

Research Paper

Evaluation of the Antimicrobial Ability of Probiotics Against Nosocomial Infections by Inhibiting Ompa Gene Expression in Acinetobacter Baumannii



Farangis Ghanipour¹, *Razieh Nazari¹, Seyed Soheil Aghaei¹, Parvaneh Jafari²

1. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
2. Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.



Citation:

Ghanipour F, Nazari R, Aghaei SS, Jafari P. [Evaluation of the Antimicrobial Ability of Probiotics Against Nosocomial Infections by Inhibiting Ompa Gene Expression in Acinetobacter Baumannii (Persian)]. *Journal of Arak University of Medical Sciences (JAMS)*. 2022; 25(5):854-867. <https://doi.org/10.32598/JAMS.24.6.6662.1>

<https://doi.org/10.32598/JAMS.24.6.6662.1>



Article Info:

Received: 25 Sep 2021

Accepted: 28 Dec 2021

Available Online: 01 Dec 2022

Keywords:

Acinetobacter baumannii, Biofilm, Probiotics

ABSTRACT

Background and Aim Acinetobacter baumannii causes various nosocomial infections and has a high antibiotic resistance. Probiotics can produce metabolites with antimicrobial properties. This study aims to evaluate the antimicrobial ability of probiotics against nosocomial pathogens by inhibiting the ompA gene expression effective in biofilm formation in Acinetobacter baumannii.

Methods & Materials The antimicrobial properties of probiotics against nosocomial pathogens were evaluated phenotypically. The polymerase chain reaction (PCR) technique was used to identify the ompA gene in Acinetobacter baumannii. After treatment with Bacillus licheniformis supernatant, the ompA gene expression was compared before and after treatment with real-time PCR technique.

Ethical Considerations This study was approved by the ethics committee of Islamic Azad University, Qom branch (Code: IR.IAU.QOM.REC.1398.004).

Results Among the study probiotics, Bacillus licheniformis supernatant had the best antimicrobial properties against nosocomial isolates of Acinetobacter baumannii A52, Acinetobacter baumannii ATCC19606, Kelebsiella pneumonia ATCC70063, and Pseudomonas aeruginosa PAO1. Bacillus licheniformis supernatant also significantly reduced the biofilm formation and ompA gene expression in Acinetobacter baumannii.

Conclusion Bacillus licheniformis can produce substances with antimicrobial and antibiofilm properties. It can be used for controlling the causative agents of nosocomial infections.

Extended Abstract

1. Introduction

Today, antimicrobial chemotherapy agents are used to control various infections; however, due to the emergence of antibiotic-resistant strains, researchers are looking for new solutions to solve this problem. In this regard, probiotics, including bacillus, have been more common [1, 2].

Nosocomial infection is one of the leading causes of death caused by antibiotic-resistant strains, including Acinetobacter baumannii [6, 7]. This bacterium is resistant to a wide range of antibiotics due to having properties that affect antibiotic resistance, including the ability to form strong biofilms [9, 10]. Outer membrane protein (ompA) plays an essential role in binding Acinetobacter baumannii to surfaces to form biofilms and causing antibiotic resistance [15, 16]. This study aims to identify the best probiotic with the ability to inhibit the growth and form a biofilm in Acinetobacter baumannii isolate with multiple

* Corresponding Author:

Razieh Nazari

Address: Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Tel: +98 (990) 2349712

E-mail: r.nazari1102002@gmail.com

antibiotic resistance by inhibiting the expression of ompA gene associated with biofilm formation in this isolate.

2. Materials and Methods

The resistance of *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium animalis*, *Pediococcus acidilactici* [20-22], *Bacillus subtilis*, *Bacillus coagulans*, and *Bacillus licheniformis* [32, 42] isolates to acidic conditions, and bile salts were investigated. Then, the antimicrobial properties of supernatant of all isolates against *Acinetobacter baumannii* (A52), *Acinetobacter baumannii* (ATCC19606), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC70063), and *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) hospital isolates were evaluated using the agar well diffusion method [23]. After determining the minimum inhibitory concentration (MIC) of *Bacillus licheniformis* supernatant against *A. baumannii* ATCC19606 and A52 [33], phenotypic inhibition of biofilm in these two strains was investigated and confirmed using the field emission scanning electron microscopy [53, 43]. In the next step, using the polymerase chain reaction (PCR) technique, the ompA gene effective in biofilm formation in *A. baumannii* A52 isolate was identified [13]. The expression of ompA gene was examined before and after treatment with *B. licheniformis* supernatant using the Real-Time PCR technique [73]. Finally, the PCR product of ompA gene in *A. baumannii* A52 isolate was sent to Pishgam Company for sequencing.

4. Results

In examining the resistance of isolates, the number of colonies counted in each isolate was more than 106 CFU/mL, and the inhibition coefficient of each isolate was <0.4. These results showed that all isolates were resistant to acids and bile salts. In studying the antimicrobial properties of supernatants extracted from all pro-

biotic isolates against pathogens *A. baumannii* A52, *A. baumannii* ATCC19606, *K. pneumoniae* ATCC70063, and *P. aeruginosa* PAO1, results showed that *B. licheniformis* isolate could inhibit the significant growth of these agents. The MIC of *B. licheniformis* isolate supernatant was 32 µg/mL. The *B. licheniformis* supernatant could reduce biofilm formation by 70% in *A. baumannii* A52 isolate. After performing PCR to investigate the presence of ompA gene in *A. baumannii* A52 isolate, a 578bp band was observed (Figure 1). Blast results showed that the sequence of PCR product of the ompA gene was 99.63% similar to the sequence of ompA in *A. baumannii* found in the National Center for Biotechnology and Information website. Evaluation of ompA gene expression using real-time PCR technique in *A. baumannii* before and after treatment with *B. licheniformis* supernatant showed that the expression of ompA gene was significantly decreased in *A. baumannii* ATCC19606 by 74.71% ($P<0.0001$) and in *A. baumannii* A52 by 69.72% ($P<0.0001$) (Figure 2).

5. Discussion and Conclusion

Nowadays, opportunistic pathogens, especially *A. baumannii*, in the hospital environment cause many health problems including nosocomial infections in people with weak immune systems due to the high resistance of antibiotics [38]. Given the importance of biofilm formation in developing this antibiotic resistance, the present study showed that the inhibition of ompA gene expression was effective in biofilm formation in *A. baumannii* after treatment with *B. licheniformis* supernatant compared to pre-treatment phase. In previous studies, researchers have used *B. licheniformis* supernatant to inhibit the growth and formation of biofilm pathogens, including *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* [39, 40]. In a similar study, considering the important role of ompA protein in creating antibiotic resistance

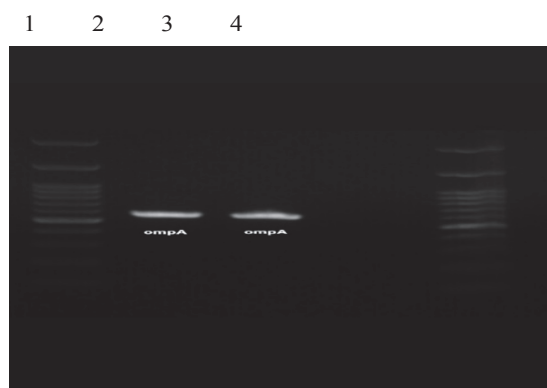


Figure 1. Amplification of ompA gene by PCR method

Lane 1: Ladder; lanes 2,3: ompA gene; lane 4: Negative control

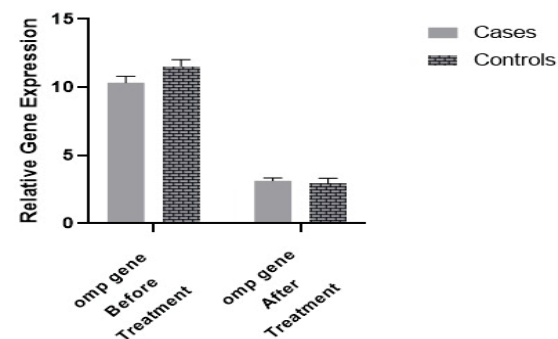


Figure 2. Comparison of changes in ompA gene expression before and after treatment with *B. licheniformis* supernatant in *A. baumannii* ATCC19606 strain (control) and *A. baumannii* A52 isolate (case)

in *A. baumannii*, it was attempted to inhibit *ompA* gene expression by chemical compounds. Finally, three compounds could inhibit the *ompA* gene expression, leading to a reduction in biofilm formation [44]. In another study, researchers used a plant-derived substance called Myrtenol to inhibit genes involved in biofilm formation, including *pgaA*, *ompA*, *bap*, *csu A/B*. They observed that, by suppression of these genes, the biofilm thickness was reduced in *A. baumannii* [45].

Based on the results of this novel study, it can be concluded that *B. licheniformis* has a good ability to inhibit the expression of *ompA* gene effective in biofilm formation in *A. baumannii* as a causative agent of nosocomial infections. The production of compounds with antimicrobial and anti-biofilm properties should be further identified in future studies. *B. licheniformis* can be used as a low-risk biomaterial to reduce the biofilm of pathogens with antibiotic resistance in therapeutic environments.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This research was approved by the Ethics Committee of the Faculty of Medical Sciences of Islamic Azad University of Qom (Code: IR.IAU.QOM.REC.1398.004).

Funding

This article was extracted from the PhD dissertation of the first author in the Department of Microbiology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Qom Branch.

Authors' contributions

All authors have contributed to the research and preparation of this article.

Conflicts of interest

According to the authors, this article has no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the personnel of Microbiology Research Laboratory, Islamic Azad University, Qom branch.

مقاله پژوهشی

بررسی قابلیت ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها علیه عوامل عفونت‌های بیمارستانی از طریق مهار بیان ژن ompA در اسپنتوباکتریومانی

فرنگیس غنی‌پور^۱، *راضیه نظری^۱، سید سهیل آقایی^۱، پروانه جعفری^۲

۱. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

۲. گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد اراک، دانشگاه آزاد اسلامی، اراک، ایران.

چکیده

مبینه و هدف: اسپنتوباکتریومانی عامل ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی و دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی بالایی است. پروبیوتیک‌ها دارای توانایی تولید متابولیت‌ها با خاصیت ضد میکروبی هستند. این پژوهش با هدف بررسی قابلیت ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها علیه عوامل بیماری‌زای بیمارستانی و توان آن‌ها در مهار بیان ژن پروتئین غشای خارجی A مؤثر در تشکیل بیوفیلم در اسپنتوباکتریومانی انجام شد.

مواد و روش‌ها: خاصیت ضد میکروبی پروبیوتیک‌ها علیه عوامل بیماری‌زای بیمارستانی از نظر فنوتیپی ارزیابی شد. با تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ژن پروتئین غشای خارجی A مؤثر در تشکیل بیوفیلم در اسپنتوباکتریومانی شناسایی شد. پس از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس با بیشترین خواص ضد میکروبی در بین پروبیوتیک‌های بررسی شده، بیان ژن پروتئین غشای خارجی A قبل و بعد از تیمار با تکنیک Real Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

ملاحظات اخلاقی: این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.QOM.REC.1398.004 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم رسید.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد در بین پروبیوتیک‌های مورد بررسی، سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس خاصیت ضد میکروبی بر علیه جدایه بیمارستانی اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A، اسپنتوباکتریومانی 19606ATCC، کلبسیلا پنومونیه 70063 ATCC و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 داشت. سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس باعث مهار قابل توجه بیوفیلم و کاهش بیان ژن پروتئین غشای خارجی A مؤثر در تشکیل بیوفیلم در اسپنتوباکتریومانی گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج این تحقیق نشان داد باسیلوس لیکنی فورمیس توانایی تولید مواد با خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلمی را داراست و در آینده می‌تواند یک گزینه مناسب در کنترل عوامل ایجادکننده عفونت‌های بیمارستانی در نظر گرفته شود.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۲۰ مهر ۱۴۰۰

تاریخ پذیرش: ۱۷ دی ۱۴۰۰

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۴۰۰

کلیدواژه‌ها:

اسپنتوباکتریومانی، بیوفیلم، پروبیوتیک

مقدمه

به عنوان یک روش درمانی در برخی از بیماری‌ها مورد استفاده قرار گرفته و کاربردهای وسیع‌تری نیز برای آن‌ها در آینده قابل پیش‌بینی است. گلناری و همکاران در یک مطالعه خاصیت ضد میکروبی سویه‌های باسیلوس را بر علیه پاتوژن‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک مورد بررسی قرار دادند و شاهد مهار رشد پاتوژن‌ها با استفاده از سوپرناتانت باسیلوس‌ها بودند [۵-۳]. عفونت بیمارستانی یکی از دلایل اصلی مرگ و میر و افزایش دوره نقاهت در بیماران است که اغلب توسط عوامل مقاوم به آنتی‌بیوتیک ایجاد می‌شود. اسپنتوباکتریومانی یک باسیل گرم منفی، هوازی مطلق، غیر تخمیری و بیماری‌زای فرصت‌طلب است که قادر به ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی از جمله پنومونی، باکتری،

امروزه عوامل شیمی درمانی ضد میکروبی به طور وسیعی برای کنترل عفونت‌های مختلف به کار گرفته می‌شوند. در حال حاضر، به دلیل پیدایش سویه‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها و اثرات جانبی آن‌ها استفاده از این داروها چندان رضایت‌بخش نیست. همواره محققین به دنبال یافتن راهکارهای جدید برای حل این مشکل هستند که در این راستا پروبیوتیک‌ها از اقبال خوبی برخوردار بوده‌اند [۲، ۱]. باکتری‌های پروبیوتیک از جمله باسیلوس‌ها با تولید انواع ترکیبات مهارکننده علیه گونه‌های باکتریایی گرم مثبت و گرم منفی خواص ضد میکروبی خود را اعمال می‌کنند و

* نویسنده مسئول:

دکتر راضیه نظری

نشانی: قم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی.

تلفن: ۲۳۴۹۷۱۲ (۹۹۰) +۹۸

پست الکترونیکی: r.nazari1102002@gmail.com



در آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد اراک تهیه شد. برای بررسی مقاومت به محیط اسیدی در جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم انیمالیس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتوسی [۲۲-۲۰]، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس و باسیلوس لیکنی فورمیس [۲۴، ۲۳] و با توجه به شرایط رشد متفاوت این جدایه‌ها، در ابتدا از هر جدایه سوسپانسیون میکروبی با غلظت حدود ۱۰۹ CFU/ml تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میکروبی به بافر فسفات سالین^۲ با حجم ۹ میلی‌لیتر و pH برابر با ۲ اضافه شد. برای تنظیم pH از HCL با غلظت ۰/۱ نرمال استفاده شد. به منظور شمارش تعداد باکتری موجود در سوسپانسیون میکروبی (یک واحد تشکیل کلنی)^۳ در زمان صفر، رقت سازی و کشت هر یک از رقت‌ها انجام و گرماگذاری شد (کنترل). در ادامه لوله‌های حاوی بافر فسفات سالین در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت گرماگذاری و سپس به محیط کشت انتقال داده و با توجه به شرایط رشد هر جدایه گرماگذاری و کلونی‌ها شمارش شد.

برای بررسی مقاومت جدایه‌ها به نمک‌های صفرای از روش گیلیند و والکر استفاده شد. در نهایت با استفاده از فرمول ضریب مهار که توسط گوپال و همکاران ارائه شده است، بازدارندگی رشد جدایه‌ها به وسیله نمک‌های صفرای اندازه‌گیری شد [۲۶، ۲۵].

استخراج سوپرناتانت

جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم انیمالیس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتوسی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس و باسیلوس لیکنی فورمیس با توجه به شرایط رشد اختصاصی خود کشت داده شده و سوپرناتانت آن استخراج شد [۲۹-۲۷]. سپس به منظور جداسازی پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی هر یک از سوپرناتانت‌های استخراج شده، به‌طور مجزا درون دکانتور با اتیل استات به نسبت ۱:۱ ترکیب و فاز رویی که حاوی اتیل استات و پپتیدها با خاصیت ضد میکروبی احتمالی بود، جداسازی شد. سپس اتیل استات با استفاده از روتاری^۴ خشک شد [۳۰].

بررسی خاصیت ضد میکروبی سوپرناتانت‌های استخراج شده علیه شاخص‌های بیماری‌زای بیمارستانی

برای بررسی خاصیت ضد میکروبی سوپرناتانت‌های استخراج شده از روش آگار ول دیفیوژن استفاده شد. در این روش از میکروارگانسیم‌هایی نظیر جدایه بیمارستانی اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (جداسازی شده توسط ساریخانی و همکاران از بیمارستان‌های قم [۳۱]،

عفونت مجاری ادراری و مننژیت در بخش‌های مختلف بیمارستان به‌ویژه بخش مراقبت ویژه است [۸-۶]. این باکتری به علت دارا بودن انواعی از عوامل مؤثر در مقاومت آنتی‌بیوتیکی در باکتری‌ها مانند پمپ‌های افلاکس، آنزیم‌های بتالاکتامازی و توانایی تشکیل بیوفیلم قوی، مقاومت‌های بالای آنتی‌بیوتیکی از خود نشان می‌دهند و مشکلات متعددی را در بیماران ایجاد می‌کند [۱۰]. توانایی تشکیل بیوفیلم در اسپنتوباکتر بومانی به‌عنوان یکی از فاکتورهای اصلی ویروالانس در نظر گرفته می‌شود که علاوه بر توانایی رشد در انواعی از محیط‌های بالینی و شرایط محیطی نامناسب، سبب افزایش مقاومت باکتری به عوامل ضد میکروبی و ایجاد عفونت در بیماران می‌شود [۱۲، ۱۱]. در باکتری‌های گرم منفی، یکی از فاکتورهای مؤثر در تشکیل بیوفیلم^۱، پروتئین غشای خارجی به نام پروتئین غشای خارجی A^۲ است که در سازگاری و ویروالانس این باکتری‌ها نقش مهمی دارد [۱۴، ۱۳]. پروتئین غشای خارجی A در اتصال اسپنتوباکتر بومانی به سطوح زنده و غیر زنده برای تشکیل بیوفیلم نقش دارد و باعث پایداری بیوفیلم و ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی می‌شود [۱۶، ۱۵]. با باپور و همکاران با بررسی ارتباط بین مقاومت آنتی‌بیوتیکی و حضور ژن پروتئین غشای خارجی A در اسپنتوباکتر بومانی به این نتیجه رسیدند که تمامی سویه‌های اسپنتوباکتر بومانی جدا شده از نمونه‌های بالینی که دارای مقاومت‌های چندگانه آنتی‌بیوتیکی بودند دارای ژن پروتئین غشای خارجی A هستند [۱۷] نای و همکاران در یک پژوهش عنوان کردند پروتئین غشای خارجی A دارای فعالیت‌های بیولوژیکی متنوع مانند اتصال به سلول‌های اپی تلیال میزبان، القای مرگ سلول و دخالت در خارج کردن ترکیبات از فضای پری پلاسمی است [۱۹، ۱۸]. بنابراین به دلیل افزایش مقاومت‌های آنتی‌بیوتیکی در اسپنتوباکتر بومانی مهار تشکیل بیوفیلم از طریق مهار بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلم و متعاقباً افزایش حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار باشد. این پژوهش با هدف شناسایی بهترین پروبیوتیک با توانایی مهار رشد و تشکیل بیوفیلم در جدایه اسپنتوباکتر بومانی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه از طریق مهار بیان ژن پروتئین غشای خارجی A مرتبط با تشکیل بیوفیلم در این جدایه انجام شد.

مواد و روش‌ها

بررسی مقاومت جدایه‌ها به اسید و نمک‌های صفرای

مطالعه حاضر به‌صورت آزمایشگاهی انجام شد. جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم انیمالیس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتوسی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس و باسیلوس لیکنی فورمیس از دکتر پروانه جعفری

3. Phosphate-Buffered Saline (PBS)

4. Colony-Forming Unit (CFU)

5. Rotary Heidolph Germany

1. Biofilm

2. Outer membrane protein A

بررسی فنوتیپی مهار بیوفیلیم در اسپیتوباکتریومانی

در مرحله بعد برای بررسی فنوتیپی مهار بیوفیلیم با استفاده از باکتری‌های اسپیتوباکتریومانی 19606ATCC به‌عنوان کنترل و جدایه اسپیتوباکتریومانی ۵۲ A سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه و به درون هر چاهک از میکروپلیت ۹۶ خانه ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون میکروبی اضافه و بر اساس غلظت ساب حداقل غلظت مهار رشد به دست آمده به درون هر چاهک سوپرناتانت جدایه باسیلوس لیکنی فورمیس اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در مرحله بعد به هر چاهک کریستال ویوله ۱ درصد اضافه شد و بعد از ۲۰ دقیقه چاهک‌ها با الکل اتانول شستشو داده شد. سپس جذب چاهک‌ها با استفاده از دستگاه الیزا^۱ ریدر مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، میزان مهار بیوفیلیم طبق فرمول شماره ۱ محاسبه شد [۳۴]. با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روشی نشر میدانی^۲ توانایی تشکیل بیوفیلیم در جدایه اسپیتوباکتریومانی ۵۲ A و مهار تشکیل بیوفیلیم در این جدایه بعد از تیمار با حداقل غلظت مهار کنندگی سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس مورد بررسی قرار گرفت [۳۵].

$$1. \text{مهار بیوفیلیم} = \frac{\text{کنترل OD} - \text{OD نمونه}}{\text{OD کنترل}} \times 100$$

شناسایی ژن پروتئین غشای خارجی A مؤثر در تشکیل بیوفیلیم در اسپیتوباکتریومانی

استخراج ژنوم

برای شناسایی پروتئین غشای خارجی A در ابتدا ژنوم جدایه اسپیتوباکتریومانی ۵۲ A با استفاده از روش جوشاندن استخراج شد [۳۱].

پرایمر مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

پرایمر اختصاصی مورد استفاده برای شناسایی ژن پروتئین غشای خارجی A در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

7. ELISA plate reader Biotech U.S.A

8. Field Emission Scanning Electron Microscope (FESEM)

اسپیتوباکتریومانی 19606 ATCC، کلبسیلا پنومونیه 70063 ATCC و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 به‌عنوان شاخص‌های بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی استفاده شد. برای این منظور ابتدا از هر یک از میکروارگانیسم‌های مذکور، سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه شد. حجم ۶۰ میکرولیتر از آن بر روی سطح مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) انتقال و به‌صورت سفره‌ای کشت داده شد. سپس با استفاده از پپیت پاستور دو چاهک ایجاد شد، ته هر یک از چاهک‌ها با استفاده از سافت آگار پوشیده شد و به یکی از چاهک‌ها ۵۰ میکرو لیتر اتیل استات به‌عنوان کنترل و به چاهک دیگر ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت جدایه اضافه و روی چاهک‌ها نیز با سافت آگار پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. در مرحله بعد هاله‌های عدم رشد میکروارگانیسم‌ها در محیط مولر هینتون آگار در صورت مشاهده اندازه‌گیری شد. این بخش از روش کار به دلیل احتمال خطا برای هر جدایه ۳ بار تکرار شد [۳۲].

تعیین حداقل غلظت مهار رشد^۳

از روش میکرودیالوژن برای تعیین حداقل غلظت مهار رشد استفاده شد. در این روش از باکتری‌های اسپیتوباکتریومانی 19606ATCC به عنوان کنترل و جدایه اسپیتوباکتریومانی ۵۲ A استفاده گردید. ۵۰ میکرولیتر محیط مولر هینتون برات^۴ به تمام چاهک‌های میکروپلیت اضافه شد. سپس در چاهک اول ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت جدایه باسیلوس لیکنی فورمیس با غلظت ۲۰۴۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر (وزن خشک سوپرناتانت) اضافه شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از چاهک اول برداشته به چاهک دوم و به همین ترتیب تا چاهک ۱۰ که ۵۰ میکرولیتر دور ریخته شد. ۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت به چاهک ۱۲ اضافه و چاهک ۱۱ کنترل مثبت و چاهک ۱۲ کنترل منفی در گرفته شد. با استفاده از باکتری‌های مذکور، سوسپانسیون نیم مک فارلند تهیه و به چاهک‌های ۱ تا ۱۱ مقدار ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی اضافه شد. غلظت چاهک‌ها به ترتیب ۱۰۲۴-۵۱۲-۲۵۶-۱۲۸-۶۴-۳۲-۱۶-۸-۴-۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. سپس میکروپلیت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد. چاهک قبل از حداقل غلظت مهار رشد محسوب می‌شود [۳۳].

6. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

جدول ۱. پرایمر اختصاصی مورد استفاده در PCR

نام ژن	توالی (۳'→۵')	سایز محصول	رفرنس
ompA-For	GTAAAGGCGACGTAGACG	۵۷۸ bp	۱۴
ompA-Rev	CCAGTGTATCTGTGTGACC		۱۴



جدول ۲. پرایمرهای اختصاصی مورد استفاده در PCR Time Real

نام ژن	توالی (۳'→۵')	سایز محصول	رفرنس
ompA-For	TGCTCTGTAGTAGAAGTTGCTCC	۲۰۸ bp	تحقیق حاضر
ompA-Rev	TGTGTGACCTTCGATACGTGC		تحقیق حاضر
16srDNA-For	GTAATACAGAGGGTGCGAGCGTT	۱۸۰ bp	[۱۱]
16srDNA-Rev	TCTAGCTGACCAGTATCGAATGCA		[۱۱]



ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرماگذاری شد.

استخراج RNA^{۱۱} از جدایه اسپیتوباکتریومانی A ۵۲ و سنتز cDNA

برای این منظور از باکتری‌های اسپیتوباکتریومانی 19606ATCC به‌عنوان کنترل و جدایه اسپیتوباکتریومانی A ۵۲، قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج^{۱۲} RNA مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، انجام شد و با دستگاه نانودراپ^{۱۳} (برای جلوگیری از خطای احتمالی پس از قرار دادن هر نمونه روی حسگر و اتمام سنجش، حسگر با کاغذ صافی تمیز شد) مورد بررسی قرار گرفت. برای سنتز cDNA از کیت (BIOFACT کشور کره جنوبی) مطابق دستورالعمل شرکت سازنده، استفاده شد. این مرحله در حضور رندوم هگزامر پرایمر، آنزیم ترانس کریپتاز معکوس و مخلوط دنوکسی نوکلئوزید تری‌فسفات و بر طبق برنامه دمایی ۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۶۰ دقیقه در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، ۵ دقیقه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

انجام Real Time PCR با روش سایبرگرین

به منظور انجام Real Time PCR با روش سایبرگرین، ۶ میکرولیتر cDNA، ۵/۱۲ میکرولیتر مستر میکس 2X سایبر ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد و ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس اختصاصی ژن پروتئین غشای خارجی A که در جدول شماره ۲ ارائه شده است، در واکنش Real Time PCR وارد شد [۳۶]. واکنش با برنامه حرارتی دستگاه ریل تایم^{۱۴} (Roche کشور آلمان) شامل دناتوراسیون اولیه به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون به مدت ۱۰ ثانیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی به مدت ۲۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، تکثیر به مدت ۲۵ ثانیه در دمای

ترکیب مواد و برنامه حرارتی مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۳/۵ میکرولیتر مستر میکس 2X، ۱ میکرولیتر پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر پرایمر ریورس، ۱۰۰ نانوگرم ژنوم اسپیتوباکتریومانی و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل انجام شد. سپس با استفاده از دستگاه ترموسایکلر^۹ برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه ۴ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، دناتوراسیون ۱ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد، اتصال پرایمر اختصاصی ژن پروتئین غشای خارجی A به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد، تکثیر به مدت ۱ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲۵ سیکل و تکثیر نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در ادامه محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، بر روی آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد (چاهک ۴ کنترل منفی) و با استفاده از دستگاه ژل داگ^{۱۰} مورد بررسی قرار گرفت [۳۱]. در نهایت، محصول حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن پروتئین غشای خارجی A در جدایه اسپیتوباکتریومانی A ۵۲ برای تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد.

بررسی بیان ژن موثر در تشکیل بیوفیلم (ژن پروتئین غشای خارجی A) در اسپیتوباکتریومانی

برای بررسی بیان ژن در ابتدا حضور ژن پروتئین غشای خارجی A در جدایه اسپیتوباکتریومانی A ۵۲ با استفاده از تکنیک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مورد تأیید قرار گرفت. سپس بیان ژن پروتئین غشای خارجی A در باکتری‌های اسپیتوباکتریومانی 19606ATCC به‌عنوان کنترل و جدایه اسپیتوباکتریومانی A با استفاده از تکنیک Real Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تیمار سوسپانسیون جدایه اسپیتوباکتریومانی A ۵۲، این سوسپانسیون همراه با حداقل غلظت مهارکنندگی بیوفیلم از سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس با هم ترکیب شده و ۲۴

11. Ribonucleic Acid

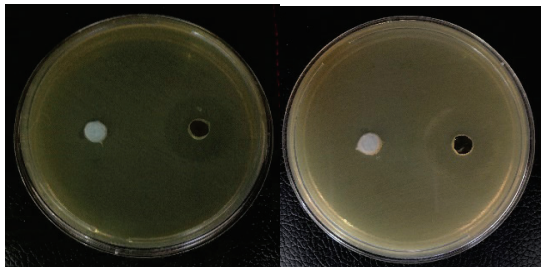
12. BIOFACT (کشور کره جنوبی)

13. Nano Drop Thermo Fisher Scientific

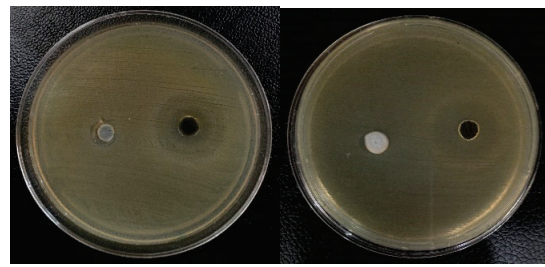
14. Real-Time PCR Roche Germany

9. PCR thermal cycler Eppendorf Germany

10. Uvitec gel documentation U.S.A



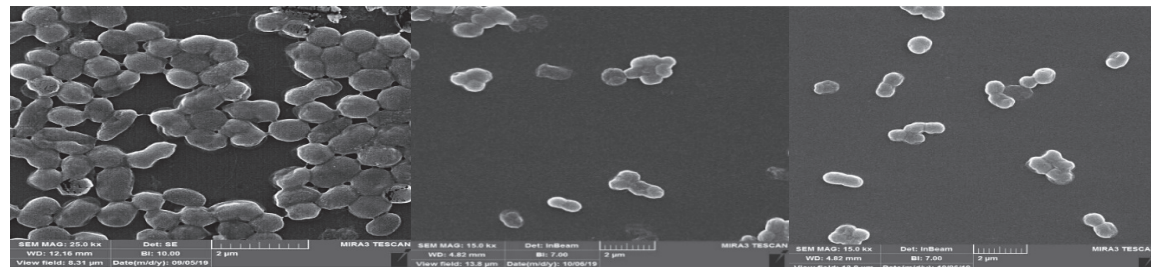
سودوموناس آئروژینوزا کلبسیلا پنومونیه



اسیتوباکتریومانی استاندارد اسیتوباکتریومانی A52



تصویر ۱. مهار رشد عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی توسط سوپرناتانت استخراج‌شده از باسیلوس لیکنی فورمیس در مقایسه با چاهک کنترل



تصویر ۲. عکس میکروسکوپ الکترونی (FE-SEM) از تشکیل بیوفیلم و مهار تشکیل بیوفیلم در جدایه اسیتوباکتریومانی A52 قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس

اینمالیس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس و باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی رشد عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی نظیر جدایه بیمارستانی اسیتوباکتریومانی A52 با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه (جداسازی شده توسط ساریخانی و همکاران از بیمارستان‌های قم)، اسیتوباکتریومانی ATCC 19606، کلبسیلا پنومونیه ATCC 70063 و سودوموناس آئروژینوزا PAO1 نشان داد رشد این عوامل در اطراف چاهک دارای سوپرناتانت استخراج شده از باسیلوس لیکنی فورمیس بیش از سایر جدایه‌های مورد بررسی، در مقایسه با چاهک کنترل (اتیل استات) به طور قابل توجهی مهار شده است که نتایج آن در جدول شماره ۳ ارائه شده است (تصویر شماره ۱).

نتایج حاصل از حداقل غلظت مهار رشد نشان داد حداقل غلظت

۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۴۵ سیکل انجام شد (به دلیل احتمال خطه این بخش از روش کار برای هر نمونه دوبار تکرار شد).

یافته‌ها

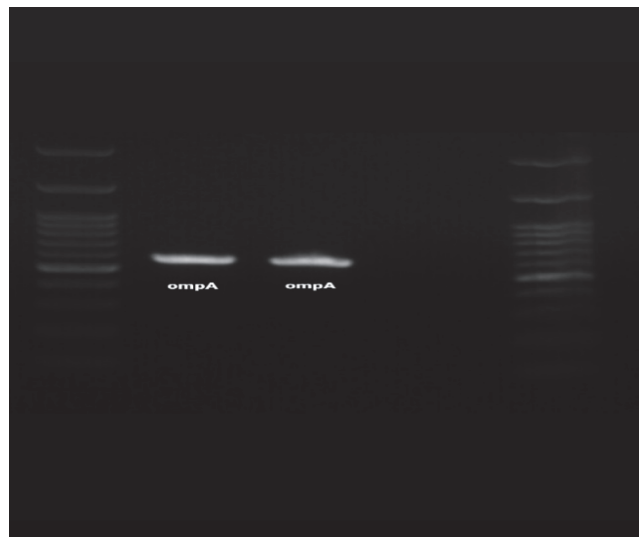
در بررسی مقاومت جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم اینمالیس، پدیوکوکوس اسیدی لاکتیسی، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس و باسیلوس لیکنی فورمیس تعداد کلونی‌های شمارش شده هر جدایه بیشتر از CFU/۱۰^۶ ml بود و ضریب بازدارندگی تمام جدایه‌ها کمتر از ۰/۴ بود. این نتایج نشان داد تمامی جدایه‌ها به اسید و نمک‌های صفراوی مقاوم بوده و دارای این ویژگی‌های پروبیوتیکی هستند. در مرحله بعد، بررسی خاصیت ضد میکروبی سوپرناتانت‌های استخراج شده از جدایه‌های لاکتوباسیلوس رامنوسوس، بیفیدوباکتریوم

جدول ۳. نتایج بررسی مهار رشد عوامل بیماری‌زای بیمارستانی با روش Agar well diffusion بر اساس میانگین و انحراف معیار

عنوان	میانگین قطر هاله‌ها	انحراف از معیار
اسیتوباکتریومانی A52	۱۵ میلی‌متر	۰/۸۱۶۴۹۷
اسیتوباکتریومانی استاندارد	۱۶ میلی‌متر	۰/۸۱۶۴۹۷
سودوموناس آئروژینوزا	۱۵/۳۳۳۳۳۳ میلی‌متر	۰/۴۷۱۴۰۵
کلبسیلا پنومونیه	۱۵/۳۳۳۳۳۳ میلی‌متر	۰/۴۷۱۴۰۵



1 2 3 4



تصویر ۳. نتایج تکثیر ژن پروتئین غشای خارجی A با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز: ستون ۱ لدر، ستون ۲ و ۳ ژن پروتئین غشای خارجی A، ستون ۴ کنترل منفی

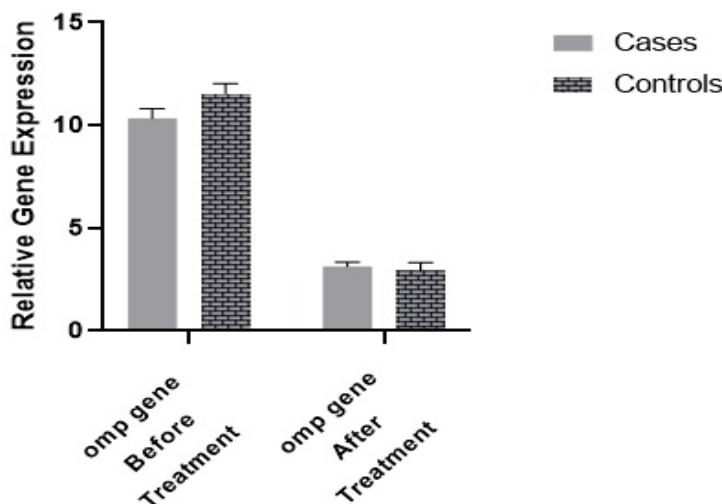
select all 100 sequences selected

GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain UPAB1 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP032215.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain TG29392 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP039930.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain TG31302 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP039343.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain TG31986 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP039341.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain AB046 chromosome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP037872.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain AR_0052 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP027183.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain AR_0070 chromosome, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP027178.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain ab736, complete genome	979	979	96%	0.0	99.63%	CP015121.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain B-1394A OmpA (ompA) gene, partial cds	979	979	96%	0.0	99.63%	KJ363323.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain C186 outer-membrane porin (ompA) gene, partial cds	979	979	96%	0.0	99.63%	KF195968.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii partial ompA gene for outer membrane protein A, isolate VA 804/03	979	979	96%	0.0	99.63%	AM902101.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii ATCC 19606 outer membrane protein A (ompA) gene, complete cds	979	979	96%	0.0	99.63%	AY485227.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain PG20180064 chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP043180.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii ATCC 17978 substr. Lab-WT chromosome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP039028.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii ATCC 17978 substr. PMR-High chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP039025.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii ATCC 17978 substr. PMR-Low chromosome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP039023.2
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain VB16141 chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP040050.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain FDAARGOS_540 chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP033754.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain DS002 chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP027704.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain B11911 chromosome, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP021345.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain AB042, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP019034.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain ATCC 17978, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP018664.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii ATCC 17978-mff, complete genome	974	974	96%	0.0	99.44%	CP012004.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii DNA, complete genome, strain: IOMTU 433	974	974	96%	0.0	99.44%	AP014649.1
<input checked="" type="checkbox"/> Acinetobacter baumannii strain JCM 6841 outer membrane protein-like mRNA, partial sequence	974	974	96%	0.0	99.44%	EU049489.1



تصویر ۴. نتیجه حاصل از بلاست توالی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز ژن پروتئین غشای خارجی A در سایت NCBI



تصویر ۵. مقایسه تغییرات در بیان ژن پروتئین غشای خارجی A قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس، در سویه اسپنتوباکتریومانی 19606ATCC (کنترل) و جدایه اسپنتوباکتریومانی A ۲۵ (آزمایش)

جدایه اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A (آزمایش) به میزان ۶۹/۷۲ درصد با $P < 0.0001$ کاهش معناداری داشته است (تصویر شماره ۵).

بحث

امروزه پاتوژن‌های فرصت طلب ESKAPE (انتروکوکوس فاسیوم، استافیلوکوکوس اورئوس، کلبسیلا پنومونیه، اسپنتوباکتریومانی، سودوموناس آئروژینوزا، انتروباکتر) در محیط بیمارستان در افراد با سیستم ایمنی ضعیف با ایجاد انواع عفونت‌های بیمارستانی، مشکلات متعددی را در حوزه سلامت ایجاد می‌کنند. در میان این پاتوژن‌ها، اسپنتوباکتریومانی به دلیل مقاومت بالای آنتی‌بیوتیکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است [۳۷]. در مطالعه حاضر مهار چشمگیر رشد عوامل بیماری‌زای فرصت‌طلب بیمارستانی نظیر اسپنتوباکتریومانی A 52 ATCC اسپنتوباکتریومانی 19606 ATCC، کلبسیلا پنومونیه 70063 ATCC، سودوموناس آئروژینوزا و مهار ۷۰ درصدی تشکیل بیوفیلم در اسپنتوباکتریومانی با استفاده از سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس مشاهده شد. در یک مطالعه مشابه که توسط کارلی و همکاران انجام شد [۳۸]، خاصیت ضد بیوفیلمی سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس بر روی جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی قرار گرفت و مهار تشکیل بیوفیلم در این دو باکتری در حضور سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس گزارش شد که با نتایج تحقیق حاضر هم‌خوانی دارد. دوسان و همکاران [۵] در پژوهشی تلاش کردند با استفاده از باسیلوس لیکنی فورمیس در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های بیماری‌زا اختلال ایجاد کنند. آن‌ها موفق به جداسازی پروتئینی شدند که قادر به کاهش تشکیل

مهارکنندگی سوپرناتانت جدایه باسیلوس لیکنی فورمیس، غلظت ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر است. همچنین نتایج بررسی مهار فنوتیپی بیوفیلم نشان داد سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس قادر است تشکیل بیوفیلم در جدایه اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A را به میزان ۷۰ درصد کاهش دهد. نتایج بررسی تشکیل بیوفیلم در جدایه اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس با میکروسکوپ الکترونی، تفاوت چشمگیری در مهار تشکیل بیوفیلم بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس را نشان داد (تصویر شماره ۲).

در نتایج حاصل از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای بررسی حضور ژن پروتئین غشای خارجی A در جدایه اسپنتوباکتریومانی ۵۲ A یک باند 578 bp مشاهده شد (تصویر شماره ۳). توالی نوکلئوتیدی خوانده شده مربوط به محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در سایت مرکز ملی بیوتکنولوژی و اطلاعات^{۱۵} تحت آنالیز بلاست قرار گرفت. نتایج حاصل از بلاست نشان داد توالی محصول واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به ژن پروتئین غشای خارجی A، ۹۹/۶۳ درصد با توالی ژن پروتئین غشای خارجی A در سویه اسپنتوباکتریومانی موجود در سایت مرکز ملی بیوتکنولوژی و اطلاعات تشابه دارد (تصویر شماره ۴).

ارزیابی بیان ژن پروتئین غشای خارجی A با استفاده از تکنیک Real Time PCR در اسپنتوباکتریومانی قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت جدایه باسیلوس لیکنی فورمیس، نشان داد بیان ژن پروتئین غشای خارجی A در سویه اسپنتوباکتریومانی استاندارد ۱۹۶۰۶ (کنترل) به میزان ۷۴/۷۱ درصد با $P < 0.0001$ و در

15. National Center for Biotechnology and Information (NCBI)

که با نتایج مطالعات ذکر شده نیز همخوانی دارد، نشان دهنده این حقیقت است که با دستیابی به ترکیب یا ترکیباتی برای کاهش بیان ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلیم به دلیل اهمیت آن در مقاومت آنتی‌بیوتیکی باکتری‌های بیماری‌زاه، می‌توان موفق به کنترل این عوامل شد. بنابراین در مطالعه حاضر، مشخص شد باسیلوس لیکنی فورمیس با کاهش بیان ژن پروتئین غشای خارجی A و احتمالاً کاهش بیان سایر ژن‌های مؤثر در تشکیل بیوفیلیم در اسپنتوباکتر بومانی که نیاز به بررسی دارند، خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی خود را اعمال کرده است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه برای اولین بار در دنیا نشان داد باسیلوس لیکنی فورمیس توانایی مناسبی در جهت مهار بیان ژن مؤثر در تشکیل بیوفیلیم در اسپنتوباکتر بومانی، به‌عنوان یک عامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی را دارد. با توجه به پتانسیل بالای باسیلوس لیکنی فورمیس در تولید ترکیبات با خاصیت ضد میکروبی و ضد بیوفیلیمی پیشنهاد می‌شود در تحقیقات آینده این ترکیبات مورد شناسایی بیشتر قرار گرفته و به‌عنوان مواد زیستی کم‌خطر برای کاهش بیوفیلیم عوامل بیماری‌زای دارای مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط‌های درمانی مورد استفاده قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این پژوهش با کد اخلاق IR.IAU.QOM.REC.1398.004 به تصویب کمیته اخلاق دانشکده علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم رسید.

حامی مالی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی نویسنده اول در گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم است.

مشارکت نویسندگان

تمامی اعضای نویسندگان در پژوهش و آماده‌سازی این مقاله مشارکت داشته‌اند.

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، این مقاله تعارض منافع ندارد.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم آزمایشگاه تحقیقاتی میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم تشکر و قدردانی می‌شود.

بیوفیلیم در جدایه‌های کانیدیا آلبیکانس و سودوموناس آئروژینوزا شد. همچنین ابوسایم و همکاران در یک مطالعه نشان دادند [۳۹] که با استفاده از اگزوپلی ساکارید خالص سازی شده از جدایه باسیلوس لیکنی فورمیس، مهار بیوفیلیم در باکتری‌های بیماری‌زا رخ داده است. نتایج مطالعات ذکر شده، پتانسیل بالای باسیلوس لیکنی فورمیس در مهار بیوفیلیم عوامل بیماری‌زا را نشان می‌دهد با نتایج حاصل از تحقیق حاضر مبنی بر مهار بالای تشکیل بیوفیلیم در اسپنتوباکتر بومانی با استفاده از سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس مطابقت دارد. سپس در مطالعه حاضر ژن پروتئین غشای خارجی A، در جدایه بیمارستانی اسپنتوباکتر بومانی ۵۲ A با مقاومت آنتی‌بیوتیکی چندگانه با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شناسایی شد. در یک مطالعه الشامیری و همکاران [۱۰] با بررسی حضور ژن پروتئین غشای خارجی A در جدایه‌های بالینی اسپنتوباکتر بومانی با مقاومت آنتی‌بیوتیکی MDR و XDR با استفاده از روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز، مشاهده کردند این ژن در میان این جدایه‌ها حضور دارد. اسکرینسکیت و همکاران پاسخ سیستم ایمنی موش ۷۴٪ علیه سوبه‌های اسپنتوباکتر بومانی واجد و فاقد ژن پروتئین غشای خارجی A را مورد بررسی قرار دادند [۴۰] و مشاهده کردند که سیستم ایمنی موش بر علیه سوبه‌های فاقد این ژن، پاسخ التهابی کمتری ایجاد می‌کند. با توجه به مطالعات ذکر شده، اهمیت ژن پروتئین غشای خارجی A در بیماری‌زایی اسپنتوباکتر بومانی تأیید می‌شود. از این‌رو، در مطالعه حاضر، مهار بیان این ژن با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس مورد بررسی قرار گرفت. بررسی بیان ژن پروتئین غشای خارجی A قبل و بعد از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس با استفاده از تکنیک Real Time PCR نشان داد بیان ژن پروتئین غشای خارجی A در جدایه اسپنتوباکتر بومانی ۵۲ A پس از تیمار با سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس در مقایسه با بیان این ژن قبل از تیمار، ۶۹/۷۲ درصد کاهش یافته است. در یک پژوهش نا و همکاران [۴۱] با در نظر گرفتن نقش مهم پروتئین غشای خارجی A در ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی در اسپنتوباکتر بومانی، تلاش کردند با استفاده از ترکیبات شیمیایی بیان ژن پروتئین غشای خارجی A را مهار کنند. در نهایت از میان ترکیبات مختلف موفق به شناسایی ۳ ترکیب شیمیایی شدند که با مهار بیان ژن پروتئین غشای خارجی A منجر به کاهش تشکیل بیوفیلیم در این باکتری شد. در مطالعه‌های دیگر سلواراج و همکاران [۴۲] با استفاده از ماده استخراج شده از گیاه به نام میرتنول، توانستند ژن‌های مرتبط با تشکیل بیوفیلیم از جمله *csuA/B*, *ompA*, *pgaA* را مهار کنند. این دانشمندان مشاهده کردند که با سرکوب این ژن‌ها بیوفیلیم نازک‌تری در اسپنتوباکتر بومانی ایجاد شده است. نتایج تحقیق کنونی مبنی بر کاهش بیان ژن پروتئین غشای خارجی A در اسپنتوباکتر بومانی با کمک سوپرناتانت باسیلوس لیکنی فورمیس و تأثیر آن در کاهش تشکیل بیوفیلیم در این باکتری

References

- [1] Kyriakidis I, Vasileiou E, Dorothea Pana Z, Tragiannidis A. Acinetobacter baumannii antibiotic resistance mechanisms. *Pathogens*. 2021; 10(3):373. [DOI:10.3390/pathogens10030373] [PMID] [PMCID]
- [2] Girijaa V, Malaikozhundana B, Vaseeharana B, Vijayakumara S, Gobia N, Del Valle Herrera M, et al. In vitro antagonistic activity and the protective effect of probiotic *Bacillus licheniformis* Dahb1 in zebra fish challenged with GFP tagged *Vibrio parahaemolyticus* Dahv2. *Microb Pathog*. 2018; 114:274-80. [DOI:10.1016/j.micpath.2017.11.058] [PMID]
- [3] Golnari Maranni M, Rabbani Khourasgani M, Asadollahi MA, Shafiei R. [Evaluation of antimicrobial activity of bacillus strains isolated from various resources (Persian)]. *J Arak Med Univ J*. 2017; 19(116):68-78. <http://jams.arakmu.ac.ir/article-1-4673-fa.pdf>
- [4] Shahrestan F, Jafari P, Gharebaghi A, Khani Farahani I, Shahrestan E. [Effect of bioflora and cinnamon extract consumption on dyslipidemia and cardiovascular disease in a diabetic rat model (Persian)]. *J Arak Univ Med Sci*. 2020; 23(2):198-208. [DOI:10.32598/JAMS.23.2.5997.1]
- [5] Dusane DH, Damare SR, Nancharaiah YV, Ramaiah N, Venugopalan VP, Kumar AR, et al. Disruption of microbial biofilms by an extracellular protein isolated from epibiotic tropical marine strain of *Bacillus licheniformis*. *PLoS One*. 2013; 8(5):e64501. [DOI:10.1371/journal.pone.0064501] [PMID] [PMCID]
- [6] Pompilio A, Scribano D, Sarshar M, Bonaventura GD, Palamara AT, Ambrosi C. Gram-negative bacteria holding together in a biofilm: The *Acinetobacter baumannii* way. *Microorganisms*. 2021; 9(7):1353. [DOI:10.3390/microorganisms9071353] [PMID] [PMCID]
- [7] Rouhi V, Safarkar R, Habibi S. Phenotypic investigation of biofilm formation and determination of presence of *bap* and *bla*OXA-51 genes in *Acinetobacter baumannii* from clinical specimens in Tehran. *Iran J Med Microbiol*. 2020; 14(6):566-83. <https://ijmm.ir/article-1-1110-fa.pdf> [DOI:10.30699/ijmm.14.6.566]
- [8] Saleh Nia A, Nojoomi F. [Phenotypic study of extended-spectrum beta lactamase (ESBL) producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in patients referred to a military hospital in guilan province (Persian)]. *Iran J Biol*. 2019; 32(4):454-8. https://cell.ijbio.ir/article_1301.html
- [9] Mea HJ, Yong PV, Wong EH. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. *Microbiol Res*. 2021; 247:126722. [DOI:10.1016/j.micres.2021.126722] [PMID]
- [10] Al-Shamiri MM, Zhang S, Mi P, Liu Y, Xun M, Yang E, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of *Acinetobacter baumannii* enrolled in the relationship among antibiotic resistance, biofilm formation and motility. *Microb Pathog*. 2021; 155:104922. [DOI:10.1016/j.micpath.2021.104922] [PMID]
- [11] Luo L, Wu L, Xiao Y, Zhao D, Chen Z, Kang M, et al. Enhancing pili assembly and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 using non-native acyl-homoserin lactones. *BMC Microbiol*. 2015; 15:62. [DOI:10.1186/s12866-015-0397-5] [PMID] [PMCID]
- [12] Colquhoun J, Rather P. Insights into mechanisms of biofilm formation in *Acinetobacter baumannii* and implications for uropathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; 10:253. [DOI:10.3389/fcimb.2020.00253] [PMID] [PMCID]
- [13] Li Z, Ding Z, Liu Y, Jin X, Xie J, Li T, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Infect Drug Resist*. 2021; 14:2613-24. [DOI:10.2147/IDR.S310081] [PMID] [PMCID]
- [14] Azizi O, Shahcheraghi F, Salimizand H, Modarresi F, Shakibaie M, Mansouri SH, et al. Molecular analysis and expression of *bap* gene in biofilm-forming multi-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Rep Biochem Mol Biol*. 2016; 5(1):62-72. [PMCID]
- [15] Mozafari H, Mirkalantari SH, Sadeghi Kalani B, Amirzofazari N. Prevalence determination of virulence related and biofilm formation genes in *Acinetobacter baumannii* isolates from clinical respiratory samples in Imam khomeini hospital, Tehran, Iran 2018. *Iran J Med Microbiol*. 2021; 15(3):266-80. [DOI:10.30699/ijmm.15.3.266]
- [16] Uoalapati SR, Sett A, Pathania R. The outer membrane proteins *ompA*, *carO*, and *oprD* of *Acinetobacter baumannii* confer a two-pronged defense in facilitating its success as potent human pathogen. *Front Microbiol*. 2020; 11:589234. [DOI:10.3389/fmicb.2020.589234] [PMID] [PMCID]
- [17] Babapour E, Haddadi A, Mirnejad R, Angaji SA, Amirzofazari N. Study of drug resistance and *ompA* gene existence in clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *Iran J Med Microbiol*. 2017; 11(1):30-8. <https://ijmm.ir/article-1-568-en.html>
- [18] Lee HW, Koh YM, Kim J, Lee JC, Lee YC, Seol SY, et al. Capacity of multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(1):49-54. [DOI:10.1111/j.1469-0691.2007.01842.x] [PMID]
- [19] Nie D, Hu Y, Chen Z, Li Z, Hou Z, Luo X, et al. Outer membrane protein *a* (*OmpA*) as a potential therapeutic target for *Acinetobacter baumannii* infection. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1):26. [DOI:10.1186/s12929-020-0617-7] [PMID] [PMCID]
- [20] Jang HJ, Son S, Kim JA, Jung MY, Choi YJ, Kim DH, et al. Characterization and functional test of canine probiotics. *Front Microbiol*. 2021; 12:625562. [DOI:10.3389/fmicb.2021.625562] [PMID] [PMCID]
- [21] Awasti N, Tomar SK, Pophaly SD, Poonam, Lule VK, Singh TP, et al. Probiotic and functional characterization of bifidobacteria of Indian human origin. *J Appl Microbiol*. 2016; 120(4):1021-32. [DOI:10.1111/jam.13086] [PMID]
- [22] Diguta CF, Nitoi GD, Matei F, Luta G, Cornea CP. The biotechnological potential of *Pediococcus* spp. isolated from kombucha microbial consortium. *Foods*. 2020; 9(12):1780. [DOI:10.3390/foods9121780] [PMID] [PMCID]
- [23] Belviso S, Giordano M, Dolci P, Zeppa G. In vitro cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus paracasei* strains isolated from the Italian castelmagno PDO cheese. *Dairy Sci Technol*. 2009; 89(2):169-76. [DOI:10.1051/dst/2009004]
- [24] Bacha K, Mehari T, Ashenafi M. In-vitro probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from wakalim, a traditional Ethiopian fermented beef sausage. *Ethiop J Health Sci*. 2009; 19(1):21-7. <https://www.ajol.info/index.php/ejhs/article/view/145938>
- [25] Gilliland SE, Walker DK. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J Dairy Sci*. 1990; 73(4):905-11. [DOI:10.3168/jds.S0022-0302(90)78747-4]
- [26] Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol*. 2001; 67(3):207-16. [DOI:10.1016/S0168-1605(01)00440-8]
- [27] Fuochi V, Coniglio MA, Laghi L, Rescifina A, Caruso M, Stivala A, et al. Metabolic characterization of supernatants produced by *Lactobacillus* spp. With In vitro Anti-legionella activity. *Front Microbiol*. 2019; 10:1403. [DOI:10.3389/fmicb.2019.01403] [PMID] [PMCID]

- [28] Saberian M, Shahidi Delshad E, Hbibi M. The effect of Bifidobacterium bifidum supernatant and cell mass on the proliferation potential of rat bone marrow-derived stromal cells. *Iran J Med Sci.* 2020; 45(4):269-76. [PMCID]
- [29] Sharma G, Dang S, Gupta S, Gabrani R. Identification and molecular characterization of bacteria having antimicrobial and antibiofilm activity. *Int J Pharm Pharm Sci.* 2016; 8(10):111-4. [DOI:10.22159/ijpps.2016v8i10.12338]
- [30] Dimkic I, Stankovic S, Nisavic M, Petkovic M, Ristivojevic P, Fira D, et al. The profile and antimicrobial activity of Bacillus lipopeptide extracts of five potential biocontrol strains. *Front Microbiol.* 2017; 8:925. [DOI:10.3389/fmicb.2017.00925] [PMCID]
- [31] Sarikhani Z, Nazari R, Nateghi Rostami M. First report of oxa-143-lactamase producing *Acinetobacter baumannii* in Qom, Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2017; 20(11):1282-86. [PMCID]
- [32] Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Method for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* 2016; 6(2):71-9. [DOI:10.1016/j.jpha.2015.11.005] [PMID] [PMCID]
- [33] Sacco F, Visca P, Runci F, Antonelli G, Raponi G. Susceptibility testing of colistin for *Acinetobacter baumannii*: How far are we from the truth. *Antibiotics.* 2021; 10(1):48. [DOI:10.3390/antibiotics10010048] [PMID] [PMCID]
- [34] Hetta HF, Al-kadmy IMS, Khazaal SS, Abbas S, Suhail A, El-mokhtar MA, et al. Antibiofilm and antivirulence potential of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Sci Rep.* 2021; 11(1):10751. [DOI:10.1038/s41598-021-90208-4] [PMID] [PMCID]
- [35] Jayathilaka EH, Rajapaksha DC, Nikapitiya C, De zoysa M, Whang I. Antimicrobial and anti-biofilm peptide octominin for controlling multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(10):5353. [DOI:10.3390/ijms22105353] [PMID] [PMCID]
- [36] Longo F, Vuotto C, Donelli F. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. *New Microbiol.* 2014; 37(2):119-27. [PMID]
- [37] Monem S, Furmanek Blaszk B, Lupkowska A, Kuczynska Wisnik D, Stojowska Swedrzynska K, Laskowska E. Mechanisms protecting *Acinetobacter baumannii* against multiple stresses triggered by the host immune response, antibiotics and outside-host environment. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(15):5498. [DOI:10.3390/ijms21155498] [PMID] [PMCID]
- [38] Karley D, Shukla SK, Toleti SR. Anti-biofilm activity of *Bacillus licheniformis* culture supernatant against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. In International Conference on Recent Trends in Biosciences (ICRTB 2016), 2016 April 7-10. India. <https://www.researchgate.net/publication/311675394>
- [39] Abu sayem SM, Manzo E, Ciavatta L, Tramice A, Cordone A, Zanfardino A, et al. Anti-biofilm activity of an exopolysaccharide from a sponge-associated strain of *Bacillus licheniformis*. *Microb Cell Fact.* 2011; 10:74. [DOI:10.1186/1475-2859-10-74] [PMID] [PMCID]
- [40] Skerniskyt J, Karazijait E, Luciunait A, Suziedelien E. OmpA protein-deficient *Acinetobacter baumannii* outer membrane vesicles trigger reduced inflammatory response. *Pathogens.* 2021; 10(4):407. [DOI:10.3390/pathogens10040407] [PMID] [PMCID]
- [41] Na SH, Jeon H, Oh MH, Kim YJ, Lee JC. Screening of small molecules attenuating biofilm formation of *acinetobacter baumannii* by inhibition of ompA promoter activity. *J Microbiol.* 2021; 59(9):871-78. [DOI:10.1007/s12275-021-1394-z] [PMID]
- [42] Selvaraj A, Valliammai A, Sivasankar C, Suba M, Sakthivel G, Karutha Pandian S. Antibiofilm and antivirulence efficacy of mytenol enhances the antibiotic susceptibility of *acinetobacter baumannii*. *Sci Rep.* 2020; 10(1):21975. [DOI:10.1038/s41598-020-79128-x] [PMID] [PMCID]

This Page Intentionally Left Blank