



جداسازی مولکولی ژن *Lux* سراسیا 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
ID 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

کلیدواژه‌ها

سراسیا مارسنس،

ژن *lux*

RealTimePCR،

لاکتوباسیلوس رامنوسوس

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

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 میکروپ 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 غلظت‌های مختلف برای هر نمونه مورد بررسی قرار گرفت. در همه مراحل از یک باکتری سراسیا مارسنس به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

یافته‌ها: از تعداد ۱۰۰ نمونه مورد بررسی ۱۲ باکتری سراسیا مارسنس به دست آمد. ۱۲ جدایه سراسیا 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 بالاکتوباسیلوس 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 سراسیا مارسنس، تحمل بیشتری نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها را دارد. با استفاده از پروبیوتیک‌ها و کاهش بیان ژن‌های دخیل در ایجاد بیوفیلم، می‌توان در درمان شاهد موفقیت‌های بیشتری استفاده کرد.

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

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 به صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.



Original Article

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 Shojae 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. *Serratia* 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 *Serratia marcescens* 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

Serratia marcescens,

lux gene,

Real-time PCR,

Lactobacillus rhamnosus

Received: 22/09/2020

Published: 23/12/2020

microbiology laboratory. Skim milk agar and biochemical tests were used to isolate and identify microorganisms with proteolytic activity. Using specific primers, *Serratia 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, *Serratia marcescens* 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.**

مقدمه

سراسشیا مارسسنس (*Serratia marcescens*) از گونه‌های معروف سراسشیا است و باکتری گرم منفی و متحرکی که از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است و به خوبی در محیط‌های 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. سراسشیا دارای کپسول کوچکی بوده و کلنی‌های آن دارای رنگدانه سفید-صورتی یا قرمز می‌باشند. این باکتری را می‌توان از عفونت‌های ریوی-ادراری و خون جدا کرد. کشت آنها بوی ماهی یا ادرار می‌دهد. سراسشیا مارسسنس (*Serratia marcescens*) از گونه‌های معروف که از اهمیت بالینی بالایی برخوردار است (۱).

در پیام رسانی مولکول به سلول یک سری مولکول‌های کوچک پیام رسان به نام خود القا کننده تولید و ترشح می‌شوند. ژن *Lux* در اغلب باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی وجود دارد که نقش اساسی در پدیده پیام رسانی و تجمع سلولی دارد این وظیفه با کد کردن پروتئین خود القا کننده ای *AII* انجام می‌شود. پروتئین خود القا کننده در تنظیم بیان ژن‌های عامل تولید آنتی بیوتیک، فرآیند مینیس سنس، تشکیل بیوفیلم، رقابت ژنتیکی، اسپورزایی، حرکت لغزشی و فاکتورهای حدت در باکتری‌های مختلف نقش کلیدی دارد (۲). به طور کلی نحوه عملکرد لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی در تداخل با بیماری‌زاهای دستگاه ادراری تناسلی بسیار متنوع است و این تنوع به علت چهار ویژگی اصلی این باکتری‌ها از جمله توانایی اتصال، قدرت رقابت و قدرت مهار یوروپاتوژن‌ها است (۲).

تشکیل بیوفیلم به وسیله تعاملات بین سلولی بین باکتری‌ها که سیستم *Quorum sensing* شکل می‌گیرد. سیستم کروم سنسینگ، فرآیند وابسته به غلظت است که هم در باکتری‌های گرم مثبت و هم در باکتری‌های گرم منفی وجود دارد. در این سیستم، باکتری‌ها با واسطه مولکول‌های کوچکی به نام مولکول‌های خودالقاگر با هم ارتباط برقرار می‌کنند. زمانی که تراکم باکتریایی در محیط به حد خاصی می‌رسد، غلظت این مولکول‌های انتقال دهنده به حد خاصی رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا می‌کنند.

سیستم کروم سنسینگ *Qs* به ترتیب توسط همولوگ‌های *LuxI*، *LuxR*، *SwrI*، *SWrR* اداره می‌شود و بیان حداقل ۲۸ پروتئین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳).

پروبیوتیک‌ها را به عنوان مکمل غذایی حاوی میکروب‌های زنده که از طریق تعادل میکروفلور روده اثرات مفید در بدن میزبان ایجاد می‌نماید اثرات مفید پروبیوتیک‌ها از طریق میکروفلور روده شناخته شده است. پروبیوتیک‌ها میکروارگانیسم‌های زنده ای هستند که در مقادیر کافی اثرات مفید سلامتی بر روی میزبان خواهند داشت و شامل گونه‌هایی از جنس باکتری‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم، باسیلوس، ایتروکوک و استرپتوکوکوس می‌باشند (۴).

جنس لاکتوباسیلوس بیشترین میکروارگانیسم‌هایی هستند که به عنوان پروبیوتیک در بدن انسان قادر به فعالیت هستند. این گروه از باکتری‌ها باعث بهبود و افزایش عملکرد سیستم ایمنی شده و پروبیوتیک‌ها از جمله لاکتوباسیلوسها باعث افزایش مقاومت بدن در برابر عفونت‌ها و سرطان‌ها می‌باشند. مصرف این باکتری‌ها موجب افزایش عملکرد ماکروفاژها و ترشح مواد متعدد از جمله ایمنوگلوبولین‌ها می‌شود (۵). پژوهش حاضر به منظور بررسی آثار ضد میکروبی و ضد اتصالی لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی بر باکتری سراسشیا مارسسنس و احتمالاً معرفی این باکتری به عنوان مهار کننده در پیشگیری و درمان عفونت‌های ادراری انجام گرفت.

لاکتوباسیلوس رامنوسوس یکی از این گونه‌ها است که دارای سویه‌های مختلفی با ویژگی‌های سلولی متفاوتی است. از نظر وابستگی ژنی، این باکتری به گونه لاکتوباسیلوس کازبی وابسته بوده و سویه‌های آن دارای قدرت تخمیر ناهمگونی هستند (۶). هدف از این پژوهش جداسازی مولکولی ژن *LuxS* سراسشیا مارسسنس جدا شده از منابع بالینی و تاثیر سوپرناتانت پروبیوتیک لاکتوباسیلوس رامنوسوس بر بیان آن با روش Real-time PCR می‌باشد.

روش کار

نمونه برداری: این مطالعه از نوع توصیفی - مقطعی است که در سال ۹۷ انجام شد. 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.

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 *سراسیا مارسنس* از طریق تست های بیوشیمیایی و روش های 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 تست های تکمیلی بیوشیمیایی مانند تخمیر قندها و استفاده از آمینواسیدها، طبق جدول تشخیص میکروب شناسی انجام شد. با استفاده از پرایمر های اختصاصی گونه *سراسیا 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 *سراسیا مارسنس* به دست آمد (جدول ۱). سپس سویه های جداسازی شده در محیط های کشت TSA در دمای ۴ درجه سانتی گراد و نیز TSB گلیسرین دار در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا زمان انجام آزمایش نگهداری شد (۷).

مراحل استخراج DNA با استفاده از کیت: پس از تایید *سراسیا 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 باکتری های گرم منفی شرکت (GTP) پیشگامان انتقال ژن به شماره LOT:808288 استفاده شد.

ارزیابی کمی و کیفی DNA: غلظت DNA در نمونه های 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 هر کدام یک از پرایمر ها با غلظت ۱۰ پیکومول بر میکرولیتر، ۴ میکرولیتر از DNA الگو و ۴

جدول ۱- خصوصیات بیوشیمیایی باکتری *سراسیا 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)

اندازه پرایمر (<i>bp</i>)	۵' → ۳' توالی	پرایمر
۹۹	GAATTCGCTGGGAATACAATTAC	<i>luxI F</i>
	GGATCCTTTATACTCCTCCGATGGAATTGCC	<i>luxI R</i>

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

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

ر/منوسوس) 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 RNA استخراج 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 AMV با غلظت ۲۵ Iu/unit 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 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 ۱۰x آنزیم 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 بیمارستان های اراک جمع آوری شد و گونه سراشیا جداسازی گردید. معیار تایید هویت سویه سراشیا مارسنس ویژگی های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری ها بود. پس از تشخیص، نمونه هایی که خصوصیات بیوشیمیایی آن ها با ویژگی های سراشیا منطبق بود به عنوان نمونه مثبت درج گردید و کلنی های مربوط ذخیره شدند. از تعداد

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).

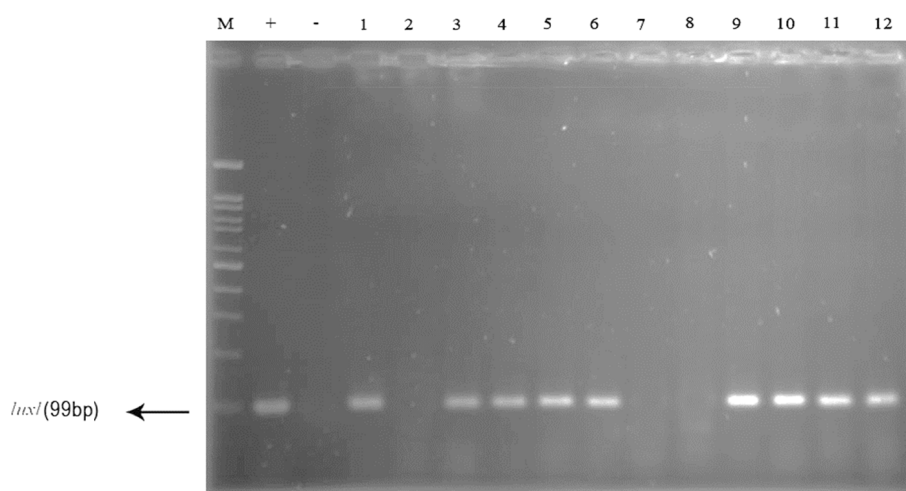
بعد از PCR جهت شناسایی سراشیا مارسنس (*Serratia marcescens*) از محصول PCR جهت توالی یابی استفاده گردید.

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 RNA از میکروکیت RNeasy شرکت Qiagen استفاده شد. سوسپانسیون باکتریایی (باکتری های واجد ژن lux بودند و با تعیین MIC آن ها در حضور لاکتوکوکوس



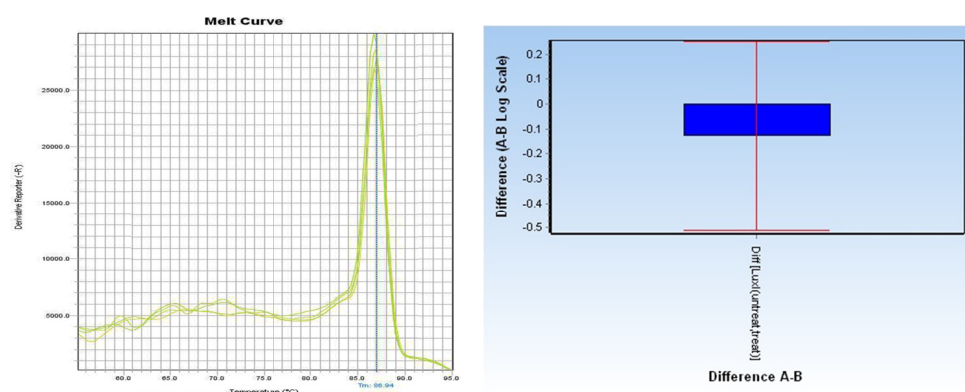
شکل ۱- تایید استخراج DNA



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

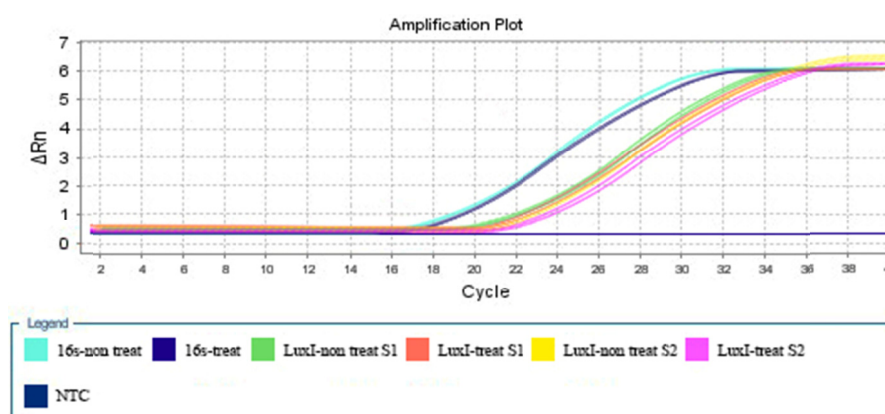
(۰/۷۵) واجد ژن حدت *Lux I* هستند. نتایج مربوط به آزمون Real time PCR در شکل‌های ۳ و ۴ و ۵ آمده است. جدول ۴ بیانگر نتیجه T-test برای داده‌های مورد بررسی می‌باشد. در ستون p-value سطح معنی‌داری برای هر ژن مشخص شده است. در جدول فوق میزان P-value برای ژن *luxI* از میزان ۰/۰۵ بیشتر می‌باشد که بیانگر بی‌معنا بودن اختلاف بیان این دو ژن در بین دو گروه تیمار شده بالاکتوباسیلوس رامنوسوس و تیمار نشده می‌باشد. سطح معنی‌داری ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌داری اصلاح شده و تعیین معنی‌داری نتایج استفاده گردید. ردیف Difference (A-B log scale) بیانگر میزان ddct برای ژن‌ها در گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده می‌باشد. ردیف Fold change نیز بیانگر

۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شده و مورد بررسی ۱۲ باکتری سراسیا مارسنس به دست آمد. **نتایج تایید استخراج DNA** بعد از شناسایی سویه سراسیا مارسنس استخراج DNA توسط کیت صورت گرفت (شکل ۱) و از طریق الکتروفورز کوتاه تأیید شد. **نتایج آزمون PCR** واکنش PCR بر روی ایزوله‌های سراسیا مارسنس برای شناسایی ژن کدکننده *lux* با استفاده از پرایمرهای اختصاصی انجام شد. همچنین سویه سراسیا مارسنس تولیدکننده ژن‌های مورد نظر به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. **نتیجه آزمایش PCR جهت شناسایی ژن lux:** همان‌طور که نشان داده شده است (شکل ۲) و بر اساس آزمایش PCR جهت شناسایی ژن *lux* مشخص گردید. همان‌طور که در تصویر (شکل ۳) مشخص است از تعداد ۱۲ ایزوله سراسیا مارسنس جداسازی شده ۹ سویه



شکل ۳- نمودار تغییرات Fold change

شکل ۴- منحنی ذوب بدست آمده



شکل ۵- نتایج منحنی تکثیر Real Time PC

جدول ۴- 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

انحراف معیار از میانگین می باشد. یکی از شاخص های پراکندگی است که نشان می دهد به طور میانگین داده ها 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

باکتری های حامل ژن مولد بیوفیلم تحمل بیشتری

میزان Fold change گروه تیمار نشده نسبت به گروه تیمار شده بالاکتوباسیلوس/امنوسوس 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 STDEV (standard deviation) بیانگر

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

لاکتوباسیلوس ها دسته ای از باکتری‌ها هستند که به طور معمول به عنوان مایه در تهیه ماست *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* و *اسیدوفیلوس*، شیرهای تخمیری (*لاکتوباسیلوس* / *اسیدوفیلوس*) و دیگر غذاهای تخمیری استفاده می‌شوند و نقش مهار کننده بر روی برخی از پاتوژن‌ها دارند. تاکنون نقش‌های متعددی از این باکتری‌ها شناسایی شده است که برخی از اثرات سودمند آن‌ها 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 علائم مربوط به عدم تحمل لاکتوز و کاهش شیوع بیماری‌های آلرژیک در بین افراد حساس، پیشگیری یا مقابله با سرطان، تولید طعم‌های مختلف مثل استالدید در ماست و پنیر و دیگر متابولیت‌ها در محصول‌های تخمیری، افزایش ارزش غذایی مثل کاهش اسیدهای آمینه آزاد یا تولید ویتامین‌ها در محصول تخمیر شده به ویژه تولید ترکیب‌هایی که فعالیت‌های ضد باکتریایی دارد از جمله آن‌ها است (۱).

مشرقی و همکاران، استفاده از ژن‌های کد کننده آنزیم لوسیفراز بنام *lux* از باکتری دریایی *Vibrio fischeri* و ژن *lux* از کرم شب تاب *Photinus pyralis* می‌باشد. این ژن‌ها از این جهت انتخاب شده‌اند که رابطه‌ای بین شدت نور تولید شده و فعالیت متابولیسمی سلول وجود دارد بنابراین بیولومینسانس یک معیار بسیار خوبی برای سلامت سلول می‌باشد. ژن‌هایی که بیولومینسانس را کد می‌کنند از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک به طیف وسیعی از میکرو ارگانیسم

های یوکاریوتیک و پروکاریوتیک معرفی گردیده است. اگر چه بیوسنسورهای میکروبی پروکاریوتیک دارایا مزایای مختلفی می‌باشند ولی نمی‌توانند معیار مناسبی در زمینه تاثیر مواد شیمیایی بر سیستم‌های 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 منتریتیدیس* از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید. پس از کشت باکتری و استخراج DNA واکنش Nested PCR به عمل آمد. محصول PCR (۵۰۷ bp) در کنار مارکر ۱۰۰ bp بر روی ژل آگارز الکتروفورز شد. محصول PCR درون پلاسמיד کلون گردید و پلاسמיד نو ترکیب توسط آنزیم‌های *sacI* و *Bam HI* تایید گردید. توالی نوکلئوتیدی آن شبیه ژن *luxS* باکتری *نایسریا منتریتیدیس* سویه Z2491 می‌باشد. ژن‌هایی که بیولومینسانس را کد می‌کنند از طریق روش‌های مهندسی ژنتیک به طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌های 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 *اسیتوباکتر* از ۱۰۰ بیمارستان بستر در بیمارستان میلاد، مسیح دانشوری و مفید شهر تهران جدا و مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن به همراه دو سویه استاندارد *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* بررسی شد. دو باکتری *لاکتوباسیلوس پلاتناروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* در شرایط غیر فعال دارای فعالیت ضد باکتریایی علیه باکتری *اسیتوباکتر بومانی* نبودند،

HeZ و همکاران، هدف از این مطالعه بررسی اثر ژن *luxS* بر روی تشکیل اولیه بیوفیلم توسط *استریپتوکوک موتانس* است. خصوصیات سطحی سلول‌های باکتریایی، از جمله هیدروفوبیت سلولی (پیوستگی باکتریایی به هیدروکربن‌ها) و تجمع، که برای پایداری 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 کانوکال مشاهده شد و بیانات ژنی مربوط به *QS* با استفاده از Real-time PCR بررسی گردید. یافته‌ها، بیوفیلم بیشتر در سویه‌های حامل ژن *lux* را نشان داد بنابر این ژن *luxS* می‌تواند تشکیل اولیه بیوفیلم توسط سویه موتان را تحت تاثیر قرار دهد. در تحقیق حاضر با بررسی حضور ژن *lux* در بیماران مبتلا به عفونت‌های بالینی به میزان تاثیر آن در بیماریزایی پرداخته شد (۱۶).

Lin Xu و همکاران، ژن *lux*، یک سیستم *QS* در استافیلوکوک‌ها را بررسی کردند که تاثیر قابل توجهی بر توسعه بیوفیلم و بیماری‌زایی 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 احتمالاً عامل اصلی تنوع فنوتیپ در باکتری‌ها 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 پروبیوتیک‌ها میتوان نسبت داد، با بررسی بر روی گستره وسیع تری از سویه‌های پروبیوتیک انجام گیرد. تا ضمن بررسی بیشتر آن‌ها، بتوان قدرت تاثیر سویه‌های مختلف از آن‌ها را مورد شناسایی قرار داد.

نتیجه‌گیری

نتیجه آنکه با توجه به نتایج مطالعه حاضر لاکتوباسیل‌ها علیه بسیاری از باکتری‌ها نقش مهار کنندگی دارند و می‌توان محلول را به صورت تغلیظ

ولی در حالت فعال یعنی زمانی که باکتری توانایی تولید ترکیب‌هایی نظیر آب اکسیژنه و اسید را داشته و یا تحت چنین شرایطی قرار گیرد می‌تواند خاصیت ضد باکتریایی داشته باشد و همچنین دو لاکتوباسیلوس فوق تقریباً نسبت به آنتی بیوتیک‌های 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، لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی با روش‌های استاندارد از نمونه‌های لبنی سنتی جداسازی و خالص‌سازی شدند. از ۱۰ جدایه لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی، ۲ جدایه که بیشترین توان پروبیوتیکی را داشتند، انتخاب شدند و ویژگی‌های فیلوژنی و مولکولی آن‌ها به کمک تکنیک rRNA 16s sequencing بررسی شد. اثر ضد میکروبی و ضد اتصال باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از روش‌های Culture-Co, Layer Double Modified و aggregation-Co مورد بررسی قرار گرفت و سپس با استفاده از میکروسکوپ نیروی اتمی AFM تجمع پذیری باکتری‌های پروبیوتیک با باکتری بیماری‌زا مشاهده شد. در این تحقیق لاکتوباسیلوس‌های پروبیوتیکی جدا شده از ماست سنتی شهرستان سبزوار و نیز باکتری‌های استاندارد بیشترین اثر ضد میکروبی در کشت و تجمع سلولی با باکتری‌های بیماری‌زا سودوموناس *آئروژینوزا*، *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را نشان دادند اثر مهار رشد باکتری‌های بیماری‌زا در حضور باکتری‌های پروبیوتیک با استفاده از روش کشت همزمان مشاهده شد. آزمایش‌های انجام شده نشان داد که باکتری‌های پروبیوتیکی در این تحقیق توانایی جلوگیری از رشد باکتری‌های 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.

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, Mashreghi M, Bahraini M, Oroujalian F, Pardali P. *Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum* gene pooling of luxAB reporter gene in Iranian native plant pathogenic bacteria. J Anim Environ. 2011;25(4):426-34. (Persian)
13. Mashreghi 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

شده نیز مورد استفاده قرار داد که در این صورت با افزایش ترکیب های مؤثر در محیط، احتمالاً فعالیت ضد باکتریای نیز افزایش خواهد یافت. همچنین می توان از روش هایی مثل کروماتوگرافی نیز برای شناسایی ترکیب های مؤثر مترشح 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 ، باکتری ها را از جمله فاگوسیت ها و مولکول های سمی حفاظت می کند. باکتری های حامل ژن *lux* مولد بیوفیلم مانند *سراسیا مارسنس*، تحمل بیشتری نسبت به آنتی بیوتیک ها دارند که این مقاومت آنتی بیوتیکی مانعی برای درمان آن ها می باشد. 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 *سراسیا مارسنس* و احتمالاً 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 مطالعه ای 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 می گردد.

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.