

اثر سرم گاو بزرگسال و سرم جنین گاو روی تولید پایوسیانین در سودوموناس آئروجینوزا

آیلین مؤیدی

کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، دانشکده علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی
aylinmoayedi@yahoo.com

چکیده

پایوسیانین، رنگدانه ای سبز- آبی است که توسط سویه های سودوموناس آئروجینوزا تولید می شود. در تنظیم بیوسنتز پایوسیانین، سیستم کروم سنسینگ دخالت می کند. سرم محیط پیچیده ای است که می تواند روی بیان ژن های کروم سنسینگ و ژن های تحت کنترل کروم سنسینگ اثر گذارد. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر سرم گاو بزرگسال و سرم جنین گاو روی تولید پایوسیانین طراحی گردید. نمونه های خاک و زخم از نظر وجود سودوموناس آئروجینوزا مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از SDS-PAGE وجود پروتئین های اختصاصی تولید کننده پایوسیانین بررسی شد. ایزوله های بالینی و محیطی سودوموناس آئروجینوزا به محیط های حاوی غلظت های مختلف سرم گاو بزرگسال، سرم جنین گاو و نیز به محیط فاقد سرم تلقیح شدند. اضافه نمودن سرم گاو بزرگسال به محیط کشت سودوموناس آئروجینوزا، تولید پایوسیانین را نسبت به شاهد کاهش داد ولی تولید آن در محیط حاوی سرم جنین گاو افزایش یافت. از آن جایی که سرم گاو بزرگسال حاوی مهارکننده های مختلف می باشد، استفاده از سرم جنین گاو در محیط کشت سودوموناس آئروجینوزا روی افزایش تولید پایوسیانین مؤثر است.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروجینوزا، پایوسیانین، سرم گاو

مقدمه

سودوموناس آئروچینوزا، باکتری فرصت طلب گرم منفی و پاتوژنی برای حیوانات، جانوران، نماتودها و گیاهان می باشد. این باکتری، در عفونت بیمارستانی انسان نقش دارد و اغلب در بیماران دارای سوختگی های شدید، جراحی و بیمارانی با سیستم ایمنی ضعیف مشاهده می شود (Jander et al, 2000). پاتوفیزیولوژی پیچیده عفونت های سودوموناس آئروچینوزا به دلیل توانایی آن در تولید مجموعه بزرگی از عوامل بیماری زا شامل پروتئازها، رامنولپیدها و پایوسیانین می باشد (Frank, 1997). پایوسیانین رنگدانه ای سبز- آبی و عضوی از خانواده بزرگ ترکیبات سه حلقه ای و نیتروژن دار فنازین ها است (Price-Whelan et al, 2006). فنازین ها، شامل فنازین-۱- کربوکسیلیک اسید (PCA)، ۱- هیدروکسی فنازین، فنازین-۱- کربوکسامید و پایوسیانین، متابولیت های ثانویه با فعالیت اکسایش- کاهش می باشند (Budzikiewicz, 1993). پایوسیانین مشتقی از PCA است که در اواخر مرحله رشد نمای بیان می شود و خاصیت رنگ های سبز- آبی به محیط کشت سودوموناس آئروچینوزا و خلط بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس می دهد (Lau et al, 2004). مسیر بیوسنتز پایوسیانین شامل دو اپران هفت ژنی (*phzA1-G1* و *phzA2-G2*) و دو ژن دیگر (*phzS* و *phzM*)، که آنزیم های اختصاصی برای تبدیل PCA به پایوسیانین را کد می کنند، می باشد. PhzM پروتئینی شبیه به متیل ترانسفرازهای باکتریایی با ۳۳۴ آمینواسید و وزن مولکولی ۳۶/۴ کیلودالتون کد می کند در حالی که PhzS پروتئینی شبیه به مونواکسیژنازهای باکتریایی با ۴۰۲ آمینواسید و وزن مولکولی ۴۳/۶ کیلودالتون کد می کند (Mavrodi et al, 2001).

فعالیت زیستی پایوسیانین در نتیجه توانایی آن در ایجاد چرخه اکسایش- کاهش در حضور عوامل کاهنده مختلف و مولکول اکسیژن است که منجر به تجمع گونه های فعال اکسیژن، از جمله سوپراکسید و هیدروژن پراکسید و در نهایت آسیب اکسیداتیو به سلول و یا مرگ سلول می شود (Muller, 2002). فنازین هایی که توسط گونه های سودوموناس تولید می شوند، فعالیت آنتی بیوتیکی با طیف وسیع علیه باکتری ها، قارچ ها و سلول های یوکاریوتی دارند. صدها ترکیب فنازینی مختلف با فعالیت های ضد توموری، ضد مالاریایی و آنتی سبتیکی شناسایی شده اند (Laursen and Nielsen, 2004). نشان داده شده که تولید پایوسیانین توسط سودوموناس آئروچینوزا باعث کاهش علائم بیماری در گیاهان و کشتن نماتود *Caenorhabditis elegans* و مگس میوه *Drosophila melangaster* می شود (Rahme et al, 2000). به علاوه، Anjaiah و همکاران، گزارش دادند ایزوله هایی از سودوموناس آئروچینوزا، که از ریزوسفر گیاه فلفل جدا شده بودند، پایوسیانینی تولید می کردند که منجر به القای واکنش مقاومت سیستمیک اکتسابی و ایجاد مقاومت لوبیا علیه *Botrytis* (پاتوژن برگ) می شد (Anjaiah et al, 1998). Kerr و همکاران نیز فعالیت ضد قارچی و ضد مخمری پایوسیانین را توضیح دادند و بیان نمودند پایوسیانین اثر آنتاگونیستی شدیدی علیه *Candida albicans* و *Aspergillus fumigatus* دارد و در جلوگیری از کاندیدیازیس دستگاه تنفسی در بیمارانی که سودوموناس آئروچینوزا در آن ها استقرار دارد، نقش دارد (Kerr et al, 1999). به علاوه، این ترکیب به علت توانایی در انتقال الکترون، در سلول های سوختی میکروبی مورد استفاده قرار می گیرد (Rabaey and Verstraete, 2005). Ohfujii و همکاران از پایوسیانین در سیستم حسگر گلوکز استفاده نمودند (Ohfujii et al, 2004). مطالعات اخیر نیز نشان داده اند که پایوسیانین اثر سیتوتوکسیک روی رده سلول های سرطانی دارد (Zhao et al, 2014; Hassani et al, 2012).

در تنظیم بیوسنتز پایوسیانین و دیگر متابولیت های ثانویه، سیستم کروم سنسینگ (QS) عمل می کند. در شبکه QS، LasR-LasI و RhlR-RhlI اغلب در سازش ارگانسیم نسبت به محیط های مختلف نقش دارند. LasI، سنتز N-۳- اکسودوکنویل)-L - هوموسرین لاکتون (3O-C₁₂-HSL) را هدایت می کند، در حالی که RhlI، سنتز N-(بوتانویل)-L - هوموسرین لاکتون (C₄-HSL) را هدایت می کند، LasR و RhlR نیز پروتئین های تنظیم کننده رونویسی هستند

(Whiteley et al, 1999). سرم، محیط پیچیده ای شامل پروتئین ها و فاکتورهایی می باشد که ممکن است به طور مثبت یا منفی، بیان ژن های QS و ژن های تحت کنترل QS را تنظیم کنند. گزارش شده، سودوموناس آئروجینوزا می تواند از فاکتورهای سرم جهت تقویت بیماری زایی، از طریق افزایش تولید عوامل بیماری زایی که تحت کنترل QS هستند، استفاده کند (Kruczek et al, 2014).

با توجه به کاربرد پایوسیانین در صنعت و پزشکی، شناخت عواملی که منجر به تولید بیشتر آن می شوند دارای اهمیت است. لذا این مطالعه با هدف بررسی اثر سرم گاو بزرگسال (ABS) و سرم جنین گاو (FBS) روی تولید پایوسیانین طراحی گردید.

روش تحقیق

جمع آوری نمونه های بالینی

۱۱ سویه سودوموناس آئروجینوزا، که ۱۰ سویه از زخم و یک سویه از عفونت ادراری بیماران مبتلا به سوختگی به دست آمده بودند، از آزمایشگاه بیمارستان سوانح و سوختگی شهید مطهری تهران تهیه گردید. با استفاده از تست های بیوشیمیایی، سویه ها به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی و جهت بررسی تولید پایوسیانین روی محیط ستریمید آگار (Merck، آلمان) کشت داده شدند. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، سویه ای که بیشترین میزان پایوسیانین را بر اساس شدت رنگ آن تولید کرده بود، جهت مطالعات بعدی انتخاب گردید.

جمع آوری نمونه های محیطی

۱۰ نمونه خاک از عمق ۵ تا ۱۰ سانتی متری خاک باغ شاتوت، ریزوسفر گیاه فلفل آپارتمانی، خاک اطراف مزرعه سبزیجات، ریزوسفر سبزیجات، خاک باغچه (حاوی هوموس)، خاک آلوده به بنزین در پمپ بنزین قدیمی، خاک آلوده به نفت در انبار نفت تهران، خاک آلوده به نفت در پالایشگاه نفت تهران و خاک آلوده به فرآورده های نفتی در انبار نفت تهران (۲ نمونه)، از مناطقی که کمترین خطر آلودگی بیمارستانی را داشتند، تهیه و به ترتیب S₁ تا S₁₀ نام گذاری شدند. به منظور جداسازی سودوموناس آئروجینوزا، ابتدا از روش رقیق سازی و پورپلیت در محیط ستریمید آگار استفاده شد. همچنین میزان یک تا دو لوپ از هر رقت به صورت سطحی روی محیط ستریمید آگار کشت داده شد. پلیت ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در روش دیگر (روش غنی سازی) به تعداد نمونه ها، ارلن های حاوی ۱۰ میلی لیتر محیط کشت نوترینت برات (Merck، آلمان) استریل شده آماده گردید و یک گرم خاک در هر یک ریخته شد. پس از ورتکس، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس در انکوباتور شیکردار با دور ۲۳۰ rpm نگهداری شدند. سپس، میزان یک تا دو لوپ از هر نمونه به صورت سطحی روی محیط ستریمید آگار کشت داده شد و پلیت ها به مدت ۲۴ الی ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از آن، سودوموناس آئروجینوزا با استفاده از تست های بیوشیمیایی شناسایی شد.

منحنی رشد

به منظور رسم منحنی رشد برای دو سویه انتخاب شده (E₈ و C₁₁)، معادل ۰/۵ مک فارلند از باکتری در محیط کشت BHI برات (Merck، آلمان) تلقیح شد و از لحظه تلقیح باکتری تا ۴ روز جذب نوری هر یک در طول موج ۶۰۰ نانومتر (OD₆₀₀) هر دو ساعت یک بار با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد (محیط کشت BHI برات استریل به عنوان بلانک استفاده شد). در طول مدت بررسی، محیط حاوی باکتری در انکوباتور شیکردار با دور ۲۳۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد.

بررسی پروتئین های اختصاصی در تولید پایوسیانین با استفاده از SDS-PAGE

به منظور الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید (SDS-PAGE)، ۱/۵ میلی لیتر از کشت ۴۸ ساعته ایزوله های سودوموناس آئروجینوزا در محیط BHI برات، به مدت ۵ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. محلول رویی دور

ریخته و رسوب با تریس ۳۰۰ میلی مولار (pH 8) شسته شد. پس از سانتریفیوژ، به رسوب سلولی ۱۰۰ میکرولیتر بافر لیز اضافه و محلول یک شبانه روز در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. سپس، سانتریفیوژ صورت گرفت و فاز رویی جدا و نگهداری شد. به نسبت ۱:۴ به آن بافر نمونه اضافه شد و در آب در حال جوش قرار گرفت. پروتئین تام باکتریایی روی ژل ۱۵ درصد سدیم دودسیل سولفات- پلی آکریل آمید الکتروفورز شد تا وجود پروتئین های PhzM و PhzS بررسی شود.

تولید پایوسیانین

جهت افزایش تولید پایوسیانین، سودوموناس آئروجینوزایی که به مدت ۲۴ ساعت روی محیط ستریمید آگار رشد کرده بود، روی محیط گلیسرول- آلانین آگار (برای ۱ لیتر: گلیسرول ۱۰ میلی لیتر، L- آلانین ۶ گرم، $MgSO_4$ ۲ گرم، K_2HPO_4 ۰/۱ گرم، $FeSO_4$ ۰/۱۸ گرم، آگار- آگار ۲۰ گرم) کشت داده شد و ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد.

تولید پایوسیانین C₁₁ در حضور ABS با کمپلمان فعال

خون سه گاو بزرگسال (بالتر از ۱۲ ماه) و آماده کشتار در آذر ماه سال ۱۳۹۳، پس از تأیید سلامت آن ها، از کشتارگاهی در تهران جمع آوری شد. در صورت ایجاد لخته، با کمک اپلیکاتور استریل عمل دفیبرینه کردن صورت گرفت و سپس نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شدند. سرم از لخته جدا و در فالكون های استریل ریخته شد و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردید. سرم قبل از استفاده از فیلترهایی با قطر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. در گروه اول، سرم به صورت ۵ درصد حجمی- حجمی و در گروه دوم، سرم به صورت ۱۰ درصد حجمی- حجمی به محیط گلیسرول- آلانین برات اضافه شد. برای هر سرم و هر رقت یک محیط در نظر گرفته شد و یک محیط نیز، که محیط فاقد سرم بود، به عنوان شاهد تولید پایوسیانین مورد استفاده قرار گرفت. سپس، از کشت ۲۴ ساعته سودوموناس آئروجینوزا C₁₁ در محیط گلیسرول- آلانین آگار، معادل ۰/۵ مک فارلند سوسپانسیون میکروبی تهیه گردید و به هر محیط به میزان ۱ میلی لیتر از آن اضافه شد. محیط ها به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور با دور ۲۱۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۷۲ ساعت، غلظت پایوسیانین با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

تولید پایوسیانین C₁₁ و E₈ در حضور ABS با کمپلمان غیرفعال

سرم ها به مدت ۶۰ دقیقه در بن ماری ۶۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا کمپلمان آن ها غیرفعال شود و قبل از استفاده از فیلترهایی با قطر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شدند. سپس، با رقت های ۲، ۵ و ۱۰ درصد حجمی- حجمی به محیط گلیسرول- آلانین برات اضافه شدند. برای هر سرم و هر رقت، دو محیط در نظر گرفته شده بود که در یکی معادل ۰/۵ مک فارلند از سویه بالینی و در دیگری معادل ۰/۵ مک فارلند از سویه محیطی به میزان ۱ میلی لیتر تلقیح شد. برای هر سویه نیز یک شاهد که شامل محیط فاقد سرم بود در نظر گرفته شد. محیط ها به مدت ۴ روز در شیکر انکوباتور با دور ۲۱۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند و تغییرات آن ها هر ۲۴ ساعت یک بار، بررسی شد. در روز سوم و چهارم، غلظت پایوسیانین با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد.

تولید پایوسیانین C₁₁ و E₈ در حضور FBS

سرم جنین گاو (Biosera، انگلستان) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. کمپلمان سرم قبلا با استفاده از بن ماری ۵۶ درجه سلسیوس در مدت ۳۰ دقیقه غیرفعال شده بود. FBS، با رقت های ۲، ۵ و ۱۰ درصد حجمی- حجمی به محیط گلیسرول- آلانین برات اضافه شد. برای هر رقت، دو محیط در نظر گرفته شد که در یکی معادل ۰/۵ مک فارلند از سویه بالینی و در دیگری معادل ۰/۵ مک فارلند از سویه محیطی به میزان ۱ میلی لیتر تلقیح شد. این آزمایش جهت ثابت نگه داشتن شرایط و گروه های شاهد، هم زمان و با مراحل آزمایش تولید پایوسیانین C₁₁ و E₈ در حضور ABS غیرفعال، صورت گرفت.

استخراج، شناسایی و اندازه گیری غلظت پایوسیانین

پس از زمان کشت، محتویات هر محیط به فالكون های ۵۰ میلی لیتری انتقال یافت و به مدت ۱۵ دقیقه در ۴۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت پس از عبور از فیلترهای ۰/۴۵ میکرومتری در فالكون های جدید جمع آوری شد و به میزان مساوی در سه فالكون توزیع گردید (جهت بررسی به صورت سه تایی). به سوپرناتانت ها، کلروفرم (Merck، آلمان) به نسبت ۲ به ۱ اضافه گردید و پس از چند ثانیه ورتکس، به مدت ۱ دقیقه سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ rpm انجام شد. بخش رویی دور ریخته شد و به بخش زیری ۲۰٪ حجم اولیه ی سوپرناتانت، HCl ۰/۱ نرمال اضافه گردید. پس از چند ثانیه ورتکس، سانتریفیوژ در ۳۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه صورت گرفت. مقداری از پیگمان، یک بار زمانی که محلول در کلروفرم بود و بار دیگر زمانی که به صورت محلول در اسید درآمد، در کووت دستگاه اسپکتروفتومتری UV-Visible ریخته شد و طیف جذبی آن در طول موج ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر بررسی شد.

پس از شناسایی پیگمان استخراج شده، به منظور اندازه گیری غلظت آن، ۱ میلی لیتر از محلول صورتی رنگ در کووت ریخته شد و جذب آن با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۲۰ نانومتر (OD₅₂₀) خوانده شد. میانگین اعداد به دست آمده، در ۱۷/۰۷۲ (molar extinction coefficient) ضرب شد که عدد حاصل نشان دهنده غلظت پایوسیانین بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر بود (Essar et al, 1990).

اندازه گیری آنتی بادی های ABS

جهت تهیه آنتی ژن های سودوموناس آئروجینوزا ابتدا به میزان ۳ OD₆₀₀ (۴/۵×۱۰^۹ سلول در میلی لیتر) سلول باکتری از کشت ۲۴ ساعته در سرم فیزیولوژی حل شد و سپس با استفاده از بن ماری ۸۵ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت کشته شدند. ۳۰ میکرولیتر از آنتی ژن های باکتریایی تهیه شده با ۱۰۰ میکرولیتر از سرم روی اسلاید شیشه ای با استفاده از اپلیکاتور مخلوط شد و آگلوتیناسیون بررسی شد. در صورت مثبت بودن تست، تیتراژ آنتی بادی های سرم با استفاده از روش آگلوتیناسیون لوله ای اندازه گیری شد.

تحلیل آماری داده ها

تمامی داده ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس و آزمون تی در نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته ها

ایزوله های بالینی

از ۱۰ سویه سودوموناس آئروجینوزا (C₁₀ - C₁) جدا شده از زخم بیماران مبتلا به سوختگی، تنها یک سویه (C₉) قادر به تولید پیگمان سبز رنگ روی محیط ستریمید آگار بود و دیگر سویه ها پیگمان هایی به رنگ زرد تولید کردند. سویه ای که از عفونت ادراری جدا شده بود (C₁₁) بیشترین میزان پایوسیانین را روی محیط ستریمید آگار تولید نمود.

ایزوله های محیطی

در روش پورپلیت، ۴ ایزوله از ۱۰ نمونه خاک بر روی محیط ستریمید آگار رشد کردند و زمانی که رقت های تهیه شده به صورت سطحی روی محیط ستریمید آگار کشت داده شدند، ۱۳ ایزوله رشد نمودند که هیچ یک روی محیط ستریمید آگار پیگمان سبز-آبی تولید نمی کردند. در روش غنی سازی، ۲۴ ایزوله بر روی محیط ستریمید آگار رشد نمودند. از ۲۴ ایزوله حاصل از این روش، ۱۰ ایزوله (E₁ تا E₁₀) به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شدند و ۱۴ ایزوله باقی مانده به دیگر گونه های سودوموناس یا دیگر جنس های باکتری های گرم منفی تعلق داشتند. از ۱۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا، ۶ ایزوله متعلق به نمونه های آلوده به هیدروکربن های نفتی و ۴ ایزوله متعلق به نمونه های خاک کشاورزی بودند. به علاوه، از این ۱۰

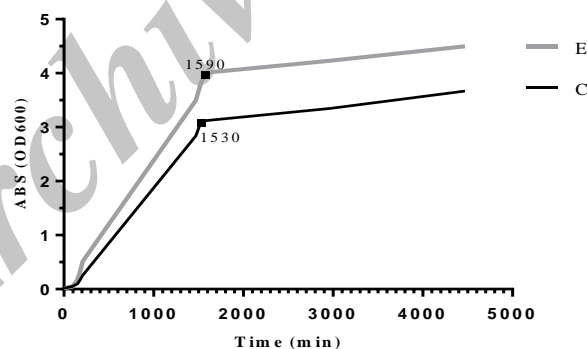
سویه، ۴ سویه پیگمان سبز و ۶ سویه پیگمان زرد و قرمز رنگ روی محیط ستریمید آگار تولید می نمودند. جدول ۱ نتایج حاصل از جداسازی سودوموناس از نمونه های خاک را نشان می دهد.

جدول ۱) تعداد سودوموناس های جدا شده از نمونه های خاک با استفاده روش غنی سازی

| نمونه | تعداد ایزوله | تعداد <i>P. aeruginosa</i> | تعداد <i>P. aeruginosa</i> تولید کننده پایوسیانین |
|-----------------|--------------|----------------------------|---|
| S ₁ | ۳ | ۱ | ۱ |
| S ₂ | ۳ | ۱ | ۰ |
| S ₃ | ۰ | ۰ | ۰ |
| S ₄ | ۳ | ۱ | ۰ |
| S ₅ | ۳ | ۱ | ۱ |
| S ₆ | ۱ | ۰ | ۰ |
| S ₇ | ۴ | ۳ | ۱ |
| S ₈ | ۴ | ۲ | ۱ |
| S ₉ | ۱ | ۰ | ۰ |
| S ₁₀ | ۲ | ۱ | ۰ |
| مجموع | ۲۴ | ۱۰ | ۴ |

رسم منحنی رشد سویه های E₈ و C₁₁

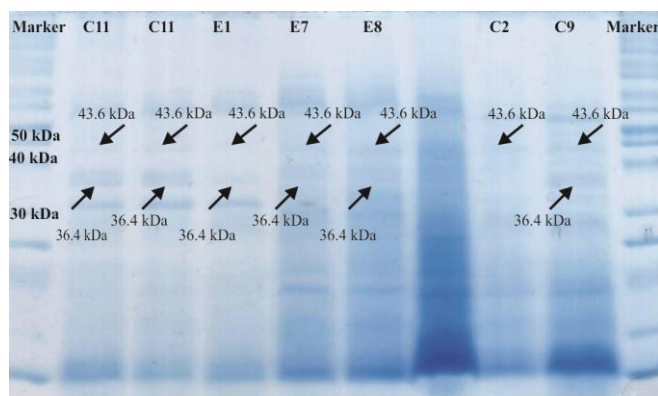
رشد هر دو سویه از یک ساعت پس از تلقیح به محیط آغاز شد و تا حدود ۲۴ ساعت به صورت نمایی ادامه پیدا کرد. با گذشت ۲۵/۵ ساعت از زمان تلقیح سویه C₁₁ و ۲۶/۵ ساعت از زمان تلقیح سویه E₈، رشد سویه ها وارد فاز سکون شد. نمودار ۱ منحنی رشد سویه های E₈ و C₁₁ را نشان می دهد.



نمودار ۱) منحنی رشد سویه های E₈ و C₁₁

شناسایی پروتئین های PhzS و PhzM

نمونه پروتئینی استخراج شده از سویه هایی که تولید پیگمان سبز رنگ می نمودند، حاوی باندهای ۳۶/۴ و ۴۳/۶ کیلودالتونی برای پروتئین های اختصاصی تولید کننده پایوسیانین PhzS و PhzM بودند. سویه ای که پیگمان زرد رنگ تولید می کرد (C₂) دارای باند ۴۳/۶ کیلودالتونی برای PhzS بود ولی از نظر باند ۳۶/۴ کیلودالتونی PhzM منفی بود. شکل ۱ باند پروتئین های PhzS و PhzM را نشان می دهد.



شکل ۱) باندهای پروتئین های PhzS و PhzM

تولید پایوسیانین

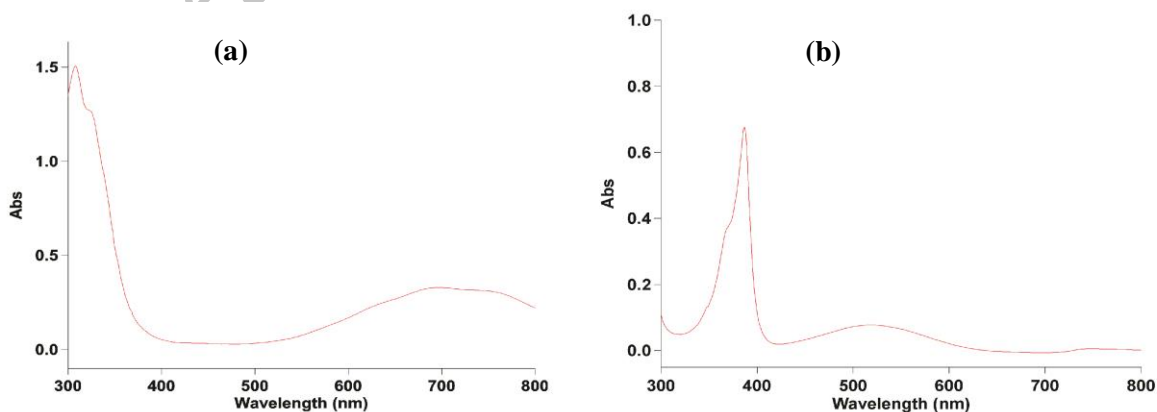
سودوموناس آئروجینوزا بیشترین میزان پایوسیانین را روی محیط گلیسرول-آلانین تولید نمود و محیط را به رنگ آبی تیره درآورد. شکل ۲ تولید پایوسیانین را در محیط گلیسرول-آلانین آگار نشان می دهند.



شکل ۲) a- کشت یک سویه از سودوموناس آئروجینوزا روی محیط ستریمید آگار، b- کشت همان سویه روی محیط گلیسرول-آلانین آگار

طیف جذبی پایوسیانین

پایوسیانین در کلروفرم، بیشترین جذب را در طول موج های ۳۰۸ و ۶۹۴ نانومتر، و در ۰/۱ HCl نرمال، بیشترین جذب را در طول موج های ۳۸۷ و ۵۱۸ نانومتر نشان داد. شکل ۳ طیف UV-Vis پایوسیانین را نشان می دهد.



شکل ۳) طیف UV-Vis پایوسیانین، a- در حلال کلروفرم، b- در حلال HCl ۰/۱ نرمال

اثر ABS با کمپلمان فعال روی تولید پایوسیانین C₁₁

وجود ۱۰ درصد ABS در محیط کشت سودوموناس آتروجینوزا، تولید پایوسیانین را به میزان قابل توجهی کاهش داد. در حضور ۵ درصد ABS تولید پایوسیانین صورت گرفت ولی میزان پایوسیانین تولید شده باز هم بسیار کمتر از میزان آن در محیط فاقد سرم گاو بود. همچنین سرم های متفاوتی که از گاوهای متفاوت تهیه شده بودند، اثرات نسبتاً یکسانی بر روی تولید پایوسیانین داشتند. جدول ۲ نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت پایوسیانین را نشان می دهد.

جدول ۲) آماره های توصیفی غلظت پایوسیانین در حضور ۵٪ و ۱۰٪ سرم های متفاوت گاو بزرگسال با کمپلمان فعال پس از ۷۲ ساعت

| گروه | شاهد | سرم ۱ | سرم ۲ | سرم ۳ |
|------|-------------|------------|------------|------------|
| ۵٪ | ۴۹/۱۷±۰/۱۲۰ | ۷/۴۸±۰/۰۹۹ | ۸/۰۰±۰/۰۶۴ | ۷/۶۴±۰/۰۲۱ |
| ۱۰٪ | ۴۸/۸۳±۰/۳۶۱ | ۱/۲۹±۰/۰۷۸ | ۱/۴۳±۰/۰۲۸ | ۱/۲۹±۰/۰۲۱ |

اثر ABS با کمپلمان غیرفعال و FBS روی تولید پایوسیانین C₁₁ و E₈

با غیرفعال نمودن کمپلمان ABS، تولید پایوسیانین بیشتر شد، با این حال تولید آن نسبت به شاهد کمتر بود. افزایش غلظت ABS غیرفعال منجر به کاهش غلظت پیگمان شد ولی این رویداد برای نمونه های حاوی FBS برعکس بود و افزایش غلظت FBS تولید پیگمان را تا حد زیادی نسبت به شاهد افزایش داد. جدول های ۳ و ۴ نتایج حاصل از اندازه گیری غلظت پایوسیانین سوپه های C₁₁ و E₈ را نشان می دهند.

جدول ۳) آماره های توصیفی غلظت پایوسیانین سوپه C₁₁ در حضور ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ حجمی - حجمی سرم های متفاوت با کمپلمان غیرفعال

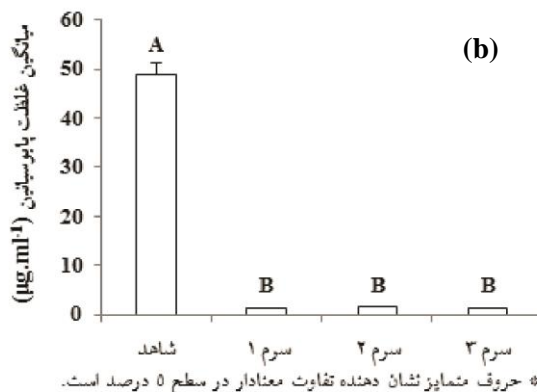
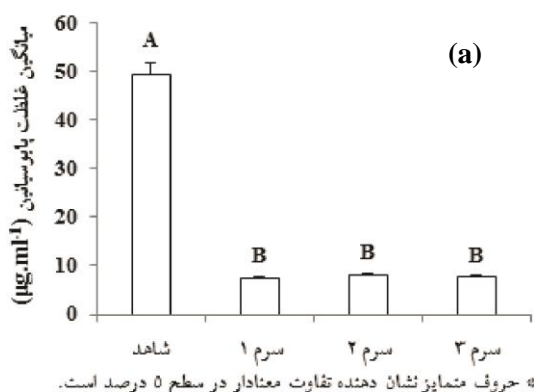
| زمان | گروه | شاهد | سرم ۱ | سرم ۲ | سرم ۳ | FBS |
|---------------|------|-------------|--------------|-------------|-------------|--------------|
| پس از ۹۶ ساعت | ۲٪ | ۵۵/۸۴±۰/۰۳۵ | ۲۷/۰۲±۰/۰۲۸ | ۳۵/۲۵±۰/۰۹۹ | ۳۸/۸۱±۰/۹۱۲ | ۶۰/۲۷±۱/۳۱۵ |
| پس از ۹۶ ساعت | ۵٪ | ۵۵/۶۷±۰/۲۶۹ | ۱۸/۴۰±۰/۰۶۴۳ | ۲۷/۱۳±۰/۲۹۶ | ۲۸/۹۸±۰/۵۰۲ | ۷۱/۲۹±۱/۷۳۲ |
| پس از ۷۲ ساعت | ۱۰٪ | ۲۷/۴۴±۰/۳۴۶ | ۳/۵۷±۰/۱۴۸ | ۵/۴۰±۰/۳۴۶ | ۴/۳۵±۰/۲۵۵ | ۸۷/۱۷±۰/۹۴۸ |
| پس از ۹۶ ساعت | ۱۰٪ | ۵۵/۲۸±۰/۸۲۷ | ۸/۵۰±۰/۳۶۸ | ۱۲/۸۸±۰/۵۹۴ | ۱۳/۵۲±۰/۳۳۹ | ۱۱۳/۲۱±۲/۵۸۱ |

جدول ۴) آماره های توصیفی غلظت پایوسیانین سوپه E₈ در حضور ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ حجمی - حجمی سرم های متفاوت با کمپلمان غیرفعال

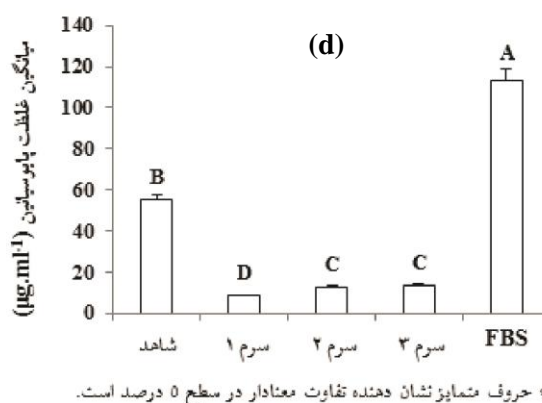
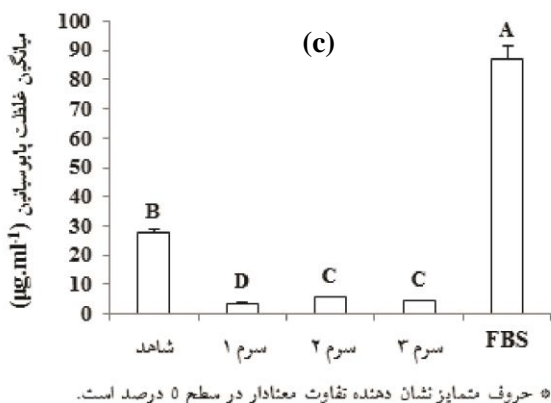
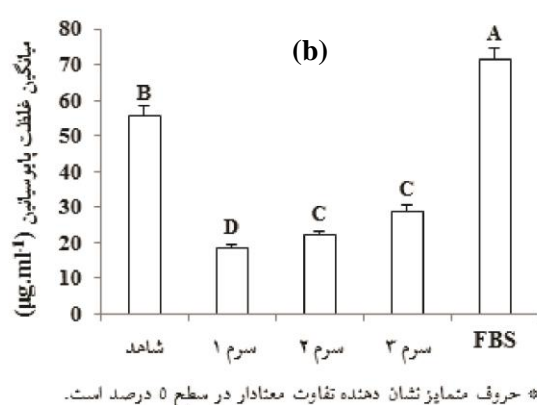
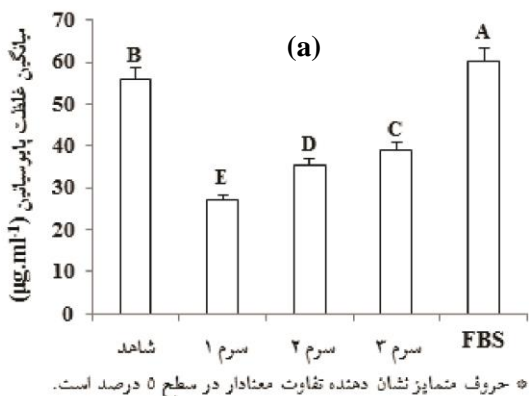
| زمان | گروه | شاهد | سرم ۱ | سرم ۲ | سرم ۳ | FBS |
|---------------|------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| پس از ۹۶ ساعت | ۲٪ | ۳۱/۲۴±۰/۵۸۰ | ۲۴/۲۵±۰/۵۳۰ | ۲۷/۹۷±۰/۴۸۸ | ۲۵/۷۴±۰/۵۶۶ | ۴۹/۴۲±۰/۴۷۴ |
| پس از ۹۶ ساعت | ۵٪ | ۳۱/۳۹±۰/۷۹۲ | ۱۵/۶۸±۰/۶۲۲ | ۱۹/۷۶±۰/۵۷۳ | ۱۷/۹۲±۰/۴۱۷ | ۶۴/۴۳±۱/۲۸۷ |
| پس از ۷۲ ساعت | ۱۰٪ | ۲۱/۰۹±۰/۸۹۱ | ۶/۶۵±۰/۳۸۹ | ۶/۵۹±۰/۳۸۹ | ۵/۴۱±۰/۲۳۳ | ۹۶/۷۶±۰/۸۲۰ |
| پس از ۹۶ ساعت | ۱۰٪ | ۳۰/۵۶±۰/۳۸۲ | ۸/۵۴±۰/۵۳۷ | ۱۲/۱۵±۱/۱۲۴ | ۱۱/۰۸±۰/۷۷۱ | ۱۲۶/۸۰±۲/۰۳۶ |

تحلیل آماری داده ها

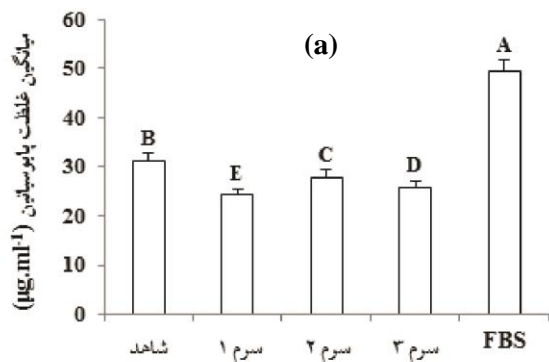
داده های آماری که با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند، در شکل های ۴ تا ۱۲ نشان داده شده اند.



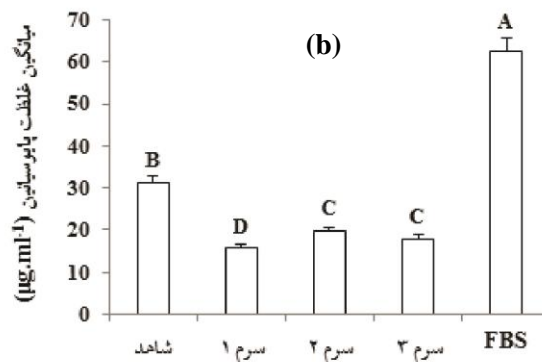
شکل ۴) a- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۵٪ ABS فعال پس از ۷۲ ساعت، b- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین در حضور ۱۰٪ ABS فعال پس از ۷۲ ساعت. غلظت پاپوسیپتین در هر دو گروه ۵٪ و ۱۰٪ ABS، در تیمار شاهد بالاترین میزان را داشته و با باقی تیمارها تفاوت معناداری دارد. اما غلظت پاپوسیپتین در سرم‌های ۱ و ۲ و ۳ تفاوت معناداری با هم ندارند و در رتبه دوم قرار دارند.



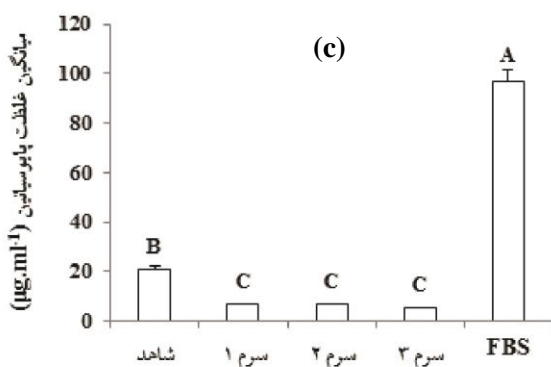
شکل ۵) a- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۲٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، b- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۵٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، c- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۷۲ ساعت، d- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت. غلظت پاپوسیپتین در تمامی گروه‌ها در تیمار FBS بالاترین میزان را داشته و در تیمار شاهد در رتبه دوم قرار دارد و با هم تفاوت معناداری دارند. همچنین غلظت پاپوسیپتین در سرم ۳ کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است.



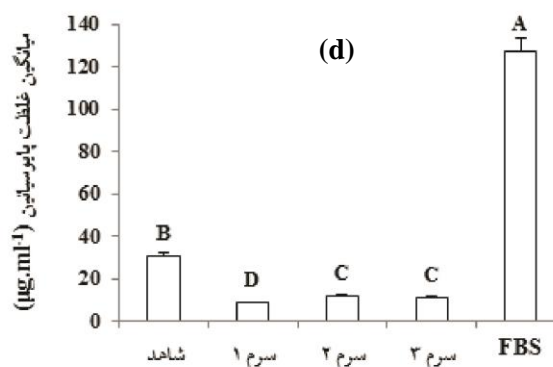
* حروف متمایز نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح 0 درصد است.



* حروف متمایز نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح 0 درصد است.

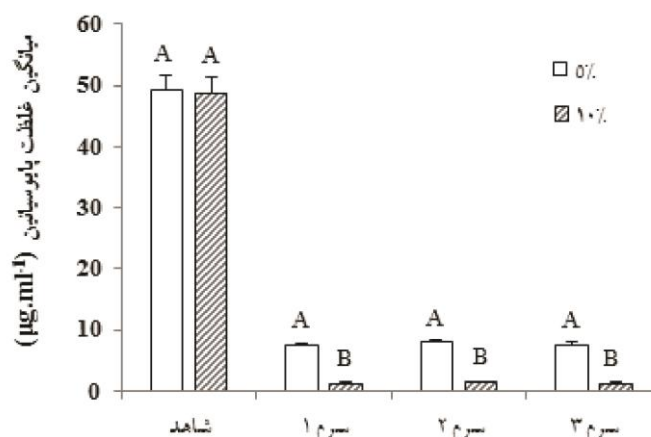


* حروف متمایز نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح 0 درصد است.



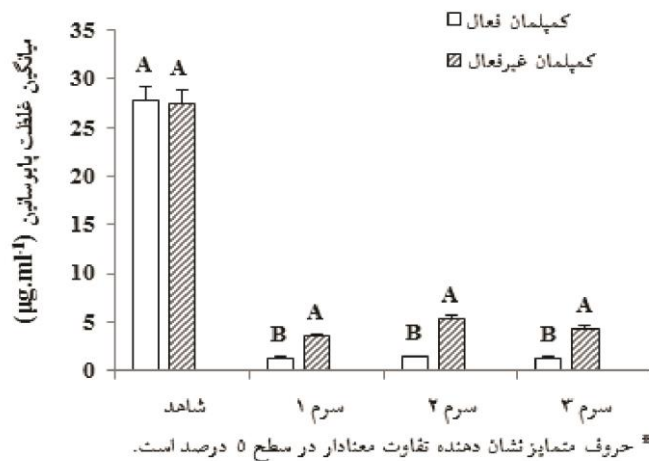
* حروف متمایز نشان دهنده تفاوت معنادار در سطح 0 درصد است.

شکل ۶) a- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین E₈ در حضور ۲٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، b- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین E₈ در حضور ۵٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، c- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین E₈ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۷۲ ساعت، d- نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیپتین سویه E₈ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت. غلظت پاپوسیپتین در تمامی گروه‌ها در تیمار FBS بالاترین میزان را داشته و در تیمار شاهد در رتبه دوم قرار دارد و با هم تفاوت معناداری دارند.

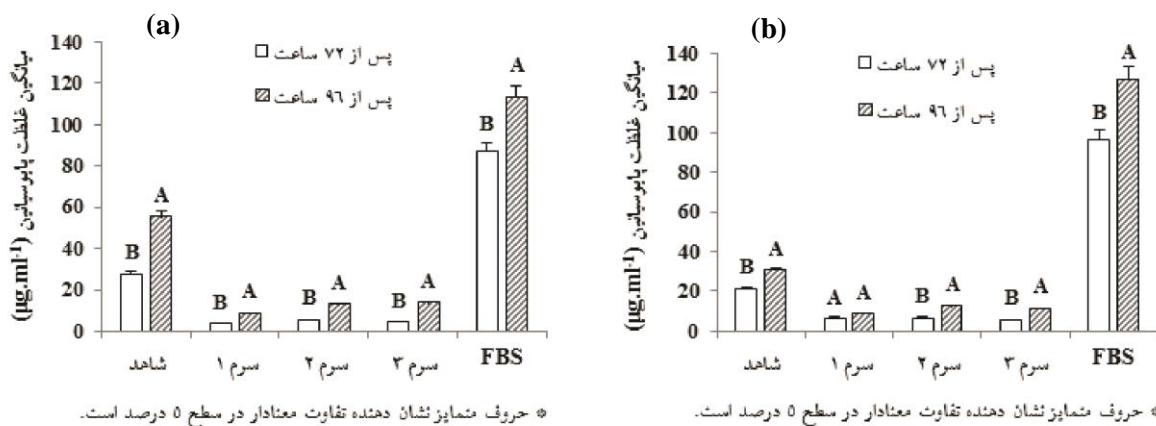


* حروف متمایز نشان دهنده اختلاف معنادار در سطح 0 درصد است.

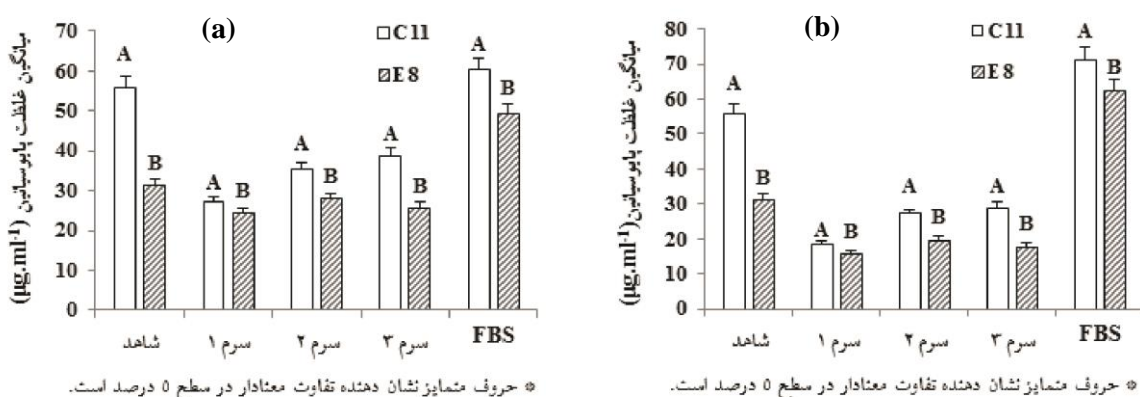
شکل ۷) نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیپتین C₁₁ در حضور ۵٪ و ۱۰٪ ABS فعال، پس از ۷۲ ساعت. غلظت پاپوسیپتین در حضور ۵٪ ABS فعال بالاتر از ۱۰٪ ABS فعال است.



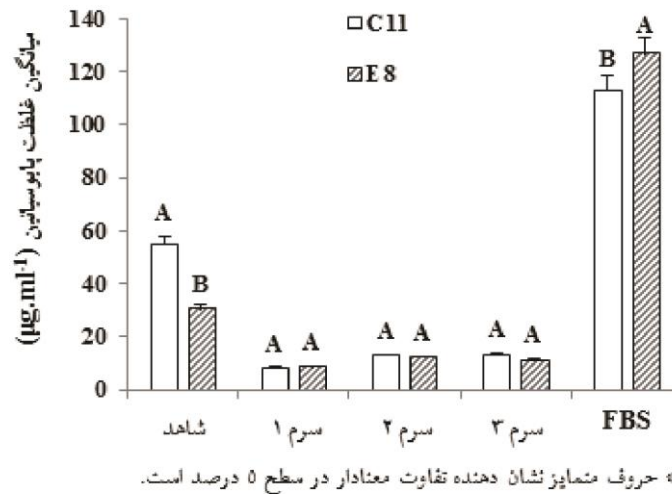
شکل ۸) نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیانین C₁₁ در حضور ۱۰٪ ABS فعال و ۱۰٪ ABS غیرفعال، پس از ۷۲ ساعت. غلظت پاپوسیانین در حضور ۱۰٪ ABS غیرفعال بالاتر است.



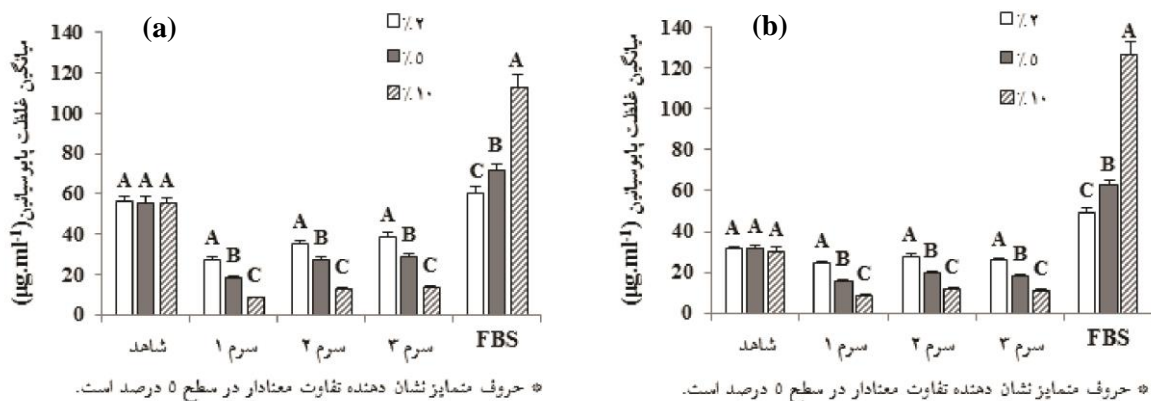
شکل ۹) a- نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیانین C₁₁ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت، b- نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیانین سویه E₈ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۷۲ و ۹۶ ساعت. غلظت پاپوسیانین پس از ۹۶ ساعت در تمامی تیمارها بالاتر است.



شکل ۱۰) a- نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیانین سویه های C₁₁ و E₈ در حضور ۲٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، b- نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیانین سویه های C₁₁ و E₈ در حضور ۵٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت. غلظت پاپوسیانین سویه C₁₁ در تمامی تیمارها بالاتر است.



شکل (۱۱) نتایج آزمون مقایسه غلظت پاپوسیائین سویه های C₁₁ و E₈ در حضور ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت. غلظت پاپوسیائین در تیمار شاهد در سویه C₁₁، و در تیمار FBS در سویه E₈ بالاتر است.



شکل (۱۲) -a نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیائین C₁₁ در حضور ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت، -b نتایج آزمون دانکن غلظت پاپوسیائین E₈ در حضور ۲٪، ۵٪ و ۱۰٪ سرم غیرفعال پس از ۹۶ ساعت. در تیمار با سرم های ۱ و ۲ و ۳، غلظت پاپوسیائین در حضور ۲٪ سرم غیرفعال بیشترین مقدار را دارد. در غلظت ۵٪ در رتبه دوم و در غلظت ۱۰٪ کمترین مقدار را به خود اختصاص داده است. اما در تیمار با FBS، در حضور ۱۰٪ FBS، پاپوسیائین بیشترین میزان غلظت را داشته است. در حضور ۵٪ در رتبه دوم و در حضور ۲٪ کمترین مقدار و رتبه سوم را دارد.

تیتراژ آنتی بادی سرم های تهیه شده

سرم ۲ علیه هر دو سویه کمترین میزان آنتی بادی را دارا بود. جدول ۵ تیتراژ آنتی بادی های سرم گاو بزرگسال علیه سویه های C₁₁ و E₈ را نشان می دهد.

جدول ۵) تیتراژ آنتی بادی سرم ها علیه سویه های C₁₁ و E₈

| نمونه | C ₁₁ | E ₈ |
|-------|-----------------|----------------|
| سرم ۱ | ۱/۱۶۰ | ۱/۴۰ |
| سرم ۲ | ۱/۴۰ | ۱/۲۰ |
| سرم ۳ | ۱/۸۰ | ۱/۴۰ |

بحث و نتیجه گیری

سودوموناس آئروجینوزا، باسیل گرم منفی می باشد که در طیف گسترده ای از محیط ها از جمله خاک، آب، سطح گیاهان و بافت حیوانات رشد می کند (Gross and Loper, 2009). این باکتری به دلیل اهمیت در بیماری های گیاهی و انسانی و نیز توانایی رو به رشد آن جهت استفاده در کاربردهای بیوتکنولوژی مورد توجه قرار گرفته است (Silby et al, 2011). گوناگونی اکولوژیکی سودوموناس آئروجینوزا در ارتباط با تطابق پذیری متابولیکی خوب آن است که می تواند از آلکان هایی با زنجیره بلند استفاده کند و حداقل برای مدت ۵ سال در نفت سنگین زنده بماند (Chaerun et al, 2004). این باکتری، نمونه ای از پاتوژن فرصت طلب در انسان می باشد که به ندرت باعث عفونت در افراد سالم می شود ولی عامل اصلی عفونت های بیمارستانی است (Jander et al, 2000). سودوموناس آئروجینوزا، تمایل به آلوده نمودن افرادی با نقص در سیستم ایمنی یا بیماران دارای سوختگی دارد و روی کاتتر یا روی دستگاه های تنفس مصنوعی ساکن می شود (Weinstein et al, 2005). بیماری زایی سودوموناس آئروجینوزا به دلیل تولید انواع گوناگونی از ترکیبات مختلف از جمله ترکیبات فنازینی با فعالیت ردوکس است که پایوسیانین، فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید و فنازین-۱-کربوکسامید را شامل می شوند (Budzikiewicz, 1993). حدود ۹۰ تا ۹۵٪ سویه های سودوموناس آئروجینوزا پایوسیانین تولید می کنند. این پیگمان دارای فعالیت آنتی بیوتیکی قوی می باشد و به ویژه به عنوان کنترل کننده زیستی مورد استفاده قرار می گیرد (Laursen and Nielsen, 2004). هدف از این مطالعه، بررسی اثر سرم گاو روی تولید پایوسیانین بود.

در مطالعه حاضر نمونه های محیطی از خاک های آلوده به هیدروکربن های نفتی و خاک های زراعی، در اواخر پائیز جمع آوری شدند. جهت جداسازی باکتری ها، از روش های رقت سازی و پورپلیت در ستریمد آگار، کشت سطحی از رقت های تهیه شده روی ستریمد آگار و روش غنی سازی باکتری ها در محیط نوترینت براث و کشت بر روی محیط ستریمد آگار، استفاده شد. در روش پورپلیت، ۴ ایزوله حاصل شد و زمانی که رقت های تهیه شده به صورت سطحی روی محیط ستریمد آگار کشت داده شدند، ۱۳ ایزوله رشد نمودند که هیچ یک پیگمان سبز-آبی تولید نمی کردند. این در حالی بود که در روش غنی سازی، ۲۴ ایزوله روی محیط ستریمد آگار رشد نمودند. از ۲۴ ایزوله حاصل از این روش، ۱۰ ایزوله (۴۱٪) به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شدند و باقی ایزوله ها به دیگر گونه های سودوموناس یا دیگر جنس های باکتری های گرم منفی تعلق داشتند. از ۱۰ ایزوله سودوموناس آئروجینوزا، ۶ ایزوله (۶۰٪) متعلق به نمونه هایی بودند که با هیدروکربن های نفتی آلوده بودند که این ایزوله ها از ۳ نمونه از ۵ نمونه (۶۰٪) خاک آلوده به نفت و فرآورده های نفتی جداسازی شده بودند. از ۴ سودوموناس آئروجینوزایی که از خاک های زراعی به دست آمده بودند، ۲ ایزوله متعلق به ۲ نمونه خاک ریزوسفر، ۱ ایزوله متعلق به خاک باغچه ای حاوی هوموس و ۱ ایزوله متعلق به خاک باغ شاتوت بود و چنین نتیجه گرفته شد که خاک های آلوده به فرآورده های نفتی می توانند منبع غنی تری از سودوموناس آئروجینوزا نسبت به خاک های کشاورزی باشند. نتایج حاصل از بررسی حاضر با نتایج مطالعه Vives- Flórez و همکاران مطابقت دارد. آن ها در مطالعه خود با استفاده از روش پورپلیت، از ۳۸ نمونه آب و خاک (۹ نمونه آلوده به نفت و ۲۹ نمونه غیرآلوده به نفت در کلمبیا)، ۵۰ ایزوله روی ستریمد آگار جدا نمودند که از این ایزوله ها، ۱۹ ایزوله (۳۸٪) به عنوان سودوموناس آئروجینوزا شناسایی شد. در مطالعه آن ها از ۱۹ سودوموناس آئروجینوزا جدا شده، ۱۶ ایزوله متعلق به نمونه هایی بودند که با هیدروکربن های نفتی آلوده شده بودند، سودوموناس آئروجینوزا از تمام ۹ نمونه آلوده به نفت جداسازی شد و فقط ۳ نمونه غیرآلوده به نفت حاوی سودوموناس آئروجینوزا بودند (برابر با ۱۰/۳٪). آن ها چنین نتیجه گرفتند که ممکن است جمعیت های سودوموناس آئروجینوزا در ۲۳ نمونه ای که از نظر سودوموناس آئروجینوزا منفی بودند، وجود داشته باشد ولی با روش رقت سازی قابل شناسایی نباشند (Vives-Flórez and Garnica, 2010).

تعداد سودوموناس آئروجینوزای حاصل از مطالعه حاضر با تعداد سودوموناس آئروجینوزاهایی که El-Amine و همکاران و نیز Al-Hinai و همکاران به دست آوردند مغایرت دارد. آن ها در مطالعات خود تعداد بیشتری سودوموناس آئروجینوزا از منابع آلوده و غیر آلوده به نفت جداسازی نمودند. El-Amine و همکارانش در مطالعه خود از خاک آلوده به هیدروکربن در دو ایستگاه گازی در Mascara و جنگلی که با فاضلاب ایستگاه دوم تغذیه می شد و روش غنی سازی باکتری ها در محیط

نوترینت برات استفاده نمودند. از ۱۵ نمونه خاک مورد مطالعه آن ها ۲۰ سویه سودوموناس *آئروجینوزا* جداسازی شد (El-Amine et al, 2012). Al-Hinai و همکاران نیز از ۲۷ نمونه خاک از ۹ گلخانه خیار در Barka عمان، ۲۰ سویه سودوموناس *آئروجینوزا* به دست آوردند (Al-Hinai et al, 2010). با توجه به بررسی های حاصل، از آن جایی که سودوموناس *آئروجینوزا* باکتری هوازی می باشد و در روش پورپلیت امکان قرارگیری باکتری ها در زیر محیط و عدم هوادهی مناسب وجود دارد، لذا جهت جداسازی سویه های سودوموناس *آئروجینوزا* از نمونه های محیطی، روش غنی سازی در محیط مایع و سپس کشت سطحی از آن پیشنهاد می گردد.

در مطالعه حاضر، جهت جداسازی سودوموناس از محیط انتخابی ستریمید آگار استفاده شد. این محیط با تغییر در فرمولاسیون محیط King تولید شده است، که علاوه بر این که حاوی عامل مهار کننده (ستریمید) می باشد، داری گلیسرول نیز می باشد. وجود گلیسرول منجر به افزایش تولید پایوسیانین و در نتیجه شناسایی بهتر سودوموناس می شود. Collins و Lowbury استفاده از ستریمید در محیط کشت انتخابی جهت جداسازی سودوموناس را پیشنهاد نمودند (Lowbury and Collins, 1955).

پس از انجام SDS-PAGE، سویه هایی که پیگمان سبز تولید می نمودند، باندهای ۴۳/۶ و ۳۶/۴ کیلودالتونی، که به ترتیب مربوط به پروتئین های PhzS و PhzM بودند، را نشان می دادند. در حالی که سویه ای که پیگمان زرد رنگ تولید می نمود دارای باند پروتئینی ۴۳/۶ کیلودالتونی PhzS و فاقد باند ۳۶/۴ کیلودالتونی PhzM بود. نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه Mavrodi و همکارانش مطابقت دارد. آن ها در مطالعه خود بیان نمودند که دو آنزیم اختصاصی PhzM و PhzS (به ترتیب با وزن مولکولی ۳۶/۴ و ۴۳/۶ کیلودالتون) در تبدیل به PCA به پایوسیانین نقش دارند و PhzS علاوه بر تولید پایوسیانین، در بیوسنتز ۱- هیدروکسی فنازین (محصول زرد رنگ) در سودوموناس *آئروجینوزا* PAO1 شرکت می کند (Mavrodi et al, 2001). بنابراین، تولید پیگمان زرد رنگ در سودوموناس *آئروجینوزا* در نتیجه حضور PhzS و تولید پیگمان سبز رنگ در سویه های سودوموناس *آئروجینوزا* مورد بررسی به دلیل حضور هر دو پروتئین یعنی PhzS و PhzM می باشد.

در مطالعه حاضر، جهت افزایش تولید پایوسیانین از محیط گلیسرول- آلانین استفاده شد. سویه هایی از سودوموناس *آئروجینوزا* که پیگمان سبز رنگ روی محیط ستریمید آگار تولید می نمودند، قادر به تولید پایوسیانین به رنگ آبی در محیط گلیسرول- آلانین بودند که رنگ تولید شده، بیان گر غلظت بالای پایوسیانین بود. گزارش های متعددی وجود دارد که در آن ها نیز جهت افزایش تولید پایوسیانین از محیط گلیسرول- آلانین استفاده شده بود (Karatuna and Yagci, 2010; Mohammed et al, 2014; Vinckx et al, 2010). وجود آلانین و گلیسرول به عنوان سوبستراهای مشترک، در تولید پایوسیانین به میزان زیادی مؤثر است و به عنوان پیش ساز برای تولید پایوسیانین عمل می کنند. این محیط که دارای سوبسترای اشتراکی است، محیط کشت Frank و De Moss می باشد که برای تشخیص سریع سودوموناس *آئروجینوزا* و تأیید پایوسیانین توصیه می شود (Subramaniam, 1985).

جهت شناسایی پایوسیانین در مطالعه حاضر، طیف UV-Vis آن در طول موج ۳۰۰ تا ۸۰۰ نانومتر به دست آمد که بیشترین جذب پایوسیانین زمانی که در کلروفرم حل می شد، ۳۰۸ و ۶۹۴ نانومتر و زمانی که در HCl ۰/۱ نرمال حل می شد، ۳۸۷ و ۵۱۸ نانومتر بود. نتایج حاصل با نتایج حاصل از مطالعات پیشین مطابقت دارد (Ohfuji et al, 2004). El-Fouly و همکارانش گزارش نمودند، زمانی که پایوسیانین در HCl ۰/۲ نرمال حل می شود، بیشترین جذب را در طول موج های ۳۰۰، ۳۸۸ و ۵۱۸ نانومتر نشان می دهد (El-Fouly et al, 2015). به علاوه، Priyaja گزارش نمود که بیشترین جذب پایوسیانین استخراج شده از سویه مورد مطالعه آن ها زمانی که در کلروفرم حل می شود در طول موج های ۲۵۴/۵، ۳۱۰، ۵۲۹ و ۶۹۹ نانومتر می باشد (Priyaja et al, 2012).

جهت بررسی اثر سرم گاو بر تولید پایوسیانین، ABS از گاوهای بالاتر از ۱۲ ماه و FBS به صورت آماده تهیه شد. ABS، یک بار با کمپلمان فعال با غلظت های ۵ و ۱۰٪ حجمی - حجمی به محیط گلیسرول- آلانین اضافه شد. بار دیگر، کمپلمان ABS

و نیز FBS با گرمادهی غیر فعال شد و با غلظت های ۲، ۵ و ۱۰٪ حجمی - حجمی به محیط گلیسرول - آلانین اضافه شدند. سپس به محیط ها با در نظر گرفتن شاهد (محیط فاقد سرم) میزان یکسانی از سودوموناس آئروجینوزا تلقیح شد. پس از ۷۲ تا ۹۶ ساعت نگهداری، غلظت پایوسیانین هر نمونه با استفاده از استخراج کلروفرمی - اسیدی و اسپکتروفوتومتر تعیین شد. نتایج حاصل از تحلیل داده ها نشان داد که در گروه های شاهد و گروه های حاوی ABS با کمپلمان غیرفعال، سویه بالینی توانایی تولید غلظت بیشتری از پایوسیانین را در مقایسه با سویه محیطی دارد ولی غلظت پایوسیانین در حضور FBS در سویه محیطی بیشتر از سویه بالینی بود. در تمام نمونه های حاوی ABS، تولید پایوسیانین نسبت به شاهد کاهش یافت، ولی در نمونه های حاوی FBS، غلظت آن نسبت به شاهد افزایش قابل توجهی داشت. در نمونه هایی که حاوی ABS با کمپلمان فعال بودند، غلظت پایوسیانین در حضور سرم های متفاوت اختلاف معنادار با هم نداشتند و سرم ها تأثیر یکسانی روی تولید پایوسیانین داشتند ولی در نمونه های حاوی سرم با کمپلمان غیرفعال، سرم های متفاوت دارای اختلاف معنادار بودند و اثرشان روی غلظت پایوسیانین متفاوت بود. همچنین غلظت پایوسیانین در گروه تیمار با سرم فعال و گروه تیمار با سرم غیرفعال، تفاوت معنادار با هم داشتند و میزان آن در گروه سرم غیرفعال بیشتر بود. با افزایش غلظت ABS، غلظت پایوسیانین کاهش یافت ولی با افزایش غلظت FBS، غلظت پایوسیانین نیز افزایش یافت. به علاوه، با افزایش زمان نگهداری، غلظت پایوسیانین در تمام نمونه ها افزایش یافت و در روز چهارم به حداکثر خود رسید.

Juhas و همکاران نشان دادند که ژن های QS و تحت کنترل QS در سودوموناس آئروجینوزا PAO1 ۱۱۳ ژن می باشد که بیان آن ها توسط سرم افزایش می یابد (Juhas et al, 2004). به علاوه، Wu و همکاران پیشنهاد نمودند که اتصال اختصاصی بین اینترفرون گاما و پروتئین غشاء خارجی OmpF در سودوموناس آئروجینوزا، اثر *rhlI* و *rhlR* را به راه می اندازد و منجر به افزایش تولید پایوسیانین می شود. در مطالعه آن ها اثر اینترفرون گاما در طول اواخر مرحله سکون رشد مشاهده شد (Wu et al, 2005 Wu et al, 2005).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر با نتایج حاصل از مطالعه Kruczek و همکاران مغایرت دارد. آن ها در مطالعه خود سودوموناس آئروجینوزا PAO1 را در محیط LB و همچنین محیط LB که با ۱۰٪ (حجمی - حجمی) سرم گاو بزرگسال تکمیل شده بود، کشت دادند و از آنالیزهای رونویسی و سنجش های آنزیمی جهت بررسی اثر سرم گاو بزرگسال روی QS و فاکتورهای بیماری زایی که در مرحله اولیه و مرحله تأخیری رشد سودوموناس آئروجینوزا PAO1 توسط QS کنترل می شوند، استفاده نمودند. سرم، بیان برخی از ژن های تحت کنترل QS، از جمله *phz* را در مرحله اولیه سرکوب کرد ولی بیان آن ها را در مرحله تأخیری تقویت نمود. آن ها نتیجه گرفتند که سرم در مراحل اولیه رشد، بیان ژن های QS و ژن های بیماری زای تحت کنترل QS را نسبت به نمونه فاقد سرم کاهش و در اواخر مرحله سکون، بیان آن ها را افزایش می دهد (Kruczek et al, 2014).

کاهش تولید پایوسیانین در حضور سرم گاو بزرگسال را می توان به مهارکننده های موجود در سرم، از جمله پروتئین های کمپلمان و آنتی بادی ها، نسبت داد. با غیرفعال نمودن کمپلمان و مقایسه غلظت پایوسیانین در حضور کمپلمان فعال و غیرفعال، بررسی تیتراژ آنتی بادی های موجود در سرم های گاو بزرگسال و نیز مقایسه غلظت پایوسیانین در حضور سرم گاو بزرگسال و سرم جنین گاو (که عاری از هر گونه آنتی بادی می باشد)، فرضیه فوق مورد تأیید قرار می گیرد. با توجه به نتایج حاصل، استفاده از سرم جنین گاو در محیط کشت سودوموناس آئروجینوزا به عنوان افزایش دهنده تولید پایوسیانین پیشنهاد می گردد. با این حال، با توجه به مقرون به صرفه بودن سرم گاو بزرگسال نسبت به سرم جنین گاوی، اثر سرم گاو بزرگسال روی تولید پایوسیانین نیازمند مطالعات بیشتری می باشد.

منابع

Al-Hinai, AH. Al-Sadi, AM. Al-Bahry, SN. Mothershaw, AS. Al-Said, FA. Al-Harathi, SA. and Deadman, ML. (2010). Isolation and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* with antagonistic activity against *Pythium aphanidermatum*. Journal of Plant pathology, 653-660.

- Anjaiah, Vanamala. Koedam, Nico. Nowak-Thompson, Brian. Loper, Joyce E. Höfte, Monica. Tambong, James Tabi. and Cornelis, Pierre. (1998). Involvement of Phenazines and Anthranilate in the Antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn 5 Derivatives Toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11(9), 847-854.
- Budzikiewicz, H. (1993). Secondary metabolites from fluorescent pseudomonads. *FEMS microbiology reviews*, 104(3), 209-228.
- Chaerun, S Khodijah. Tazaki, Kazue. Asada, Ryuji. and Kogure, Kazuhiro. (2004). Bioremediation of coastal areas 5 years after the Nakhodka oil spill in the Sea of Japan: isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria. *Environment International*, 30(7), 911-922.
- El-Amine, BM. Mebrek, S. Naimi, M. Tifrit, A. and Belaouni, HAAB. (2012). Isolation and comparison of rhamnolipids production in *Pseudomonas aeruginosa* PB: 2 and *Pseudomonas fluorescens* PV: 10. *Open Access Scientific Reports*, 1, 544.
- El-Fouly, MZ. Sharaf, AM. Shahin, AAM. El-Bialy, Heba A. and Omara, AMA. (2015). Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 8(1), 36-48.
- Essar, DW. Eberly, L. Hadero, A. and Crawford, IP. (1990). Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *Journal of bacteriology*, 172(2), 884-900.
- Frank, Dara W. (1997). The exoenzyme S regulon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*, 26(4), 621-629.
- Gross, Harald. and Loper, Joyce E. (2009). Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. *Natural product reports*, 26(11), 1408-1446.
- Hassani, Hayfa H. Hasan, Husam M. Al-Saadi, Adawia. Ali, Amal M. and Muhammad, Maeda H. (2012). A comparative study on cytotoxicity and apoptotic activity of pyocyanin produced by wild type and mutant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Exp Biol*, 2, 1389-1394.
- Jander, Georg. Rahme, Laurence G. and Ausubel, Frederick M. (2000). Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* mutants in mice and insects. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3843-3845.
- Juhas, Mario. Wiehlmann, Lutz. Huber, Birgit. Jordan, Doris. Lauber, Joerg. Salunkhe, Prabhakar. Limpert, Anna Silke. von Götz, Franz. Steinmetz, Ivo. and Eberl, Leo. (2004). Global regulation of quorum sensing and virulence by VqsR in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 150(4), 831-841.
- Karatuna, O. and Yagci, A. (2010). Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*, 16(12), 1770-1775.
- Kerr, JR. Taylor, GW. Rutman, A. Høiby, Niels. Cole, PJ. and Wilson, R. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin and 1-hydroxyphenazine inhibit fungal growth. *Journal of clinical pathology*, 52(5), 385-387.
- Kruczek, Cassandra. Qaisar, Uzma. Colmer-Hamood, Jane A. and Hamood, Abdul N. (2014). Serum influences the expression of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing genes and QS-controlled virulence genes during early and late stages of growth. *MicrobiologyOpen*, 3(1), 64-79.
- Lau, Gee W. Hassett, Daniel J. Ran, Huimin. and Kong, Fansheng. (2004). The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*, 10(12), 599-606.
- Laursen, Jane Buus. and Nielsen, John. (2004). Phenazine natural products: biosynthesis, synthetic analogues, and biological activity. *Chemical reviews*, 104(3), 1663-1686.
- Lowbury, E.J.L. and Collins, A.G. (1955). The use of a new cetrimide product in a selective medium for *Pseudomonas pyocyanea*. *Journal of clinical pathology*, 8(1), 47.
- Mavrodi, Dmitri V. Bonsall, Robert F. Delaney, Shannon M. Soule, Marilyn J. Phillips, Greg. and Thomashow, Linda S. (2001). Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 183(21), 6454-6465.
- Mohammed, Hind A. Yossef, Hanaa S. and Mohammad, Farooq I. (2014). The Cytotoxicity Effect of Pyocyanin on Human Hepatocellular Carcinoma Cell Line (HepG2). *Iraqi Journal of Science*, 55(2B), 668-674.
- Muller, Michael. (2002). Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radical Biology and Medicine*, 33(11), 1527-1533.
- Ohfuji, Kunihiro. Sato, Naruhide. Hamada-Sato, Naoko. Kobayashi, Takeshi. Imada, Chiaki. Okuma, Hirokazu. and Watanabe, Etsuo. (2004). Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(10), 1237-1244.
- Price-Whelan, Alexa. Dietrich, Lars EP. and Newman, Dianne K. (2006). Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature chemical biology*, 2(2), 71-78.

- Priyaja, P. Rosamma, Philip. and Bright Singh, IS. (2012). Pyocyanin (5-methyl-1-hydroxyphenazine) produced by *Pseudomonas aeruginosa* as antagonist to vibrios in aquaculture: overexpression, downstream process and toxicity. (Doctoral Dissertation), Cochin University of Science and Technology. Retrieved from <http://dyuthi.cusat.ac.in/purl/3266>
- Rabaey, Korneel. and Verstraete, Willy. (2005). Microbial fuel cells: novel biotechnology for energy generation. *TRENDS in Biotechnology*, 23(6), 291-298.
- Rahme, Laurence G. Ausubel, Frederick M. Cao, Hui. Drenkard, Eliana. Goumnerov, Boyan C. Lau, Gee W. Mahajan-Miklos, Shalina. Plotnikova, Julia. Tan, Man-Wah. and Tsongalis, John. (2000). Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8815-8821.
- Silby, Mark W. Winstanley, Craig. Godfrey, Scott AC. Levy, Stuart B. and Jackson, Robert W. (2011). *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. *FEMS microbiology reviews*, 35(4), 652-680.
- Subramaniam, L. (1985). Rapid diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* infection by demonstration of pyocyanin & fluorescein. *The Indian journal of medical research*, 81, 561.
- Vinckx, Tiffany. Wei, Qing. Matthijs, Sandra. and Cornelis, Pierre. (2010). The *Pseudomonas aeruginosa* oxidative stress regulator OxyR influences production of pyocyanin and rhamnolipids: protective role of pyocyanin. *Microbiology*, 156(3), 678-686.
- Vives-Flórez, Martha. and Garnica, Diana. (2010). Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *International Microbiology*, 9(4), 247-252.
- Weinstein, Robert A. Gaynes, Robert. Edwards, Jonathan R. and System, National Nosocomial Infections Surveillance. (2005). Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases*, 41(6), 848-854.
- Whiteley, Marvin. Lee, Kimberly M. and Greenberg, EP. (1999). Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13904-13909.
- Wu, Licheng. Estrada, Oscar. Zaborina, Olga. Bains, Manjeet. Shen, Le. Kohler, Jonathan E. Patel, Nachiket. Musch, Mark W. Chang, Eugene B. and Fu, Yang-Xin. (2005). Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science*, 309(5735), 774-777.
- Zhao, J. Wu, Y. Alfred, AT. Wei, P. and Yang, S. (2014). Anticancer effects of pyocyanin on HepG2 human hepatoma cells. *Letters in applied microbiology*, 58(6), 541-548.

Archived SID.ir