Archive of SID

مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۷، شماره ۱۰، دی ۱۳۹۹ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

جداسازی مولکولی ژن *Lux* سراشیا مارسنس جدا شده از منابع بالینی و تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان آن با روش *Real-time PCR*

زهرا روزبهانی: کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه بیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران

بهروز شجاعی سعدی: استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، اراک، ایران (*نویسنده مسئول) behrozsh@yahoo.com

کیومرث امینی: دانشیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران

چکیده

زمینه و هدف: *سراشیا (Serratia)* باکتری گرم منفی و متحرکی است که از عفونت‌های ریوی-ادراری و خون می‌باشد. از خصوصیت پیگمان زایی *سراشیا مارسنس* به عنوان مارکر ذرات غبار در محیط و در بیمارستان استفاده می‌شود. ژن *Lux* در اغلب باکتری ها نقش اساسی در پدیده پیام رسانی و در تنظیم بیان ژن نقش کلیدی دارد. این پژوهش جداسازی مولکولی ژن *Luxs* *سراشیا مارسنس* جدا شده از منابع بالینی و تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر بیان آن با روش Real-time PCR می باشد.

روش کار: از بین ۱۰۰ نمونه از منابع بالینی بیماران بستری دارای عفونت ادراری در بیمارستان‌های مختلف اراک جداسازی و به صورت استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شد. پس از تایید باکتری توسط تست‌های اختصاصی و جداسازی ایزوله‌های واجد ژن *lux* استخراج DNA صورت گرفت. تاثیر پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* در غلظت های مختلف برای هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. در همه مراحل از یک باکتری *سراشیا مارسنس* به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها: از تعداد ۱۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۲ باکتری *سراشیا مارسنس* به دست آمد. ۱۲ جدایه *سراشیا مارسنس* جداسازی شده همگی (۱۰۰٪) واجد ژن بیوفیلم *Lux* هستند. میزان Fold Change برای ژن *LUXI* برابر ۱/۰۹- بیانگر آنست که این ژن در گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است.

نتیجه‌گیری: تشکیل بیوفیلم، باکتری‌ها را از فاگوسیت‌ها و مولکول‌های سمی حفاظت می‌کند. باکتری‌های حامل ژن lux مولد بیوفیلم در *سراشیا مارسنس*، تحمل بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها رادارد. با استفاده از پروبیوتیک‌ها و کاهش بیان ژن‌های دخیل در ایجاد بیوفیلم، می توان در درمان شاهد موفقیت های بیشتری استفاده کرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

کلیدواژه‌ها

سراشیا مارسنس،

ژن *lux*،

RealTimePCR،

لاکتوباسیلوس رامنوسوس

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۰۱

تاریخ چاپ: ۹۹/۱۰/۰۳

شیوه استناد به این مقاله:

Rouzbahani Z, Shojaee Asadi B, Amini K. Molecular segregation of the Lux gene by *Serratia marsensis* separated from clinical sources and the effect of *Lactobacillus Ramenusus* probiotic supernatant on its expression by Real-time PCR method. Razi J Med Sci. 2020;27(10):24-35.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

www.SID.ir

Archive of SID

Razi Journal of Medical Sciences. 2020;27(10):24-35. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

Molecular segregation of the Lux gene by *Serratia marsensis* separated from clinical sources and the effect of *Lactobacillus Ramenusus* probiotic supernatant on its expression by Real-time PCR method

Zahra Rouzbahani: MA of Microbiology, Department of Biology, Sciences Faculty, Islamic Azad University, Arak, Iran
Behrouz Shojaee Asadi: Assistant Professor, Department of Microbiology, Sciences Faculty, Islamic Azad University, Arak, Iran (* Corresponding author) behrozsh@yahoo.com
Kiomars Amini: Associate Professor, Department of Microbiology, Sciences Faculty, Islamic Azad University, Saveh, Iran

Abstract

Background & Aims: Serratia marcescens is a well-known species of Ceratia, a gram-negative, motile bacterium that is of great clinical importance and grows well in the laboratory. This bacterium is found in natural environments including soil, climate, on the surface of parts of plants and also as an opportunistic pathogen in humans. Sarachiae have small capsules and their colonies are white-pink or red pigment. These bacteria can be isolated from pulmonary-urinary tract and bloodstream infections. Cultivating them smells like fish or urine. Serratia marcescens is a well-known species that is of great clinical importance (1). Biofilm formation is formed by intercellular interactions between bacteria that form the Quorum sensing system. Chromium sensing system is a concentration-dependent process that exists in both gram-positive and gram-negative bacteria. In this system, bacteria communicate with each other through small molecules called self-inducing molecules. When the bacterial density in the environment reaches a certain level, the concentration of these transport molecules reaches a certain level and induce large changes in the level of gene expression. The Qs chromosensing system is governed by the homologs SWrR, SwrI, LuxR, and LuxI, respectively, and affects the expression of at least 28 proteins (3). Probiotics are known as dietary supplements containing live microbes that produce beneficial effects on the host body through the balance of intestinal microflora. The beneficial effects of probiotics through intestinal microflora are known. Probiotics are living microorganisms that will have beneficial health effects on the host in sufficient quantities and include species of Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus, Enterococcus and Streptococcus (4). The genus Lactobacillus are the most abundant microorganisms that can act as probiotics in the human body. This group of bacteria improves and enhances the function of the immune system, and probiotics, including Lactobacillus, increase the body's resistance to infections and cancers. Consumption of these bacteria increases the function of macrophages and the secretion of various substances, including immunoglobulins (5). The present study was performed to investigate the antimicrobial and anti-binding effects of probiotic Lactobacillus on Serachia marsens and possibly to introduce this bacterium as an inhibitor in the prevention and treatment of urinary tract infections.
Methods: This is a descriptive cross-sectional study that was conducted in 1997. Among 100 clinical sources, patients with urinary tract infections hospitalized in different hospitals of Arak were isolated and sterilized and transferred to the

Keywords
Seracia marsensis,
lux gene,
Real-time PCR,
Lactobacillus rhamnosus

Received: 22/09/2020
Published: 23/12/2020

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

microbiology laboratory. Skim milk agar and biochemical tests were used to isolate and identify microorganisms with proteolytic activity. Using specific primers, Serachia marsense was identified, and the ability to produce the specific pigment Geocin, which is specific to this species, was investigated. Based on macro and microscopic morphology and growth in specific environments, Serachia marcens isolate was obtained. The isolated strains were then stored in TSA media at 4 ° C and glycerinated TSB at -20 ° C until the experiment (7).

Results: From 100 samples collected and studied, 12 bacteria of Ceracia martens were obtained. The results showed more biofilm in the strains carrying the lux gene, so the QS luxS gene could affect the initial biofilm formation by the mutant strain. In the present study, by examining the presence of lux gene in patients with clinical infections, its effect on pathogenicity was investigated. Lactobacillus rhamnosus was 1.09 times less than the untreated group, so the results of this study can be attributed to a wider range of probiotic performance, with a review of a wider range of probiotic strains By examining them further, we can identify the power of the effect of different strains of them.

Conclusion: According to the results of the present study, lactobacilli have an inhibitory role against many bacteria and the solution can be used in concentrated form, in which case, by increasing the effective compounds in the environment, possibly antibacterial activity. will increase. Methods such as chromatography can also be used to identify effective compounds secreted by these bacteria so that, if possible, by purifying and concentrating them, an effective biological solution to the application of chemicals and increasing resistance can be obtained. It provided a drug in bacteria, especially pathogenic strains.

Biofilm formation protects bacteria, including phagocytes and toxic molecules. Biofilm-producing lux gene carriers, such as Ceracia martensis, are more tolerant of antibiotics, which is an obstacle to their treatment. Probiotic bacteria have the ability to accumulate cells with complex pathogenic microbes. With their anti-binding effects, they prevent pathogenic bacteria from reaching and attaching to the target cell in their host. Therefore, the present study was performed to investigate the antimicrobial and anti-binding effects of probiotic Lactobacillus on the uropathogenic bacterium Ceracia martensis and possibly to introduce these bacteria in the prevention and treatment of urinary tract infections. According to the results of the present study, by using probiotics and reducing the expression of genes involved in biofilm formation, we can see more success in the treatment process and use less common antibiotics.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Rouzbahani Z, Shojaee Asadi B, Amini K. Molecular segregation of the Lux gene by *Serratia marsensis* separated from clinical sources and the effect of *Lactobacillus Ramenusus* probiotic supernatant on its expression by Real-time PCR method. Razi J Med Sci. 2020;27(10):24-35.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

مقدمه

سراشیا مارسسنس (Serratia marcescens) از گونه‌های معروف سراشیا است و باکتری گرم منفی و متحرکی که از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است و به خوبی در محیط های آزمایشگاهی پرورش می‌یابد. این باکتری در محیط‌های طبیعی شامل خاک آب و هوا، در سطح بخشهایی از گیاهان و نیز به عنوان یک پاتوژن فرصت‌طلب در انسان یافت می‌شود. *سراشیاها* دارای کپسول کوچکی بوده و کلنی‌های آن دارای رنگدانه سفید-صورتی یا قرمز می‌باشند. ین باکتری را می‌توان از عفونت‌های ریوی-ادراری و خون جدا کرد. کشت آنها بوی ماهی یا ادرار می‌دهد. *سراشیا مارسسنس (Serratia marcescens)* از گونه‌های معروف که از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است (۱).

در پیام رسانی مولکول به سلول یک سری مولکول های کوچک پیام رسان به نام خود القا کننده تولید و ترشح می‌شوند. ژن *Lux* در اغلب باکتری های گرم مثبت و گرم منفی وجود داردکه نقش اساسی در پدیده پیام رسانی و تجمعی سلولی دارد این وظیفه با کد کردن پروتئین خود القا کننده ای AI۲ انجام می شود. پروتئین خود القا کننده در تنظیم بیان ژن های عامل تولید آنتی بیوتیک، فرآیند ومینی سنس، تشکیل بیوفیلم، رقابت ژنتیکی، اسپورزایی، حرکت لغزشی و فاکتورهای حدت در باکتری های مختلف نقش کلیدی دارد (۲). به طور کلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به علت چهار ویژگی اصلی این باکتری ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن ها است (۲).

تشکیل بیوفیلم به وسیله تعاملات بین سلولی بین باکتری ها که سیستم Quorum sensing شکل می‌گیرد. سیستم کروم سنسینگ، فرآیند وابسته به غلظت است که هم در باکتری های گرم مثبت و هم در باکتری های گرم منفی وجود دارد. در این سیستم، باکتری ها با واسطه مولکول های کوچکی به نام مولکول های خودالقاگر با هم ارتباط برقرار می کنند. زمانی که تراکم باکتریایی در محیط به حد خاصی می‌رسد، غلظت این مولکول های انتقال دهنده به حد خاصی رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا می‌کنند. سیستم کروم سنسینگ Qs به ترتیب توسط هموگ‌های *SWrR*، *SwrI*، *LuxR*، *LuxI* اداره می‌شود و بیان حداقل ۲۸ پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳).

پروبیوتیک ها را به عنوان مکمل غذایی حاوی میکروب های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده اثرات مفید در بدن میزبان ایجاد می نماید اثرات مفید پروبیوتیکها از طریق میکروفلور روده شناخته شده است. پروبیوتیکها میکروارگانیسم های زنده ای هستند که در مقادیر کافی اثرات مفید سلامتی بر روی میزبان خواهند داشت و شامل گونه هایی از جنس باکتریهای *لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، باسیلوس، انتروکوک واستریتوکوکوس* می باشند (۴).

جنس *لاکتوباسیلوس* بیشترین میکروارگانیسم هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک در بدن انسان قادر به فعالیت هستند. این گروه از باکتری ها باعث بهبود و افزایش عملکرد سیستم ایمنی شده و پروبیوتیک ها از جمله لاکتوباسیلوسها باعث افزایش مقاومت بدن در برابر عفونت ها و سرطان ها می باشند. مصرف این باکتری ها موجب افزایش عملکرد ماکروفاژها و ترشح مواد متعدد از جمله ایمنوگلوبولین ها می شود (۵). پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار ضد میکروبی و ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی بر باکتری *سراشیا مارسنس* و احتمالا معرفی این باکتری به عنوان مهار کننده در پیشگیری و درمان عفونت های ادراری انجام گرفت.

لاکتوباسیلوس رامنوسوس یکی از این گونه ها است که دارای سویه های مختلفی با ویژگی های سلولی متفاوتی است. از نظر وابستگی ژنی، این باکتری به گونه *لاکتوباسیلوس کازیی* وابسته بوده و سویه های آن دارای قدرت تخمیر ناهمگونی هستند (۶). هدف از این پژوهش جداسازی مولکولی ژن *Luxs سراشیا مارسنس* جدا شده از منابع بالینی و تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* بر بیان آن با روش Real-time PCR می باشد.

روش کار

نمونه برداری: این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی است که درسال ۹۷ انجام شد. از بین ۱۰۰ نمونه از

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

منابع بالینی بیماران بستری دارای عفونت ادراری در بیمارستان‌های مختلف اراک جداسازی و به صورت استریل به آزمایشگاه میکروب شناسی منتقل شد.

کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری: به منظور جداسازی و شناسایی اولیه میکروارگانیسم های دارای فعالیت پروتئولیتیک از محیط کشت Skim milk agar و آزمون های بیوشیمیایی استفاده شد. باکتری *سراشیامارسنس* از طریق تست های بیوشیمیایی و روش‌های میکروب شناسی شامل رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز و استفاده از محیط های افتراقی مانند MRVP SIM،TSI ، سیمون سیترات، فینل آلانین آگار و اوره و نیز تست‌های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها، طبق جدول تشخیص میکروب شناسی انجام شد. با استفاده از پرایمر های اختصاصی گونه *سراشیا مارسنس* شناسایی گردید، همچنین توانایی تولید رنگدانه *پرودی جیوسین* که اختصاصی این گونه است در آن ها بررسی شد. بر اساس مورفولوژی ماکرو و میکروسکوپی و رشد در محیط های اختصاصی بررسی شده جدایه *سراشیا مارسنس* به دست آمد (جدول ۱). سپس سویه های جداسازی شده در محیط های کشت TSA در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و نیز TSB گلیسیرین دار در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (۷).

مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت: پس از تایید *سراشیا مارسنس* استخراج DNA با استفاده از کیت مرکز ذخایر ژنتیکی طبق پروتکل کیت انجام گرفت. جهت استخراج سویه های جمع آوری شده، از کیت استخراج DNA ژنومی باکتری‌های گرم منفی شرکت (GTP) پیشگامان انتقال ژن به شماره LOT:808288 استفاده شد.

ارزیابی کمی وکیفی DNA: غلظت DNA در نمونه‌های استخراج شده با استفاده از روش فلورومتر با مارک Quamus ساخت کشور آلمان بررسی شد. زمان اندازه گیری سریع در کمتر از ۵ ثانیه، قابلیت اندازه گیری مقادیر بسیار کم DNA و تعیین غلظت های بالاتر بدون نیاز به رقیق سازی صور گرفت.

آماده سازی پرایمرها: پس از مراجعه به سایت زیر و مطالعه و جستجو در مقالات مختلف پرایمرهای مناسب برای ژن *lux* انتخاب شدند. پرایمر ها در سایت (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) مقایسه و بلاست شدند و به شرکت سیناژن سفارش داده شدند. پرایمرها توسط آب مقطر دیونیزه به غلظت ۱۰۰ پیکومول و سپس به غلظت مناسب که ۱۰ پیکومول بود، رسانده شد. در جدول ۲ توالی پرایمر و طول قطعه تکثیری آورده شده است. طبق مطالعات انجام شده، ۲ جفت پرایمر مناسب انتخاب و جهت تهیه به شرکت Bioneer سفارش داده شد.

مقادیر مواد اولیه *PCR* برای هر واکنش شامل ۱۰ میکرولیتر *PCR Master Mix 2x (Amplicon)*، ۱ میکرولیتر از هرکدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از *DNA* الگو و ۴

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *سراشیا مارسنس*

تولید اندول منفی	حرکت در ۳۶ °C	تخمیر نوربیتول +
متیل رد MR –	هیدرولیز ژلاتین در ۲۲ °C	تخمیر آرابینوز –
VP+	تخمیر لاکتوز –	تخمیر گزیلوز –
مصرف سیترات +	تخمیر ساکارز+	رشد در ۳۷ °C
سولفید هیدروژن–	تخمیر مانیتول +	لیزین دکربوکسیلاز +
هیدرولیز اوره –	تخمیر سوربیتول +	اورنیتین دکربوکسیلاز +
اندول –	SH2 –	تخمیر مالتوز –

جدول ۲- پرایمرهای ژن *(lux)* مورد مطالعه در این تحقیق (۵)

پرایمر	توالی ۵' →۳'	اندازه پرایمر(*bp*)
luxI F	GAATTCCGCTGGGAATACAATTAC	۹۹
luxI R	GGATCCTTTATACTCCTCCGATGGAATTGCC	

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

جدول ۳- برنامه تنظیم درجه حرارت و زمان برای انجام مراحل *PCR*

مرحله	دما (درجه سیلسیوس)	زمان (ثانیه)	تعداد سیکل
واسرشت اولیه	۹۵	۳۰۰	-
واسرشت	۹۵	۳۰	-
اتصال	۵۵	۴۰	-
بازآرایی (گسترش)	۷۲	۶۰	۳۵
بازآرایی نهایی	۷۲	۶۰۰	-

میکرولیتر آب مقطر بود. مراحل دمایی واکنش *PCR* بدین شکل انجام شد که ابتدا مرحله دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ چرخه شامل دناتوراسیون ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمر در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد *lux* به مدت ۳۰ ثانیه و مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و پس از ۳۵ چرخه مرحله تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام پذیرفت (جدول ۳).

بعد از PCR جهت شناسایی *سراشیا مارسنس* (*Serratia marcescens*) از محصول PCR جهت توالی یابی استفاده گردید.

تهیه استوک سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس: از ۱۰ گرم *سوپرناتانت پروبیوتیک* بر روی ترازوی دیجیتال مقدار لازمه توزین گردید. در یک لیتر محیط کشت استریل به صورت سوسپانسیون در آورده شد و برای پراکنده شدن مناسب آن ها از دستگاه التراسونیک (Bandelin Sonorex RK 31 H) به مدت زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد. در شرایط استریل طی چندین مرحله با حلال DMSO و محیط مولر هینتون براث رقیق شدند تا به غلظت مورد نظر برسند. در انتها غلظت نهایی استوک *سوپرناتانت پروبیوتیک* بعد از اضافه شدن به درون چاهک ها، نصف گردید. جهت جلوگیری از عدم بروز خطا همزمان با اجرای آزمایشات میکروبی سوسپانسیون *سوپرناتانت پروبیوتیک* تهیه شدند (۸).

استخراج RNA: برای این منظور از RNA کلی برای واکنش های تکثیر پرایمر استفاده شد. برای استخراج RNAاز میکروکیت RNeasy شرکت Qiagen استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (باکتری های واجد ژن *lux* بودند و با تعیین MIC آن ها در حضور *لاکتوکوکوس رامنوسوس*) که در فاز لگاریتمی رشد قرار دارند مورد استفاده قرار گرفت. برای حذف DNA ژنومی از کیت DNase Qiagen استفاده شد (۹).

ارزیابی کمی RNA استخراج شده: برای بررسی کمی RNAاستخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد. در این روش ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده در دستگاه نانو دراپ قرار داده شد و جذب طول موج های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر و نسبت بین این دو طول موج و همچنین نسبت ۲۳۰/۲۶۰ هم بررسی شد (۱۰).

سنتز cDNA: سنتز cDNA با استفاده از آنزیم Reverse AMVبا غلظت lμ/unit ۲۵ شرکت Roche انجام شد. بدین ترتیب RNA استخراج شده برای مدت ۳ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس نسخه برداری معکوس (RT) در در دمای ۴۲ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه با ۲ میکرولیتر Random Primer، ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم AMV Reverse Transcriptase، ۲ میکرولیتر از dNTP 10 میلی مولار، ۱ میکرولیتر Rnase inhibitor و ۲ میکرولیتر بافر ۱۰ xآنزیم AMV انجام شد. سپس آنزیم AMV در دمای ۹۹ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه و غیرفعال شد (۱۰).

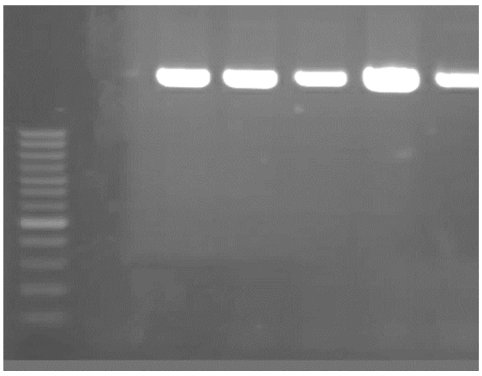
یافته‌ها

نتایج آزمایشات بیوشیمیایی جهت جداسازی: نمونه برداری از ۱۰۰ نمونه های بالینی بیمارستان‌های اراک جمع آوری شد و گونه سراشیا جداسازی گردید. معیار تایید هویت *سویه سراشیا مارسنس* ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری ها بود. پس از تشخیص، نمونه‌هایی که خصوصیات بیوشیمیایی آن‌ها با ویژگی‌های سراشیا منطبق بود به عنوان نمونه مثبت درج گردید و کلنی‌های مربوط ذخیره شدند. از تعداد

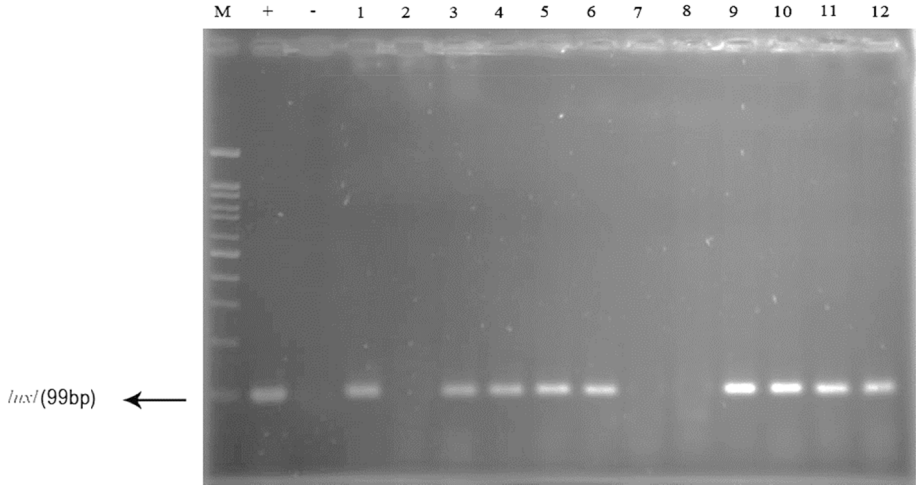
www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021



شکل ۱- تایید استخراج DNA



شکل ۲- نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه‌های lux مثبت
نمونه ۱ تا ۱۲، به ترتیب از چپ به راست:DNA Ladder، + کنترل مثبت، - کنترل

۱۰۰ نمونه جمع آوری شده و مورد بررسی ۱۲ باکتری *سراشیا مارسنس* به دست آمد.

نتایج تایید استخراج DNA: بعد از شناسایی سویه *سراشیا مارسنس* استخراج DNA توسط کیت صورت گرفت (شکل ۱) و از طریق الکتروفورز کوتاه تأیید شد.

نتایج آزمون PCR: واکنش PCR بر روی ایزوله های *سراشیا مارسنس* برای شناسایی ژن کدکننده *lux* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. همچنین سویه *سراشیا مارسنس* تولید کننده ژن های مورد نظر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن lux: همان طور که نشان داده شده است(شکل۲) و بر اساس آزمایش PCR جهت شناسایی ژن *lux* مشخص گردید.

همانطور که در تصویر(شکل۳) مشخص است از تعداد ۱۲ ایزوله *سراشیا مارسنس* جداسازی شده ۹ سویه (۷۵٪) واجد ژن حدت *Lux I* هستند.

نتایج مربوط به آزمون Real time PCR در شکل‌های ۳ و ۴ و ۵ آمده است.

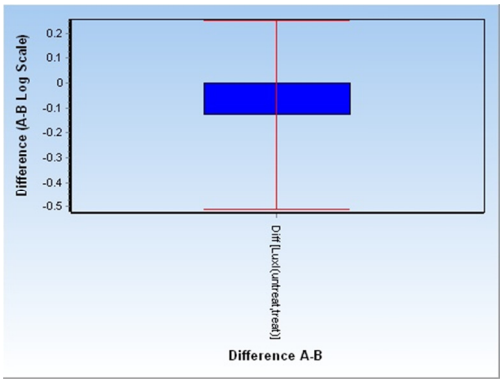
جدول ۴ بیانگر نتیجه T-test برای داده های مورد بررسی می باشد. در ستون p-value سطح معنی داری برای هر ژن مشخص شده است. در جدول فوق میزان P-value برای ژن *luxi* از میزان ۰/۰۵ بیشتر می باشد که بیانگر بی معنا بودن اختلاف بیان این دو ژن در بین دو گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* و تیمار نشده می باشد. سطح معنی داری ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی داری اصلاح شده و تعیین معنی داری نتایج استفاده گردید.

ردیف Difference (A-B log scale) بیانگر میزان ddct برای ژن ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می باشد. ردیف Fold change نیز بیانگر

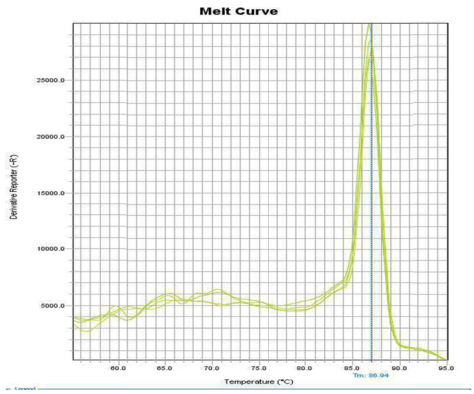
www.SID.ir

Archive of SID

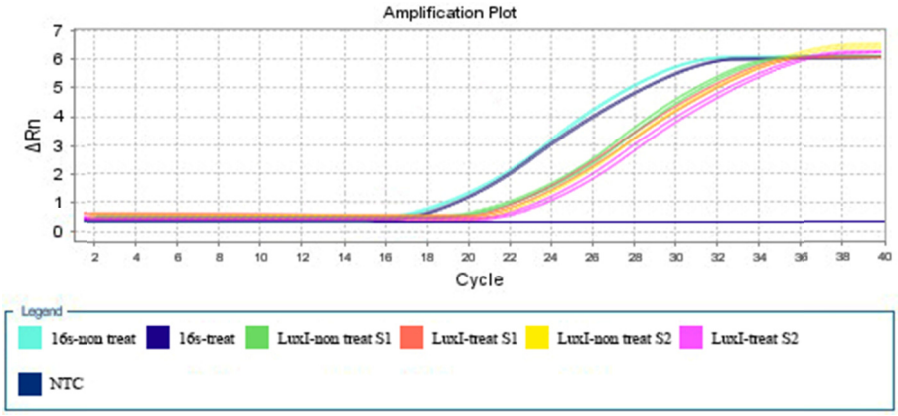
Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021



شکل ۳- نمودار تغییرات Fold change



شکل ٤- منحنی ذوب بدست آمده



شکل ٥- نتایج منحنی تکثیر Real Time PC

جدول ٤- جدول T-test

	LUXI (untreated)	LUXI (treat)	Diff [LUXI (untreated, treat)
Sample1	۲/۹۲	۳/۰۲	-۰/۱
Sample 2	۳/۷۵	۳/۹۱	-۰/۱۶
Count	۲	۲	۲
Mean	۳/۳۳۵	۳/۴۶۵	-۰/۱۳
STDEV	۰/۵۸۶۹	۰/۶۲۹۳	۰/۰۴۲۴
P-value			۰/۱۴۴
Confidence interval (CI)			٪۹۵
Difference (A-B log scale)			-۰/۱۳
Fold change			-۱/۰۹

میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده با*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* میباشد. میزان Fold Change (شکل ۳) برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است. ردیف Count بیانگر تعداد نمونه مورد بررسی می باشد.ردیف Mean بیانگر میانگین در دو نمونه است. ردیف df STDEV (standard deviation) بیانگر انحراف معیار از میانگین می باشد. یکی از شاخص‌های پراکندگی است که نشان می‌دهد به طور میانگین داده‌ها چه مقدار از مقدار متوسط فاصله دارند. ردیف Confidence Level بیانگر ضریب اطمینان آماری می باشد که با ضریب اطمینان ۹۵٪ محاسبه شده است.

بحث

باکتری‌های حامل ژن مولد بیوفیلم تحمل بیشتری

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند. تشکیل بیوفیلم، باکتری‌ها را از حمله فاگوسیت‌ها و مولکول‌های سمی محافظت می‌کند. تشکیل بیوفیلم در *سراشیا مارسنس* حامل ژن *lux*، منجر به مقاومت بالاتر به آنتی بیوتیک ها می‌شود. به کارگیری ترکیبات ضد میکروبی جدید که منجر به حذف بیوفیلم و همچنین کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی گردند، از اهمیت بالایی برخوردار است. نانوذرات در مقایسه با داروهای شیمیایی مزایای متعددی دارد که از جمله آن ها می توان به نیمه عمر افزایش یافته و کاهش میزان سمی بودن نسبت به داروها اشاره کرد (۱۱).

لاکتوباسیلوس ها دسته ای از باکتری ها هستند که به طور معمول به عنوان مایه در تهیه ماست *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس و اسیدوفیلوس*، شیرهای تخمیری (*لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*) و دیگر غذاهای تخمیری استفاده می شوند و نقش مهار کننده بر روی برخی از پاتوژن ها دارند. تاکنون نقش های متعددی از این باکتری ها شناسایی شده است که برخی از اثرات سودمند آن ها عبارتند از بهبود و حفظ سلامتی مجاری گوارش، افزایش قدرت سیستم ایمنی، تولید و افزایش میزان دسترسی به مواد مغذی مورد نیاز بدن به صورت طبیعی، کاهش علایم مربوط به عدم تحمل لاکتوز و کاهش شیوع بیماری های آلرژیک در بین افراد حساس، پیشگیری یا مقابله با سرطان، تولید طعم های مختلف مثل استالدئید در ماست و پنیر و دیگر متابولیت‌ها در محصول های تخمیری، افزایش ارزش غذایی مثل کاهش اسیدهای آمینه آزاد یا تولید ویتامین ها در محصول تخمیر شده به ویژه تولید ترکیب هایی که فعالیت های ضد باکتریایی دارد از جمله آن ها است (۱).

مشرقی و همکاران، استفاده از ژن های کد کننده آنزیم لوسیفرز بنام *lux* از باکتری دریایی *Vibrio fischeri* و ژن *lux* از کرم شب تاب Photinus pyralis می باشد. این ژن ها از این جهت انتخاب شده اند که رابطه ای بین شدت نور تولید شده و فعالیت متابولیسمی سلول وجود دارد بنابراین بیولومینسانس یک معیار بسیار خوبی برای سلامت سلول می باشد. ژن هایی که بیولومینسانس را کد می کنند از طریق روش های مهندسی ژنتیک به طیف وسیعی از میکرو ارگانیزم های یوکاریوتیک و پروکاریوتیک معرفی گردیده است. اگر چه بیوسنسورهای میکروبی پروکاریوتیک دارایا مزایای مختلفی می باشند ولی نمی توانند معیار مناسبی در زمینه تاثیر مواد شیمیایی بر سیستم های شیمیایی شبیه به انسان داشته باشند. بنابراین در این تحقیق سعی شده است تا با معرفی بیوسنسور میکروبی یوکاریوتیک مانند مخمر *ساکارومیسس سرویزیه*، طراحی و ساخت آن مورد بررسی قرار گرفته و کارایی آن در سنجش سمیت مواد آلوده محیطی با دیگر بیوسنسورها مقایسه گردید (۱۲, ۱۳). در حالیکه در این تحقیق میزان Fold change برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است.

در مطالعه کاظمی و همکاران باکتری *نایسریا منتژیتیدیس* از سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت باکتری و استخراج DNA واکنش Nested PCR به عمل آمد. محصول PCR (bp۵۰۷) در کنار مارکر bp۱۰۰ برروی ژل آگارز الکتروفورز شد. محصول PCR درون پلاسمید کلون گردید و پلاسمید نوترکیب توسط آنزیم های sac1 و Bam H1 تایید گردید. توالی نوکلئوتیدی ان شبیه ژن luxS باکتری *نایسریا منتژیتیدیس* سویه Z2491 می باشد. ژن هایی که بیولومینسانس را کد می کنند از طریق روش های مهندسی ژنتیک به طیف وسیعی از میکروارگانیزم های یوکاریوتیک و پروکاریوتیک معرفی گردیده است (۱۴). در حالیکه در این تحقیق میزان Fold Change برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است.

سلطان دلال و همکاران، در این بررسی تجربی باکتری *اسینتوباکتر* از ۱۰۰ بیماران بستری در بیمارستان میلاد، مسیح دانشوری و مفید شهر تهران جدا و مقاومت آنتی بیوتیکی آن به مراه دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس روتری* بررسی شد. دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلانتاروم و لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط غیر فعال دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری *اسینتوباکتر بومانی* نبودند،

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

ولی در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیب هایی نظیر آب اکسیژنه و اسید را داشته و یا تحت چنین شرایطی قرار گیرد می تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد و همچنین دو لاکتوباسیلوس فوق تقریبا نسبت به آنتی بیوتیک های معمول مقاوم بودند. در تحقیق حاضر اثر ضد میکروبی *لاکتوباسیلوس کازئی* بر بیان ژن اینتگرون مشهود بود (۲، ۱۵). در حالیکه در این تحقیق میزان Fold Change برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است.

ارشادیان و همکاران ، لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی با روش های استاندارد از نمونه های لبنی سنتی جداسازی و خالص سازی شدند. از ۱۰ جدایه *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی، ۲ جدایه که بیشترین توان پروبیوتیکی را داشتند، انتخاب شدند و ویژگی های فیلوژنی و مولکولی آن هابه کمک تکنیک rRNA 16s sequencing بررسی شد. اثر ضد میکروبی و ضد اتصالی باکتری های پروبیوتیک با استفاده از روش های Culture-Co ،Layer Double Modified و aggregation-Coمورد بررسی قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تجمع پذیری باکتری های پروبیوتیک با باکتری بیماری زا مشاهده شد. در این تحقیق لاکتوباسیلوس های پروبیوتیکی جدا شده از ماست سنتی شهرستان سبزوار و نیز باکتری های استاندارد بیشترین اثر ضد میکروبی در کشت و تجمع سلولی با باکتری های بیماریزای *سودوموناس آئروژینوزا، اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان دادند اثر مهار رشد باکتری های بیماریزا در حضور باکتری های پروبیوتیک با استفاده از روش کشت همزمان مشاهده شد. آزمایش های انجام شده نشان داد که باکتری های پروبیوتیکی در این تحقیق توانایی جلوگیری از رشد باکتری های بیماریزا را داشتند که شاید بتوان از آن بعنوان کاندیدای مناسب جهت کنترل بیماری استفاده کرد (۲). در حالیکه در این تحقیق میزان Fold Change برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با*لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است.

HeZ و همکاران ، هدف از این مطالعه بررسی اثر ژن *luxS* QSبر روی تشکیل اولیه بیوفیلم توسط *استرپتوکوک موتانس* است. خصوصیات سطحی سلول‌های باکتریایی، از جمله هیدروفوبیت سلولی (پیوستگی باکتریایی به هیدروکربن ها) و تجمع، که برای پایبندی اولیه برای توسعه بیوفیلم مهم هستند، مورد بررسی قرار گرفت. آزمون چسبندگی بیوفیلم با روش MTT مورد بررسی قرار گرفت. ساختارهای بیوفیلم با استفاده از میکروسکوپ اسکن لیزر کانکوکال مشاهده شد و بیانات ژنی مربوط به QS با استفاده از Real-time PCR بررسی گردید. یافته ها، بیوفیلم بیشتر در سویه های حامل ژن *lux* را نشان داد بنابر این ژن *luxS* QS می تواند تشکیل اولیه بیوفیلم توسط سویه موتان را تحت تاثیر قرار دهد. در تحقیق حاضر با بررسی حضور ژن lux در بیماران مبتلا به عفونت های بالینی به میزان تاثیر آن در بیماریزایی پرداخته شد (۱۶).

Lin Xu و همکاران، ژن lux ، یک سیستم QS در استافیلوکوک ها را بررسی کردند که تأثیر قابل توجهی بر توسعه بیوفیلم و بیماری زایی دارد. سویه جهش یافته حامل ژن lux ، بیوفیلم را در شرایط آزمایشگاهی افزایش داده و در یک مدل موش صحرایی عفونت ناشی از بیوفیلم افزایش یافته گزارش شد. تولید بیوفیلم توسط lux، موجب جهش و احتمالا عامل اصلی تنوع فنوتیپ در باکتری ها است (۱۷). در حالیکه در این تحقیق میزان Fold Change برای ژن LUXI برابر ۱/۰۹- که بیانگر این است که این ژن در گروه تیمار شده با *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* نسبت به گروه غیر تیمار شده ۱/۰۹ برابر کاهش یافته است. بنابراین نتایج حاصل از این مطالعه را به طیف گسترده تری از عملکرد پروبیوتیک ها میتوان نسبت داد، با بررسی بر روی گستره وسیع تری از سویه های پروبیوتیک انجام گیرد. تا ضمن بررسی بیشتر آن ها، بتوان قدرت تاثیر سویه های مختلف از آن ها را مورد شناسایی قرار داد.

نتیجه‌گیری

نتیجه آنکه با توجه به نتایج مطالعه حاضر لاکتوباسیل ها علیه بسیاری از باکتری ها نقش مهار کنندگی دارند و می توان محلول را به صورت تغلیظ

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

شده نیز مورد استفاده قرار داد که در این صورت با افزایش ترکیب های مؤثر در محیط، احتمالا فعالیت ضد باکتریای نیز افزایش خواهد یافت. همچنین می توان از روش هایی مثل کروماتوگرافی نیز برای شناسایی ترکیب های مؤثر مترشحه از این دسته از باکتری ها استفاده نمود تا در صورت امکان با خالص سازی و تغلیظ آن ها، بتوان راه حل زیست شناختی مؤثری نسبت به کاربرد مواد شیمیایی و بروز افزایش مقاومت دارویی در باکتری ها به ویژه سویه های پاتوژن ارایه داد.

تشکیل بیوفیلم ، باکتری‌ها را از جمله فاگوسیت‌ها و مولکول‌های سمی حفاظت می‌کند. باکتری‌های حامل ژن *lux* مولد بیوفیلم مانند *سراشیا مارسنس*، تحمل بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها دارند که این مقاومت آنتی بیوتیکی مانعی برای درمان آن ها می‌باشد. باکتری های پروبیوتیک با توانایی تجمع سلولی با میکروب های بیماری زا مجتمع می شوند و با آثار ضد اتصالی خود مانع از رسیدن و اتصال باکتری های پاتوژن به سلول هدف در میزبان شان می شوند. بنابراین، پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار ضد میکروبی و ضد اتصالی *لاکتوباسیلوس های* پروبیوتیکی بر باکتری یوروپاتوژنیک *سراشیا مارسنس* و احتمالا معرفی این باکتری ها در پیشگیری و درمان عفونت های ادراری انجام گرفت. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، با استفاده از پروبیوتیک ها و کاهش بیان ژن های دخیل در ایجاد بیوفیلم، می توان در فرآیند درمان شاهد موفقیت های بیشتری بوده و از آنتی بیوتیک های رایج به میزان کمتری استفاده کرد.

تقدیر و تشکر

پژوهش حاضر مطالعه‌ای در زمینه میکروبیولوژی است که از پایان نامه کارشناسی ارشد ۹۸۰۰۷۶۱۳۸۴۲۶۵۸ اقتباس شده است. بدینوسیله از آزمایشگاه میکروبی پاسارگاد و بویژه از کارشناس ارشد میکروب شناسی، آقای مهندس مجید صادق پور و کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

References

1. Asadi Tehrani G, Mirza Ahmadi S, Bandehpour M, Laloui F, Kazemi B, Eidi A, et al. Molecular cloning of luxA and luxB genes of Vibrio fischeri bacteria. J Anim Environ. 2011;3(2):426-39. (Persian)
2. Ershadian M, Arbab Soleimani N, Ajoudani Far H, Vaezi Kakhki MR. Antimicrobial effect and cellular accumulation of probiotic lactobacilli with some pathogenic bacteria. Iran J Med Microbiol. 2015;9(3):14-22.
3. Rajput A, Kaur K, Kumar M. SigMol: repertoire of quorum sensing signaling molecules in prokaryotes. Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D634-D9.
4. Gupta C, Garg AP, Prakash D, Goyal S, Gupta S. Microbes as potential source of biocolours. Pharmacologyonline. 2011;2:1309-18.
5. Xu L, Li H, Vuong C, Vadyvaloo V, Wang J, Yao Y, et al. Role of the luxS quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of Staphylococcus epidermidis. Infect Immun. 2006;74(1):488-96.
6. Saha S, Thavasi R, Jayalakshmi S. Phenazine pigments from Pseudomonas aeruginosa and their application as antibacterial agent and food colourants. Res J Microbiol. 2008;3(3):122-8.
7. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G .Textbook of diagnostic microbiology-e-book: Elsevier Health Sciences; 2018.
8. Joshi V, Attri D. Solid state fermentation of apple pomace for the production of value added products. 2006.
9. Abdo OM. Gaber H. Alsayed Ahmed M. Alzohairy Rania. BM Amer Mohammed M. Saleh. Appl Math Model. 2013;37(8):5962-78.
10. Takano H, Obitsu S, Beppu T, Ueda K. Light-induced carotenogenesis in Streptomyces coelicolor A3 (2): identification of an extracytoplasmic function sigma factor that directs photodependent transcription of the carotenoid biosynthesis gene cluster. J Bacteriol. 2005;187(5):1825-32.
11. Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. Curr Opin Microbiol. 1999;2(6):582-7.
12. Mostofi S, Mashreqi M, Bahraini M, Oroujalian F, Pardali P. Pseudomnas syringae and Ralostonia solanacearum gene pooling of luxAB reporter gene in Iranian native plant pathogenic bacteria. J Anim Environ. 2011;25(4):426-34. (Persian)
13. Mashreqi M, Bahreini M, Velayati S. Survey of Biosafety 4th National Conference on Biotechnology of the Islamic Republic of Iran, 2005-08-15.
14. Mahmoudi E. Extinguishing the sensory limit of bacteria by plant extracts and its effect on Pectobacterium carotovorum bacterial disease. Bioll Control Phytother. 2010;5(1):59-70.
15 Sultan Dalal MM, Khesht Zarrin H, Tajabadi

www.SID.ir

Archive of SID

M, Ebrahimi A, Davoodabadi MM, Hakimian A, et al. Separation and biochemical identification of lactic acid bacteria with probiotic potential in local yogurts of Yazd province. Dawn Yazd Health. 2016;14(6):171-83.

16. He Z, Liang J, Tang Z, Ma R, Peng H, Huang Z .Role of the luxS gene in initial biofilm formation by Streptococcus mutans. J Mol Microbiol Biotech. 2015;25(1):60-8.

17. Joyner J, Wanless D, Sinigalliano CD, Lipp EK. Use of quantitative real-time PCR for direct detection of Serratia marcescens in marine and other aquatic environments. Appl Environ Microbiol. 2014;80(5):1679-83.

Downloaded from rjms.iums.ac.ir at 1:36 IRDT on Monday July 19th 2021

www.SID.ir