Archive of SID

مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره بیستم - پائیز ۱۳۹۴

NCMBJ
Research Article
مقاله تحقیقی

تولید پیوسین توسط باکتری سودوموناس آئروجینوزا و بررسی اثر سینرژیسم آن با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج در شرایط آزمایشگاهی

ناهید سپهری[۱]،محمد مهدی محمودی*[۲]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران
۲. استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران

چکیده

سابقه و هدف:سودوموناس آئروجینوزا یکی از عوامل مهم عفونت های بیمارستانی محسوب می شود. با توجه به مقاومت گسترده آنتی بیوتیکی ومحدود بودن دارو های مؤثر، امروزه توجه زیادی به استفاده از عوامل دارویی جایگزین شده است. یکی از موارد جایگزین، پیوسین تولیدی توسط سودوموناس می باشد که می تواند بر گونه های خویشاوند و حتی دیگر جنس ها نیز اثر ممانعتی داشته باشد. این مطالعه با هدف تولید و بررسی اثرات ضد میکروبی پیوسین بر تعدادی از باکتری های بیماری زا و بررسی اثر سینرژیسم آن با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج انجام شده است.

مواد و روش ها: تولید پیوسین توسط سویه های جداسازی شده سودوموناس آئروجینوزا، بدون القاگر و در حضور القاگرمیتومایسین سی در دما ها وpH های مختلف بررسی شد. اثر ممانعتی پیوسین بر تعدادی از باکتری های بیماری زا مورد مطالعه قرار گرفت هم چنین پدیده سینرژیسم بین پیوسین تولیدی با تعدادی از آنتی بیوتیک ها بررسی شد.

یافته ها: تولید پیوسین هم در غیاب القاگر و هم به میزان بیشتری در حضور القاگر میتومایسین سی انجام گرفت. دمای ۳۷ درجه سلسیوس و pH=۷ بهترین شرایط برای تولید پیوسین بودند. پیوسین تولیدی، اثر ممانعتی قابل توجهی بر علیه باکتری های هدف نشان داد هم چنین با تعدادی از آنتی بیوتیک های مورد بررسی دارای اثر سینرژیسم بود.

بحث : این مطالعه نشان داد که خاک های بیابانی دارای گونه های متنوعی از اکتینومیست ها می باشند که تعدادی از آن ها دارای خواص وسیع الطیف ضد میکروبی هستند و منابع بالقو ه ای برای آنتی بیوتیک ها می باشند.

نتیجه گیری:پیوسین در شرایط آزمایشگاهی می تواند نقش مؤثری در مهار باکتری های بیماری زا داشته باشد. با انجام تحقیقات بیشتر و به ویژه در بدن موجود زنده می توان اطلاعات جامع تری در خصوص امکان بکارگیری آن به عنوان جایگزین و یا مکمل درمانی در درمان عفونت های باکتریایی بدست آورد.

کلمات کلیدی : پیوسین، میتومایسین سی، سینرژیسم، سودوموناس آئروجینوزا

مقدمه

سودوموناس آئروجینوزا باکتری گرم منفی میله ای شکل می باشد که تقریبا در تمامی انواع خاک ها و محیط های آبی یافت می شود.این باکتری طیف وسیعی از فاکتور های بیماری زا را به همراه دارد که آن را قادر می سازد تا محدوده وسیعی از گیاهان، حشرات و پستانداران را آلوده نماید. به عنوان یک باکتری فرصت طلب ظرفیت ایجاد عفونت درافرادی که ضعف سیستم ایمنی دارند و یا دچار آسیب دیدگی و یا سوختگی های شدید شده اند را دارا می باشد به ویژه عفونت با این باکتری در چشم، سیستم گردش خون، مجاری ادراری و تنفسی و هم چنین زخم های ناشی از سوختگی معمول است و به عنوان یکی از مهمترین عوامل عفونت های بیمارستانی محسوب می شود(۲۲). عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری به سختی درمان می شوندچرا

*نویسنده مسئول
دانشگاه آزاد اسلامی واحد کازرون، کازرون، ایران
ایمیل :mmmahmoodi636@yahoo.com
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۱۲
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

که این باکتری ذاتا به آنتی بیوتیک ها مقاوم بوده ویا اینکه مقاومت به آن ها را کسب می کند، بنابراین انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان عفونت های ایجاد شده با این باکتری با محدودیت همراه است(۳،۷،۲۲،۲۸).

امروزه به خوبی مشخص شده که درمان با آنتی بیوتیک های دارای طیف عملکرد وسیع می تواند سبب کاهش و ایجاد اختلال در عملکرد باکتری های مفید بدن شده و فضای مناسبی را برای جایگزینی عوامل بیماری زای دیگر ایجاد نماید. بنابراین جایگزینی روش های درمانی دیگر که بتوانند به صورت کاملا اختصاصی فقط عامل بیماری زا را در بدن میزبان مورد هدف قرار دهند ضروری به نظر می رسد. یکی ازروش های جایگزین درزمینه مبارزه اختصاصی علیه باکتری ها، استفاده از باکتریوسین ها می باشد. تحقیقات نشان داده که این عوامل ضد میکروبی که به صورت طبیعی توسط بسیاری از باکتری ها علیه نژاد های خویشاوند خود تولید می شوند قادرند به صورت اختصاصی عمل نموده و فقط سویه هایی خاص از باکتری ها را هدف قرار دهند(۴).باکتریوسین حاصل از سودوموناس آئروجینوزاکه پیوسین خوانده می شود نیز در زمره این ترکیبات ضد میکروبی قرار داشته و می تواند به عنوان یک داروی ارزشمند علیه مواردی از عفونت ها به کار گرفته شود(۸،۹).پیوسین ساختاری پروتئینی داشته و بر علیه گونه های خویشاوندو گاهی حتی بر علیه دیگر جنس ها نیز مؤثر می باشدودر چهارگروه قرار می گیرد. دو گروه تحت عنوان پیوسین های نوع R و نوعF شناخته می شوند که ساختار های مولکولی بزرگ مشابه با دم فاژی دارند. بسیاری از گونه های سودوموناس ژن هایی برای یک یا هر دونوع پیوسین RوFدارند(۱۸)که در کروموزوم اصلی باکتری قرار گرفته است. در بعضی از مقالات این دو نوع پیوسین به عنوان فاژ های ناقص مطرح شده اند.دو نوع دیگر تحت عنوان پیوسین های نوع Mو نوعS ترکیبات پروتئینی کوچک مشابه با کلیسین های اشریشیا کلی می باشند(۵،۱۲،۱۹،۱۶).از انواع ذکر شده، پیوسین نوع Rاز قابلیت ضد میکروبی کارآمدی برخوردار بوده و کارایی کشندگی آن ۱ تا ۲ ذره پیوسین به ازای یک باکتری هدف می باشد (۱۸). امروزه قدرت و توانایی بالای این نوع پیوسین استفاده از آن را به عنوان یک عامل ضد میکروبی مورد توجه قرار داده است(۲۳). همانند باکتریوفاژ ها، مولکول های پیوسین نیز به گیرنده های خاصی بر روی باکتری هدف متصل شده و با ساختار سوزن مانند خود در غشای باکتری نفوذ می کنند(۲۵).برخلاف باکتری وفاژ ها، پیوسین ها هیچ موادی برای تزریق به باکتری ندارند و باکتری هدف به واسطه اتلاف پتانسیل غشا، که از اتصال یک ذره ی پیوسینی ناشی می شود، از بین می رود(۱۱،۲۵،۲۷).

تحقیقات نشان داد ه است که سویه هایی از باکتری سودوموناس آئروجینوزا در محیط کشت غنی معمولا سطح پایه ای از فعالیت تولید پیوسین را نشان می دهند و تولید پیوسین به وسیله تیمار هایی که موجب آسیب به DNAباکتری شود افزایش می یابد(۱۰).به عنوان مثال مشخص شده است که اشعه UV می تواند سبب شود تا این باکتری پیوسین ها را پیش از مرگ سلولی ایجاد نماید(۱۴)که با نرخ تقریبا ۲۰۰ ذره در هر سلول انجام می پذیرد(۱۶).از شرایط القایی دیگر حضور میتومایسن سی در محیط می باشد که با اتصال به ژنوم باکتری و اختلال در آن موجب تحریک تولید پیوسین می شود(۱۷).

روش کار

جمع آوری نمونه نمونه های باکتری

در این تحقیق ۱۰ نمونه سودوموناس آئروجینوزااز منابع کلینیکی مختلف شامل ادرار، خون، مدفوع و زخم های ناشی از سوختگی جمع آوری شد. نمونه ها بر اساس رنگ آمیزی گرم، تولید پیگمان، تست اکسیداز، تخمیر قند ها، تست OF و توانایی رشد در ۴۲ درجه سلسیوس شناسایی شدند.

تولید پیوسین بدون القاگر

از محیط کشت سنتزیpyocinproductionmedium81با ترکیب ۳۰ گرم محیط کشت تریپتی کیز سوی براث بدون گلوکز و۱۰ گرم نیترات پتاسیم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر برای کشت باکتری استفاده گردید. محیط کشت در یک سری لوله در مقادیر ۵ میلی لیتری توزیع و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه اتوکلاوگردید. سویه های خالص سازی شده سودوموناس به طور جداگانه در لوله ها تلقیح شده ودر دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرم خانه گذاری شدند.جهت کشتن سلول های باکتری و آزادسازی مولکول های پیوسین، میزان ۱ میلی لیتر کلروفرم به هر لوله اضافه شد و لوله ها به مدت ۲۰ ثانیه به شدت توسط شیکرلوله ای تکان داده شدند و پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای اتاق، مجددا ۲۰ ثانیه دیگر این عمل تکرار گردید. جهت حذف کلروفرم، لوله ها به مدت یک شب در یخچال با در باز نگهداری شدند و در نهایت جهت حذف بقایای سلولی به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند(۲۱).

تولید پیوسین در حضور القاگر میتومایسین سی

سویه های سودوموناس جداسازی شده، در محیط تریپتیک

www.SID.ir

Archive of SID

سوی براث کشت داده شدند و به مدت ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بر روی شیکر (۱۵۰ دور در دقیقه) قرار گرفتند. سپسمی توسایسین سی (مرک آلمان) به میزان ۱ میکروگرم در میلی لیتر به لوله ها اضافه گشته و مجددا به مدت ۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند. همانند مرحله قبل، عمل افزودن کلروفرم و هم زدن شدید لوله ها بر روی شیکر لوله ای در دو مرحله ۲۰ ثانیه ای انجام گرفت و در نهایت شیرابه کشت باکتری با سانتریفیوژ نمودن با سرعت ۱۴۰۰۰ دور در دقیقه بدست آمد(۲۶).

بررسی اثر ضد باکتریایی پیوسین تولیدی

جهت بررسی فعالیت ضدباکتریایی پیوسین تولیدی،شیرابه سانتریفیوژ شده سویه مورد بررسی که در مراحل قبل تهیه شد با روش انتشار چاهکی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور باکتری های هدف را که قبلا در محیط نوترینت براث کشت داده و غلظت آن ها توسط لوله ۰/۵ مک فارلند معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ (باکتری در میلی لیتر) تنظیم گشته بود، در سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت کامل کشت داده و میزان ۱۰۰ میکرولیتر از شیرابه کشت سودوموناس، به چاهکی که توسط پی پت پاستور استریل در آگار ایجاد شد اضافه گردید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری گردید. فعالیت ضد باکتریایی پیوسین بر اساس اندازه گیری قطر هاله عدم رشد تعیین شد.

استخراج پیوسین با سولفات آمونیوم

سویه هایی از سودوموناس که از نظر تولید پیوسین بهترین قابلیت را از خود نشان دادند انتخاب کرده و با توجه به ماهیت پروتئینی پیوسین، از نمک جامد سولفات آمونیوم (مرک آلمان) جهت رسوب دهی و استخراج پیوسین تولیدی استفاده شد. برای این منظور ابتدا شیرابه کشت مایع باکتری (که قبلا در حضور القاگر میتومایسین سی گرمخانه گذاری شده بود) با سانتریفیوژ نمودن (۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه) فراهم شد و جهت رسوب دادن پیوسین تولیدی،میزان ۷/۶۸ گرم نمک سولفات آمونیوم به ازای هر ۱۰ میلی لیتر شیرابه به آن افزوده و بر روی شیکر به مدت یک ساعت مخلوط گردید سپس پروتئین های رسوب کرده، به کمک سانتریفیوژ (۱۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه) از مایع رویی جدا گشته و در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس خشک گردید(۲۴).

۳۰۰ کلنی جدا شد و پس از خالص سازی در محیط TSB حاوی گلیسرول در دمای ۸۰- نگه داری گردید.

تعیین حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) **و حداقل غلظت کشندگی** (MBC)

مقدار ۵۰ میلی گرم از پودر پیوسین استخراج شده در مرحله قبل را در یک میلی لیتر بافرPBS حل کرده و با روش رقیق سازی متوالی، رقت های مختلفی (هر رقت نصف رقت قبلی) از آن در لوله های حاوی یک میلی لیتر محیط کشت تریپتیک سوی براث تهیه شد و حداقل غلظت مهار کنندگی و کشندگی آن بر علیه تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور ابتدا با استفاده از لوله ۰/۵ مک فارلند، غلظت باکتری هدف را معادل $۱/۵\times۱۰^{۸}$ (باکتری در میلی لیتر) تنظیم نموده و میزان یک میلی لیتر از باکتری هدف به هر یک از لوله های حاوی پیوسین افزوده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، کمترین رقتی از پیوسین که مانع از رشد باکتری هدف شده بود به عنوان MICدر نظر گرفته شد. از لوله هایی که فاقد کدورت بودند نیز نمونه برداری کرده و مجددا در تعدادی از لوله های حاوی تریپتیک سوی براث کشت داده شد که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، کمترین رقتی که فاقد کدورت بود به عنوان MBC در نظر گرفته شد.

بررسی تاثیر دما بر تولید پیوسین

جهت بررسی تاثیر دما بر میزان تولید پیوسین، سویه های مولد پیوسین در محیط کشتتریپتیک سوی براث کشت داده شدند و در دما های مختلف ۲۵،۲۸،۳۱،۳۴، ۳۷،۴۰، ۴۳ و ۴۶ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شدند. میزان نسبی پیوسین تولید شده،با روش انتشار چاهکی و اندازه گیری هاله های عدم رشد بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا تعیین گردید.

بررسی تاثیر pH بر تولید پیوسین

جهت بررسی تاثیر pH بر میزان تولید پیوسین، سویه های مولد پیوسین در محیط کشتتریپتیک سوی براث که قبلا توسط محلول های یک نرمال هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریکpH آن ها در مقادیرمختلف ۴، ۵، ۶، ۷ و ۸ تنظیم شده بود کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. میزان نسبی پیوسین تولید شده، با روش انتشار چاهکی و اندازه گیری هاله های عدم رشد بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا تعیین گردید.

بررسی پدیده سینرژیسم

جهت بررسی پدیده سینرژیسم بین پیوسین تولیدی با تعدادی

www.SID.ir

Archive of SID

از آنتی بیوتیک های رایج، ابتدا به کمک سمپلر میزان ۳۰ میکرولیتر از پیوسین حل شده در بافر PBS(با غلظت ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر) را به تعدادی از دیسک های آنتی بیوتیکی افزوده و تا خشک شدن کامل در گرمخانه ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. هم چنین از کاغذ فیلتر واتمن نمره ۴ نیز دیسک هایی با قطر ۶ میلی متر تهیه کرده و پس از استریل کردن، به هر کدام میزان ۳۰ میکرولیتر محلول پیوسین اضافه و جهت خشک شدن در گرمخانه قرار داده شدند. سپس باکتری هدف را که قبلا غلظت آن توسط لوله ۰/۵ مک فارلند تنظیم شده بود در سطح محیط مولر هینتون آگار به صورت کامل کشت داده و به ازای هر آنتی بیوتیک مورد بررسی، یک دیسک حاوی آنتی بیوتیک، یک دیسک حاوی آنتی بیوتیک آغشته به پیوسین و یک دیسک حاوی پیوسین در سطح محیط کشت قرار داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، اثر سینرژیسم از مقایسه هاله های عدم رشد در اطراف سه دیسک مربوطه تعیین گردید. این آزمایش برای هر آنتی بیوتیک سه بار تکرار گشته و در نهایت میانگین تکرار ها در نظر گرفته شد.

نتایج

غربالگری اولیه نشان داد که از بین ۱۰ نمونه کلینیکی مورد بررسی، چهار نمونه قابلیت تولید پیوسین را دارند. تولید پیوسینهم در حضور القاگر میتومایسین سی و هم در غیاب آن انجام گرفت ولی بررسی قطر هاله های عدم رشد بر روی باکتری های هدف نشان داد که در حضور القاگر میتومایسین سی، تولید پیوسین به میزان بیشتری صورت گرفته است(نمودار ۱).

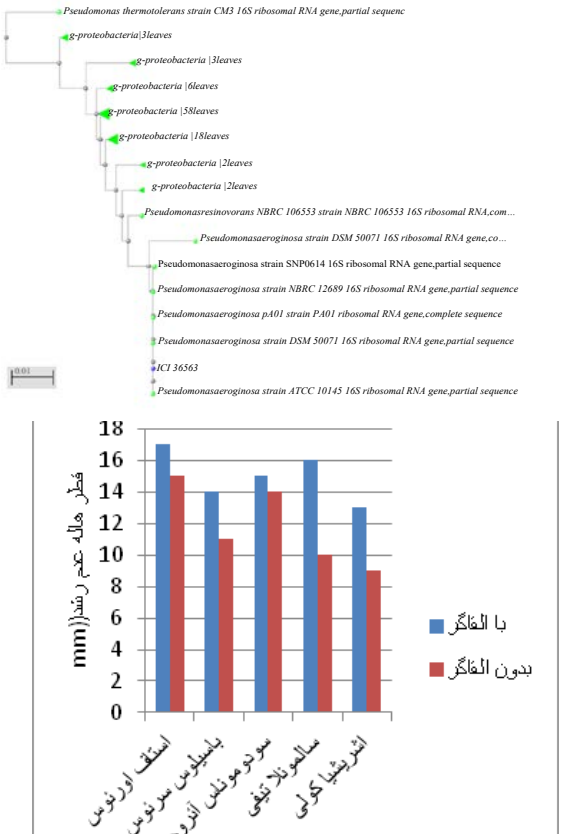
در بین سویه های مولد پیوسین، سویه ای که بیش ترین توانایی تولید پیوسین را از خود نشان داد انتخاب گشته و با روش مولکولی بر اساس تعیین توالی ژن 16SrDNA و مقایسه با بانک ژنی مورد شناسایی قرار گرفت که به میزان ۹۹/۹ درصد باسویه *Pseudomonas aeruginosa*LMG1242خویشاوندی داشت که میزان این قرابت در درخت فیلوژنی شکل ۱ نشان داده شده است.

بررسی اثر دما بر میزان تولید پیوسین نشان داد که تولید پیوسیندر محدوده دمایی بین ۳۱ تا ۴۳ درجه سلسیوس قابل انجام بوده و بیش ترین میزان تولید در دمای ۳۷ درجه سلسیوس بوده است (نمودار ۲).

بررسی اثر pH های مختلف محیط کشت بر میزان تولید پیوسین نشان داد که تولید پیوسین در محدوده pH=۴ تا ۸ قابل انجام بوده و بیش ترین میزان تولید پیوسین در pH=۷ انجام گرفت (نمودار۳).

بررسی اثر ضد باکتریایی پیوسین استخراج شده توسط سولفات آمونیوم که بر علیه تعدادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی انجام گرفت نشان داد که پیوسین تولیدی بر باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس، باسیلوس سرئوس، سودوموناس آئروجینوزا، اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی اثر مهار کنندگی دارد که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی حداقل غلظت ممانعت کنندگی(MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)پیوسین تولیدی که بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفت نشان داد که غلظت۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از پیوسین تولیدی به عنوان حداقل غلظت ممانعت کننده رشد و غلظت ۷۸۰ میکروگرم بر میلی لیتر از آن به عنوان حداقل غلظت کشندگی می باشد.

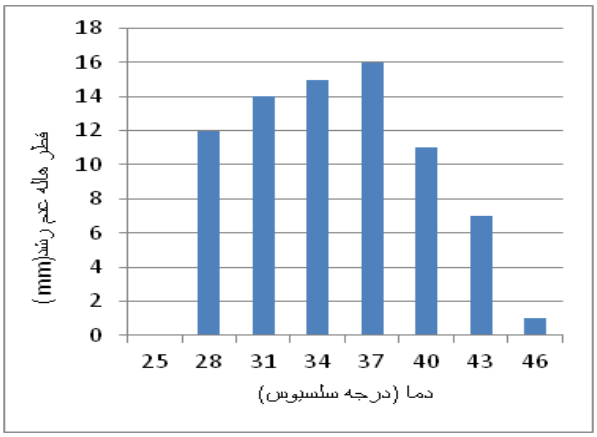
بررسی اثر سینرژیسم بین پیوسین تولیدی با تعدادی از آنتی بیوتیک های رایج بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا نشان داد که اثر سینرژیسم قابل توجهی بین پیوسین تولیدی با آنتی بیوتیک های ایمی پنم، آمپی سیلین، اریترومایسین، کلرآمفنیکل، سفکسیم و پنی سیلین ایجاد شده است که نتایج آن در جدول ۱ مشاهده می شود.



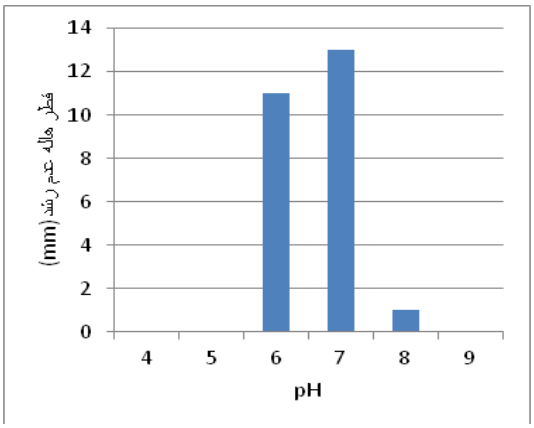
نمودار ۱: مقایسه میزان نسبی تولید پیوسین در حضور القاگر میتومایسین سی و در غیاب آن و اثر بازدارندگی آن بر باکتری های مورد بررسی

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۲: بررسی میزان نسبی تولید پیوسین در دما های مختلف



نمودار۳: بررسی میزان نسبی تولید پیوسین در pH های مختلف

آنتی بیوتیک مورد بررسی	قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی بیوتیک	قطر هاله عدم رشد دیسک آنتی بیوتیک آغشته به پیوسین
ایمی پنم	۲۰	۲۵
سفوتاکسیم	۱۳	۱۳
سفالکسین	مقاوم	مقاوم
آمیکاسین	۱۵	۱۶
نالیدیکسیک اسید	۱۱	۱۱
سفتیزوکسیم	۱۲	۱۲
سفتریاکسون	۱۶	۱۶
آمپی سیلین	مقاوم	۱۰
اریترومایسین	مقاوم	۱۰
جنتامایسین	۱۳	۱۴
کلرامفنیکل	مقاوم	۱۲
سفکسیم	مقاوم	۱۴
پنی سیلین	مقاوم	۱۰

جدول۱: اثر سینرژیسم بین پیوسین تولیدی با تعدادی از آنتی بیوتیک ها بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا

بحث

امروزه مساله مقاومت آنتی بیوتیکی به شکل بسیار جدی مطرح شده است. یکی از باکتری های مقاوم به دارو سودوموناس آئروجینوزا است.این باکتری به عنوان یک عامل بیماری زای فرصت طلب و مهم در افراد دارای نقص ایمنی می تواند به صورت ذاتی یا اکتسابی به آنتی بیوتیک ها مقاوم شود به همین دلیل انجام تحقیق در جهت به دست آوردن دارو های ضد میکروبی جدید برعلیه این باکتری ضروری به نظر می رسد که یکی از این موارد پیوسین حاصل از خود باکتری سودوموناس است. پیوسین پروتئینی است که توسط بعضی از نژاد های آئروجینوزا تولید شده و می تواند بر علیه دیگر نژاد های این باکتری و حتی دیگر گونه ها یا جنس های دیگر نیز اثر بازدارندگی و میکروب کشی از خود نشان دهد (۳،۸). مطالعات نشان داد ه اند که ارتباط زیادی بین تولید پیوسین و تولید رنگیزه توسط سویه مولد وجود دارد. در یک مطالعه مشخص گردید که کلنی های دارای رنگیزه های زرد یا زرد متمایل به قهو ه ای و سبز یا سبز متمایل به آبی با احتمال بیشتری توانایی تولید پیوسین را دارند(۱۳). در تحقیق حاضر نیز این مطلب مشاهده شد و از ۱۰ نمونه سودوموناس مورد بررسی، چهار موردی که دارای رنگیزه بودند از توانایی تولید پیوسین نیز برخوردار بودند.

مطالعات متعدد نشان داده اند که عوامل محرکی همچون اشعه ماوراء بنفش و یا بعضی از دارو ها و مواد شیمیایی که به ژنوم باکتری آسیب می رسانند می توانند به عنوان عوامل محرک تولید پیوسین عمل نموده و در نتیجه میزان پیوسین تولیدی توسط باکتری سودوموناس بسیار بیشتر از تولید این ماده در غیاب عامل محرک خواهد بود (۱۳، ۲۱، ۲۳و ۲۴). نتایج بدست آمده در تحقیق حاضر نیز تایید کننده این مطلب بود و همان طور که در نمودار ۱ مشاهده می شود تولید پیوسین در حضور ماده القاگر میتومایسین سی به مراتب بیشتر از تولید این ماده در غیاب القاگر صورت گرفته است. بنابراین در پژوهش هایی که در جهت تولید پیوسین انجام می گیرند بهتر است که از یک عامل محرک جهت وادار نمودن باکتری به تولید پیوسین بیشتر استفاده گردد.

در مطالعه ای که توسط ماتسویی و همکارانش در خصوص اثر درجه حرارت بر تولید پیوسین توسط باکتری سودوموناس آئروجینوزا انجام گرفته مشخص گردیده که تولید پیوسین با افزایش دما تا ۳۷ درجه سلسیوس افزایش می یابد و در دمای بالاتر از ۳۷ درجه سلسیوس به شدت کاهش یافته است(۲۳).

www.SID.ir

Archive of SID

در تحقیق حاضر نیز نتایج نشان داد که با افزایش دما از ۲۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس تولید پیوسین نیز افزایش می یابد به گونه ای که بیش ترین قطر هاله عدم رشد ایجاد شده توسط پیوسین تولیدی، مربوط به دمای ۳۷ درجه سلسیوس بوده است و با افزایش بیشتر دما میزان تولید پیوسین کاهش می یابد. با توجه به اینکه سودوموناس آئروجینوزا یک باکتری مزوفیل تحمل کننده سرما می باشد و در بعضی از کتاب های مرجع با نام سایکروتروف (psychrotroph)از آن یاد می شود قادر است در محدوده دمایی ۳۰ تا ۳۷ درجه سلسیوس رشد مناسبی داشته باشد لذا اثر دما بر تولید پیوسین احتمالا متفاوت از اثر دما بر میزان رشد سلول های باکتری است(۶). در بررسی اثر pH بر میزان تولید پیوسین، نتایج این تحقیق نشان داد که بیش ترین میزان تولید پیوسین در pH=۷ انجام می گیرد و در pH های کمتر از ۵ و یا بیشتر از ۹ تولید پیوسین متوقف شده و یا به اندازه ایاست که نمی تواند هاله عدم رشد محسوسی از خود نشان دهد. نتایج دیگر تحقیقات نیز تا حد زیادی موید این مسئله می باشد و بهینه pH تولید پیوسین را pH= ۷ و یا بسیار نزدیک به آن اعلام کرد هاند (۹،۱۰،۱۲). تا کنون تحقیقات زیادی در خصوص طیف عملکرد پیوسین صورت گرفته است و نشان داده اند که پیوسین می تواند علاوه بر گونه سودوموناس، بر علیه تعداد زیادی از باکتری های گرم مثبت و گرم منفی نیز اثر ضد میکروبی داشته باشد (۵، ۹، ۱۰، ۱۲، ۱۳، ۲۷). دراین مقاله نیز اثر ضد میکروبی پیوسین علاوه بر باکتری سودوموناس آئروجینوزا بر علیه باکتری های دیگری همچون باسیلوس سرئوس، اشریشیا کلی، سالمونلا تیفی واستافیلوکوکوس اورئوس مشاهده شد.تحقیقات در خصوص نحوه عملکرد پیوسین نشان داده اند که عملکرد پیوسین به صورت باکتریسیدال می باشد و می تواند با ایجاد ساختاری سوزن مانند، در سطح غشاء سلول باکتری ایجاد منفذ نموده و با برهم زدن پتانسیل غشاء سلولی موجب مرگ باکتری هدف شود(۹، ۱۱، ۱۸، ۲۰و ۲۸). این خصیصه می تواند یکی از علل برتری پیوسین در مقایسه با بسیاری از عوامل ضد میکروبی که فقط ممانعت کننده رشد بوده و به صورت باکتریواستاتیک عمل می کنند و در غیاب آن ها، باکتری هدف می تواند مجددا فعال شده و رشد نماید محسوب شود. در این تحقیق قطر هاله های ایجاد شده بواسطه عملکرد پیوسین که بر علیه تعدادی از باکتری های بیماری زا بررسی شده بود نشانگر پتانسیل و توانایی مناسب آن در ممانعت از رشد عوامل عفونی بود(نمودار ۱).

پرویز مهاجری در سال ۱۳۸۲ نشان داد آنتی بیوتیک هایی چون جنتامایسین، سفتازیدیم و توبرامایسین تا حدودی تاثیر خود را برسودوموناس از دست داده اند و احتمالا در آینده ای نزدیک این دسته از دارو ها نیز از فهرست دارو های ضد سودوموناس خارج می شوند(۲).طبق مطالعات انجام گرفته، یکی از آنتی بیوتیک هایی که به خصوص در مواقع بحرانی جهت درمان عفونت های ناشی از این باکتری مورد استفاده قرار می گیرد ایمی پنم است (۲۹).در مطالعه حاضر نیز سویه های سودوموناس آئروجینوزا جدا شده از نمونه های بالینی بیمارستان شهید فقیهی شیراز نسبت به آنتی بیوتیک های اریترو مایسین،کلرامفنیکل، ایمی پنم، سفوتاکسیم، آمیکاسین، نالیدیکسیک اسید، سفتیزوکسیم، سفتریاکسون، جنتامایسین، سفکسیم، آمپی سیلین، سفالکسین و پنی سیلین تعیین حساسیت شدند که نسبت به آنتی بیوتیک های اریترومایسین، آمپی سیلین،سفالکسین، پنی سیلین،کلرامفنیکل و سفکسیم مقاوم بودند و مؤثرترین آنتی بیوتیک علیه سویه ی بالینی جداسازی شده، ایمی پنم بود.می توان پیش بینی کرد که به زودی سویه های مقاوم سودوموناس نیز جایگزین سویه های حساس خواهند شد و درمان را با مشکلات بیشتری مواجه خواهند کرد لذا به نظر می رسد به کا رگیری پیوسین و یا دیگر باکتریوسین ها در کنار آنتی بیوتیک های رایج و یا حتی به جای آن ها بتواند تا حدودی عفونت های سودوموناسی و مقاومت آنتی بیوتیکی ناشی از آن را کنترل نموده و از ایجاد سویه های مقاوم جلوگیری نماید. به علاوه ترکیب نمودن آنتی بیوتیک های رایج فعلی نیز با پیوسین و استفاده از اثر سینرژیسمی آن ها باعث گسترش طیف عملکرد و اثر بخشی بیشتر آن ها می گردد. در این پژوهش اثر سینرژیسمی آنتی بیوتیک های اریترومایسین، جنتامایسین و سفکسیم با پیوسین تولیدی بر روی باکتری های هدف مشخص و ثابت گردید.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش و مقایسه آن با نتایج سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که پیوسین می تواند به عنوان یک داروی ضد میکروبی جدید بر علیه سویه های سودوموناس باشد که نسبت به اغلب دارو ها مقاوم شد ه اند. حضور ماده القاگر میتومایسین سی به تولید بیشتر پیوسین انجامید، بنابراین در پژوهش هایی که در جهت تولید پیوسین انجام می گیرند بهتر است از یک عامل محرک جهت وادار نمودن باکتری به تولید پیوسین بیشتر استفاده گردد.

مؤثر بودن پیوسین به ویژه بر باکتری های اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس که هر دو از عوامل بسیار شایع عفونت های بیمارستانی می باشند قابل توجه بوده و نشان می دهد که پیوسین نه تنها می تواند به عنوان مکمل و یا جایگزین مناسبی

www.SID.ir

Archive of SID

برای آنتی بیوتیک های بکار رفته بر علیه باکتری سودوموناس آئروجینوزا باشد بلکه در خصوص دیگر باکتری های بیماری زا نیز عملکرد مناسبی داشته و می تواند قابلیت مبارزه با دیگر عوامل عفونی را نیز داشته باشد.

سپاسگزاری

در خاتمه لازم می دانم از بخش آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات فارس که در به ثمر رساندن این پژوهش نهایت همکاری را به عمل آوردند صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

۱ .عبدی عالی ا، سادات نیک بین و، فیض آبادی م، غروی س، فلاحی ز. مطالعه پروفیل پلاسمیدی و مقاومت آنتی بیوتیکی در سودوموناس آئروجینوزای بیمارستانی. مجله زیست شناسی ایران،۱۳۸۴؛۱۸، ۲: ۹-۱۴۱.

۲ .مهاجری پ، تعیین حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های سودوموناس آئروژینوزای جدا شده از نمونه های مختلف بالینی در بیماران مراجعه کننده به مراکز آموزشی درمانی شهر کرمانشاه(۸۱-۱۳۸۰). فصلنامه علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، ۱۳۸۲; سال هفتم، شماره چهارم: ۸-۱۲۱.

3. AraujoRomão CMCP, Faria YN, Pereira LR, Asensi MD. Susceptibility of clinical isolates of multi resistant *Pseudomonas aeruginosa* to a hospital disinfectant and molecular typing.*MemInstOswaldo Cruz,* 2005;100(5):541-548.

4. Bayat E, Kamali M, Zare'eiMahmoodabadi A, Mortazavi Y, EbrahimHabibi A, Amini B, et al.Isolation, determination and cloning of translocation domain of exotoxin A from Pseudomonas aeruginosa. Kowsar Med J, 2010;15(3):149-54.

5. Blackwell C, Winstanley F, Brunton T. Sensitivity of thermophilic Campylobacters to Rtypepyocines of Pseudomonas aeruginosa. *Journal of Medical Microbiology*, 1982;15(2):247-251.

6. Brooks G.F, Bautel J, Morse S. Jawetz, Melnick. Adelberg's Medical Microbiology, 23rd ed, USA, McGraw- Hill Medical, 2004;262-5.

7. Chuanchuen R, Narasaki CT, SchweizerHP. TheMexJK efflux pump of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of Triclosan. *JBacteriol,* 2002;184:5036-5044.

8. Fyfe J. A, Harris G, Govan J.R. Revised pyocin typing method for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin Microbiol, 1984;20**:**47–50.

9. Govan JR. Studies on the Pyocins of Pseudomonas aeruginosa: Production of Contractile and Flexuous Pyocins in Pseudomonas aeruginosa. *Journal of General Microbiology*, 1974;80:17-30.

10. Higerd T.B, Barchler C.A, BerkS. *In vitro* and *in vivo* characterization of pyocin. J. Bacteriol, 1967;93:1976–1986.

11. Iijima M. Mode of action of pyocin R1. J. Biochem (Tokyo), 1978;83:395–402.

12. Ito S, Kageyama M , Egami F. Isolation and charactenzation of pyocins from several strains of Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Appl. Microbiol, 1970; 16:205-214.

13. Iwalokun B.A, Akinsinde K.A, LanlenhinoO, Onubgogu C.C. Bacteriocinogenicity and production of pyocins from pseudomonas species isolated in Lagos,Nigeria,African. journal Biotechnology, 2006;5(11):1072-1077.

14.Jacob F.Biosyntheseinduite et mode d'actiond'unepyocine, antibiotique de Pseudomonas Pyocyanea. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1952;86:149-160.

www.SID.ir

Archive of SID

15. Kageyama M. Bacteriocins and bacteriophages in *PseudomonasAeruginosa* InT. Mitsuhashi, Hashimoto H (ed.). Microbial drug resistance. University of Tokyo Press, Tokyo, Japan, 1975; 291–305.

16. Kageyama M. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. J. Biochem, 1964;55:49–53.

17. Kageyama M, Egam F**.** purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. Life Sci, 1962;9:471–476.

18. Kageyama M, Ikeda K, Egami F**.** Studies of a pyocin. III. Biological properties of the pyocin. J. Biochem, 1964; 55:59–64.

19. Kageyama M, Shlinomiya T, Aihara Y, Kobayalhi M. Characterization of a bacteriophage related to R-type pyocins. J. Virol, 1979;32:951-957.

20. Kuroda K, Kageyama M. Comparative study of F-type pyocins of Pseudomonas aeruginosa. *The Journal of Biochemistry*, 1981;89:1721-1736.

21. Lois F.J, Pinto B.V, Evan T.T, Farmer J,J. Simplified method for producing pyocin from Pseudomonas aeruginosa. Applied microbiology, 1973;120-121.

22. Lycsak JB, Cannon CL, Pier GB. Establishment of *Pseudomonas eruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microb Infect*, 2000;2(9):1051-1060.

23.Matsui H, Sano Y, Ishibara H, Shinomiya T. Regulation of pyocingenes in *Pseudomonas aeruginosa* by positive (Prt N) and negative(Prt R) regulatory genes. J. Bacteriol, 1993;175:1257–1263.

24. Michel-Briand Y, Baysse C**.**The pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*.Biochimie, 2002;84:499–510.

25.Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning. Second Edition .Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989;47-58.

26. Strauch E, Kaspar H, Schaudinn C, Dersch P, Madela K, Gewinner C, Hertwig S, Wecke J.O, Appel B. Characterization of enterocoliticin, a phage tail-like bacteriocin, and its effect on pathogenic *Yersinia enterocolitica* strains. Appl. Environ. Microbiol, 2001;**67:**5634–5642.

27. Tagg J.R, Mushin R. Pyocin sensitivity testing as a means of typing pseudomona aeroginosa. J.MED.Microbiol, 1973;6:129-137.

28. Uratani Y, Hoshino T**.** Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa*and depolarizes membrane potential. J. Bacteriol, 1984;157**:**632–636.

29. Zavascki AP, Cruz RP, GoldaniLZ. Risk factors for imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: a comparative analysis of two case-control studies in hospitalized patients. *J Hosp Infect,* 2005;59:96-100.

www.SID.ir