clostridium perfringens* در بیوفیلم را کاهش داد. مکانیسم مشخص شده احتمالاً به دلیل سیستم منحصر به فرد یوسینیا باکترین *EcN*، توانایی ایجاد چندین چسبندگی و فیمبریا یا ترکیب آن است [۱۶] و [۱۵]. مطالعات ما نیز با نشان دادن کارایی اثر *EcN* بر روی مهار و کاهش فرایند بیوفیلم‌زایی می‌تواند این باکتری پروبیوتیکی را به‌عنوان یکی از باکتری‌های پروبیوتیک با پتانسیل پیشگیری و مهار بیوفیلم‌زایی معرفی کند. *P. aeruginosa* از نظر اپیدمیولوژی نقش مهمی در عفونت‌های بیمارستانی دارد و در کشور ما نیز میزان شیوع

the establishment of urinary tract infections. FEMS Microbiology Letters.;364.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

برای ارزیابی بیان ژن های مرتبط با بیوفیلم (*PpyR* و *algD*) در مجاورت با *EcN* از غلظت McFarland 0/5 پروبیوتیک استفاده شد و نتایج Real-time PCR بیانگر آن بود که در حضور پروبیوتیک مورد بررسی کاهش معنی داری در بیان ژن *PpyR* مشاهده شد. با توجه به کاهش بیان این ژن در حضور *EcN* و به دلیل اینکه این ژن در تشکیل بیوفیلم و فاکتور های بیماری زایی *P. aeruginosa* (الاستاز، پیووردین و مولکول های سیگنال کروم سنسینگ) نقش مهمی دارد [17]، می توان نتیجه گرفت که *EcN* با اثر بر روی یکی از ژن های کلیدی شکل گیری بیوفیلم در *P. aeruginosa* می تواند منجر به کاهش شکل گیری بیوفیلم شده و می تواند به عنوان یکی از فاکتور های درمانی جدید معرفی و مورد ارزیابی های بیشتر قرار گیرد. از این رو می توان در مطالعات بعدی به ارزیابی و بررسی نقش این پروبیوتیک در بیوفیلم زایی پاتوژن های مختلف و همچنین امکان تولید متابولیت های مختلف این باکتری پرداخت تا بتوان با قطعیت در ارتباط با متابولیت ترشحی اثر گذار بر این روند بیوفیلم زایی اظهار نظر کرد.

۵-منابع

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

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

[3] Newman1 JW, Floyd2 R, Fothergill1 JL. 2017; The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in

direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2001 Apr;15(3):131-7.

[21] Sonnenborn U. *Escherichia coli* strain Nissle 1917—from bench to bedside and back: history of a special *Escherichia coli* strain with probiotic properties. *FEMS microbiology letters*. 2016 Oct 1;363(19):fnw212.

[22] Lee D-H, Kim BS, Kang S-S. Bacteriocin of *Pediococcus acidilactici* HW01 inhibits biofilm formation and virulence factor production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics and antimicrobial proteins*. 2020;12(1):73-81.

[17] Attila C. 2009 ;Identification of *Pseudomonas aeruginosa* via a poplar tree model.

[18] Béatrice J, Maud P, Stéphane A, François C, Frédéric G, Benoit G, Marie-Odile H. Relative expression of *Pseudomonas aeruginosa* virulence genes analyzed by a real time RT-PCR method during lung infection in rats. *FEMS microbiology letters*. 2005 Feb 1;243(1):271-8.

[19] Fusco A, Savio V, Stelitano D, Baroni A, Donnarumma G. The intestinal biofilm of *pseudomonas aeruginosa* and *staphylococcus aureus* is inhibited by antimicrobial peptides HBD-2 and HBD-3. *Applied Sciences*. 2021 Jul 18;11(14):6595.

[20] Jaffe RI, Lane JD, Bates CW. Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa*

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

Mohadeseh Farnaghizad¹, Yasaman Issazadeh², Sarvenaz Falsafi³, Ava Behrouzi^{4*}

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

ava.behrouzi@gmail.com

Receipt: 2025/05/14

Accepted: 2023/04/10

Abstract

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

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