

## بررسی تأثیر pH اسیدی روی بیان ژن $phz A_1-G_1$ و $phz A_2-G_2$

### در سودوموناس آئروژینوزا

محمد رضا مهربانی<sup>۱</sup>، محسن میرزایی<sup>۲</sup>، مژده پیرهادی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

<sup>۲</sup> هیئت علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

<sup>۳</sup> کارشناسی ارشد زیست شناسی گرایش میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد بروجرد

#### چکیده

سودوموناس آئروژینوزا باکتری فرصت طلب با عوامل بیماری‌زایی متعدد و از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی است. ظهور مقاومت‌های دارویی و مقاومت به دترجنت‌ها و ضد عفونی کننده‌ها از عوامل تهدیدکننده حیات محسوب می‌شود. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر pH اسیدی روی بیان ژن  $phz A_1-G_1$  و  $phz A_2-G_2$  در سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد. در این مقاله توصیفی-مقطعی ۵ جدایه بالینی سودوموناس آئروژینوزا از بیمارستان‌های شهر قم جمع آوری شد. با استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی تست‌های تعیین هویت انجام گردید. DNA جدایه‌ها بوسیله روش جوشاندن استخراج شد و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن PCR انجام شد. سپس محیط کشت TSB در دو pH اسیدی (pH=4) و قلیایی (pH=9) تهیه و جدایه‌ها به این محیط‌ها تلقیح گردیدند. پس از گذشت بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA جدایه‌ها صورت گرفت و در نهایت بیان ژن‌ها بوسیله تکنیک Real Time PCR بررسی شد و نتایج با استفاده از نرم افزار REST آنالیز و ارزیابی شدند. بیان نسبی ژن  $phz1$  و  $phz2$  تحت تاثیر pH=4 و pH=9 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه‌های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). در pH اسیدی کاهش بیان ژن نسبت به pH قلیایی بیشتر بود که در مورد ژن  $phz1$  این کاهش بیشتر از  $phz2$  بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد بیان ژن‌های  $phz1$  و  $phz2$  در pH اسیدی کاهش موثرتری نسبت به pH قلیایی دارد. در نتیجه می‌توان چنین استنباط کرد که pH اسیدی باعث کاهش بیان ژن مولد فناژین، و در نتیجه کاهش بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. با توجه به مقاومت‌های زیاد این باکتری خصوصاً نسبت به ضد عفونی کننده‌ها، این یافته می‌تواند کاربرد زیادی در بیمارستان‌ها و درمان‌های پزشکی داشته باشد.

واژگان کلیدی: سودوموناس آئروژینوزا، فناژین، pH،  $phz1$  و  $phz2$ ، Real Time PCR.

## مقدمه

باکتری سودوموناس آئروژینوزا<sup>۱</sup> باسیل گرم منفی و پاتوژنی فرصت طلب است که توانایی زیستن در تمام محیطها را داشته و عامل بسیاری از عفونت‌های شدید در انسان مانند اندوکاردیت، مننژیت، سپتی سمی در بیماران مبتلا به سوختگی و عفونت‌های مزمن ریه در بیماران سیستمیک فیبروزیس می‌باشد. این باکتری غیرتخمیری، اکسیداز مثبت، دومین باکتری بیماری‌زای رایج در جراحی‌ها و سومین عامل شایع و متداول عفونت‌های بیمارستانی بعد از اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس است که حدود ۱۰ درصد عفونت‌های بیمارستانی را تشکیل می‌دهد (۱).

سال‌ها قبل از آنکه سودوموناس آئروژینوزا شناخته شود، پزشکان، مشاهده چرک متمایل به رنگ آبی-سبز را نشانه‌ای مهم برای وخیم بودن عفونت تلقی می‌کردند. اولین بار در سال ۱۸۵۰ میلادی، Sedillote حضور لکه‌های رنگی آبی-سبز را بر روی لباس جراحان مورد توجه قرار داد. اما به علت اصلی آن پی نبرد، تا آنکه در سال ۱۸۶۰ میلادی، Fordos موفق به استخراج رنگدانه از این باکتری شد و ماده کریستالی بدست آمده از آن را پاپوسیپانین نامید. در سال ۱۸۶۲ میلادی، Luke این لکه‌های رنگی را در ارتباط با عفونت اعلام کرد و اظهار داشت که عناصر میله‌ای شکلی را در این چرک‌های آبی-سبز مشاهده کرده است. در سال ۱۸۸۲ میلادی، Gessard باکتری سودوموناس آئروژینوزا را جدا نمود و آن را باسیلوس پاپوسیپانوس نامگذاری کرد (۵).

سودوموناس آئروژینوزا در خاک، آب، گیاهان و حیوانات وجود دارد. بر روی پوست و دستگاه گوارش حدود ۳ درصد از مردم عادی یافت می‌شود و توسط ۲۰ درصد از پرسنل بیمارستان‌ها حمل می‌شود. علاقه به پایداری در فضای بیمارستان دارد، زیرا در برابر بسیاری از ضدعفونی کننده‌ها و آنتی بیوتیک‌ها مقاوم است (۱۰). انتقال آن بوسیله پزشکان و پرستاران، وسایل تنفسی و غیره صورت می‌گیرد و به همین دلیل از عوامل خطر ساز برای بیماران بستری می‌باشد. این باکتری به علت داشتن مقاومت به بسیاری از داروها و مواد ضد عفونی کننده، در مواد مصرفی (الکل، بتادین رقیق و ...) که برای ضد عفونی نمودن بیماران استفاده می‌شود، رشد نموده و با استفاده از آنها سبب آلودگی و عفونت می‌گردد. این باکتری در آب مقطر و آب معمولی زنده می‌ماند و تکثیر می‌یابد. سودوموناس آئروژینوزا، متنوع ترین باکتری مطرح در پزشکی از نظر منبع انرژی و کربن است (۱۱).

سودوموناس آئروژینوزا یک بیماری‌زای فرصت طلب بوده و در اصل عامل بیماری در بیمارانی که دچار نقص ایمنی (مانند نوتروپنی) یا دارای کاتتر هستند، می‌باشد. به دلیل اینکه بیماران از نظر ایمنی‌شناسی قادر به مقابله با باکتری نبوده و ایزوله‌ها بطور معمول مقاومت چند دارویی را از خود نشان می‌دهند (گاهی با تولید بتالاکتامازها قادر به تجزیه یا غیرفعال کردن سفالوسپورین‌های نسل سوم هستند)، ریشه کنی سودوموناس غالباً مشکل است (۱۴).

حداقل سه پروتئاز خارج سلولی حائز اهمیت توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می‌شود که شامل الاستاز، آلکالین پروتئاز و پروتئاز IV می‌باشند.

الاستاز<sup>۲</sup> سودوموناس یکی از آنزیم‌های قرنیه چشم که متالوپروتئیناز ماتریکس (MMP) نامیده می‌شود را فعال می‌کند. این آنزیم از طریق تجزیه کلاژن‌های نوع IV، V، VI (که بخشی از ساختار غشاء پایه قرنیه و استروما هستند) باعث صدمه به چشم شده و در نهایت موجب کراتیت می‌شود. همچنین الاستاز نقش مهمی را در بیماری زایی نکروز بافتی در بیمارانی که دچار سوختگی هستند و بیماری ریوی در مبتلایان به فیبروز سیستمیک<sup>۳</sup> ایفا می‌کند. علت بوجود آمدن این بیماری‌ها به توانایی باکتری در تجزیه

<sup>1</sup> *Pseudomonas aeruginosa*

<sup>2</sup> Elastase

<sup>3</sup> Cystic fibrosis

اجزاء کمپلمان به ویژه  $C_3b$ ، تجزیه  $IgG$  و  $IgA$  و شکستن سایر پروتئین‌های سرمی (مانند آلفا آنتی کیموتریپسین، ممانعت کننده آلفا پروتئیناز و ممانعت کننده  $C_1$ ) ممانعت از کموتاکسی و کمیلومینسنس لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلتر، شکستن  $CD_4$  و اینترلوکین-۲ و ممانعت از فعالیت سلول‌های کشنده طبیعی (از طریق شکستن  $CD_{16}$ ) مربوط می‌شود (۲۳).

ممکن است تحت برخی شرایط محیطی، الاستاز از طریق تجزیه ترانسفرین میزبان در بدست آوردن آهن برای باکتری، کمک کننده باشد. همچنین ممکن است الاستاز از طریق تخریب اتصالات محکم پروتئین‌ها، با آسیب ریه و تهاجم باکتری به بافت ریه در ارتباط باشد (۲۴).

اطلاعات کمی در مورد آلکالین پروتئاز سودوموناس وجود دارد. اعتقاد بر این است که این پروتئین ۵۷ کیلودالتونی با سرکوب شدن سیستم ایمنی از طریق شکسته شدن انواع بسیار زیادی از پروتئین‌های میزبان مانند اینترلوکین ۲ و چندین مولکول چسبندگی لوکوسیت‌ها و نکروز در ارتباط می‌باشد.

پروتئاز  $IV$  ناشناخته باقی مانده است. اما تحقیقات در خرگوش نشان داده است که فعالیت پروتئاز  $IV$  به چشم آسیب می‌رساند و با ایجاد کراتیت در ارتباط است (۲۵).

سودوموناس آئروژینوزا دست کم سه نوع آدنوزین دی فسفات ریبوزیل ( $ADP$ -ریبوزیل) ترانسفراز تولید می‌کند که شامل اگزوتوکسین  $A$ ، اگزوانزیم  $S$  و لکوسیدین با وزن مولکولی بالا می‌باشند.

۹۰ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا، اگزوتوکسین  $A$  را تولید می‌کنند، آنزیمی که از طریق غیر فعال کردن فاکتور طویل کننده  $EF_2$  باعث توقف سنتز پروتئین و در نهایت مرگ سلول می‌شود. اگزوتوکسین  $A$  از طریق تجزیه نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید ( $NAD$ ) به  $ADP$ -ریبوزیل‌ات عمل می‌کند.

اگزوتوکسین  $A$  دارای سه قسمت است. بخش ۱ به گیرنده‌های سلولی میزبان متصل می‌شود و اندوسیتوز را پی‌ریزی می‌کند. هنگامی که آندوزوم اسیدی می‌شود، بخش ۲ موجب انتقال توکسین به درون سیتوپلاسم سلول می‌شود و بخش  $ADP$ -ریبوزیل فاکتور طویل کننده ( $EF_2$ ) را کاتالیز می‌کند (۲۹).

۴۰ درصد از سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا اگزوانزیم  $S$  ( $ExoS$ ) را تولید می‌کنند. اگزوانزیم  $S$  پروتئین سلولی میزبان را در مقایسه با  $ADP$ ،  $EF_2$ ، ریبوزیله می‌کند. در میان پروتئین‌های هدف این آنزیم می‌توان به ویمنتین و چندین پروتئین دیگر که به  $GTP$  متصل می‌گردند اشاره کرد. به دلیل اینکه پروتئین‌های متصل شونده به  $GTP$  در حرکت لیزوزوم‌ها نقش دارند، اگزوانزیم‌ها ممکن است سودوموناس آئروژینوزا را از کشته شدن توسط لوکوسیت‌های پلی مورفونوکلتر و ماکروفاژها محافظت کنند. به نظر می‌رسد که اگزوانزیم  $S$  عامل مهمی برای گسترش عفونت‌های سودوموناس آئروژینوزا در بیمارانی باشد که دچار سوختگی شده‌اند (۳۰).

محققان به دلیل اهمیت بیوفیلیم در ایجاد بیماری‌ها و مقاومت دارویی در جستجوی راه‌های مناسبی برای مهار و پیشگیری از تشکیل بیوفیلیم هستند. حداقل غلظت مهاری مواد ضد میکروبی در حضور بیوفیلیم افزایش قابل توجهی دارد. و این موضوع در زخم‌های ناشی از سوختگی اهمیت زیادی دارد. بطور کلی تکنیک‌های مقابله با تشکیل بیوفیلیم شامل تغییر پوشش سطحی و تکنیک‌های فیزیکی است.

<sup>4</sup> Elongation factor

**تغییر پوشش سطحی:** موادی از جنس پلی اتیلن گلیکول، پلی اتیلن اکسید و پلی اورتان هیدروفیل ساخته شده که بدلیل خاصیت فیزیکوشیمیایی خاص خود بیوفیلم تشکیل نداده و یا به صورت غیرفعال مانع اتصال باکتری می‌شوند. متأسفانه این نوع تغییر پوشش سطحی غیر فعال، محدودیت‌های زیادی داشته و بیشتر به گونه باکتری ارتباط دارد. کار دیگری که می‌توان انجام داد استفاده از پوشش ضدباکتریایی روی وسایل پزشکی مانند کاتتر و آنژیوتکت است که به نام پوشش سطحی از اتصال باکتری‌ها در اولین، فعال معروف است. با این کار قدم جلوگیری می‌شود. چند ساعت پس از عمل پیوند پوشش آنتی‌بیوتیکی روی پیوند می‌کشند تا از اتصال باکتری و تشکیل بیوفیلم جلوگیری شود. آنتی‌بیوتیک‌هایی مثل آموکسی‌سیلین، ریفامپین و مینوسایکلین استفاده می‌گردد. از دیگر مواد شیمیایی می‌توان از ترکیب مینوسایکلین<sup>۵</sup>، تورالیدین<sup>۶</sup>، اتانول و اسید هیدروکلرید نام برد (۳۹).

**تکنیک های فیزیکی:** یک سری روش های فیزیکی است که به تنهایی و یا به همراه مواد ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها بکار می‌رود. بیوالکتریک‌ها از تشکیل بیوفیلم جلوگیری و از طرفی سبب افزایش فعالیت آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شوند. در این روش به همراه تجویز آنتی‌بیوتیک از جریان الکتریکی ضعیف ۲-۱/۵ ولتی استفاده می‌شود. امواج اولتراسوند با فرکانس پایین (۷۰ کیلوهرتز) سبب تسهیل انتقال آنتی‌بیوتیک‌ها به داخل بیوفیلم می‌گردند. اولتراسوند احتمالاً باعث افزایش انتقال مواد غذایی و اکسیژن شده و در نتیجه رشد باکتری‌ها را افزایش می‌دهد و به همین دلیل آنتی‌بیوتیک‌ها موثر خواهند بود. از تکنیک فتودینامیک در بیوفیلم‌های پوست و دهان استفاده می‌گردد. داروهای حساس به نور تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن نموده و منجر به مرگ باکتری‌های موجود در بیوفیلم می‌شوند. طی یک مطالعه روی بیوفیلم‌های حفره دهان، نشان داده شده که نور لیزر هلیوم/نئون در حضور آبی تولوئیدون سبب مرگ ۹۵٪ باکتری‌ها می‌شود (۴۰).

**سیستم پلی‌مری:** ذرات نانوپلی‌استر، هیدروژل، میسل‌ها و فیبرها ناقلین مؤثر داروها می‌باشند. این ذرات آنتی‌بیوتیک‌ها را به محل ضایعه رسانده و باعث مرگ باکتری‌ها می‌گردند (۴۰).

### پیشینه تحقیق

- رن و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی بیان ژن *phzA2-G2* در حضور فعال کننده *RsmA* در سودوموناس آئروژینوزا M18 پرداختند. آنها عنوان کردند که پروتئین‌های متصل شونده به RNA از خانواده *RsmA/CsrA* به عنوان تنظیم کننده‌های بعد از رونویسی روی ژن‌های هدف خود عمل می‌کنند. آنها افزودند که ژنوم سودوموناس آئروژینوزا دارای دو کلاستر ژنی *phz* است که شامل ژن‌های *phzA1-G1(phz1)* و *phzA2-G2(phz2)* است که هر کدام از آنها حاوی تمامی ژن‌های لازم برای سنتز فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید (PCA) هستند. در مطالعه انجام شده توسط آنها تأثیر *RsmA* روی تنظیم بیان این دو ژن در سودوموناس آئروژینوزا M18 بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان دادند که *RsmA* به ناحیه ۵' ترجمه نشونده از ژن *phz2* متصل می‌شود (۵۰).
- دیوید آلفونسو در سال ۲۰۱۲ در پژوهشی به بررسی نقش و تنظیم اپرون تولیدکننده فنازین در سودوموناس آئروژینوزا PA14 پرداختند. آنها عنوان کردند که پاتوژن فرصت طلب سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند در بیمارانی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند ایجاد بیماری می‌کند. این تنها یک جنبه از فعالیت‌های این باکتری است. آنها عنوان کردند که اگرچه دو اپرون ژنی *phz1* و *phz2* در حدود ۹۸٪ به هم شبیه هستند اما به صورت متفاوت کنترل می‌شوند. مثلاً

<sup>5</sup> EDTA (ethyle diamine tetra acetic acid)

<sup>6</sup> Taurolidine

*phz1* با استفاده از سیستم کوروم سنسینگ تنظیم می‌شود در حالیکه مکانیسم‌های کنترلی *phz2* هنوز بخوبی شناخته نشده است (۵۱).

○ سزریانت و همکاران در سال ۲۰۱۳ در پژوهشی به بررسی تأثیر فن‌زین تولیدی توسط سودوموناس آئروژینوزا بر مرگ سینورابتیدیس الگانس پرداختند. آنها عنوان کردند که میکروارگانیسم‌های پاتوژن از روش‌های مختلفی برای غلبه بر سیستم دفاعی میزبان خود استفاده می‌کنند. آنها عنوان کردند که سودوموناس آئروژینوزا باکتری گرم منفی پاتوژن است که میزبان‌های زیادی از جمله کرم الگانس دارد. نتایج این مطالعه نشان داد که ماده فن‌زین-۱-کربوکسیلیک اسید که توسط ژن‌های *phzA1-G1(phz1)* و *phzA2-G2(phz2)* کد می‌شود دارای خاصیت سمی بوده و باعث مرگ کرم‌های الگانس می‌شود (۵۲).

○ سوئی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک پژوهش به بررسی ارتباط تنظیمی بین دو ژن *phzA1-G1(phz1)* و *phzA2-G2(phz2)* در حفظ تعادل تولید فن‌زین در باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 پرداختند. ژن دوپلیکیشن یک مکانیسم انتخابی برای افزایش سازگاری میکروارگانیسم‌ها با محیط اطرافشان است. سودوموناس آئروژینوزا PAO1 دارای ۷ سری ژنی (*phzA1B1C1D1E1F1G1*) *phz1* و (*phzA2B2C2D2E2F2G2*) *phz2* است که فن‌زین-۱-کربوکسیلیک اسید و مشتقاتش را سنتز می‌کند. این دو دسته ژنی همولوگ هم هستند و ساختار آنها به خوبی شناخته شده است اما عملکرد آنها بخوبی شناخته نشده است. با استفاده از سویه‌های ناک اوت که فاقد دسته‌های ژنی بودند عملکرد این ژن‌ها بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بین این ژن‌ها ارتباط وجود داشته و حضور دوگانه این دسته‌های ژنی باعث حفظ تعادل در بیان ژن‌ها و بیوسنتز فن‌زین می‌شود (۵۳).

○ فاضلی و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مطالعه ای در خصوص عفونت‌های بالینی در بیمارستان بقیه الله تهران روی ۱۰۲ جدایه سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. میزان فراوانی ژن‌های فن‌زین *phz I* (۱۱/۷ درصد)، *phzH* (۲۰/۵ درصد)، *phz II* (۲۸/۴ درصد)، *phzM* (۳۶/۲ درصد) و *phzS* (۱۹/۶ درصد) گزارش شد (۵۴).

○ توتونچی و ضیغمی در سال ۱۳۹۴ به شناسایی ژن‌های مولد فن‌زین در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی پرداختند. در مطالعه آنها، از بین ۹۳ جدایه، ۸۵ جدایه (۹۶/۵ درصد) حامل ژن *phz I*، ۸۲ جدایه (۹۳/۱ درصد) حامل ژن *phz II*، ۴۰ جدایه (۴۵/۴ درصد) حامل ژن *phzM* و ۲۴ جدایه (۲۷/۲ درصد) حامل ژن‌های *phzH*، *phzS* بودند. فراوانی ژن‌های *phz I* و *phz II* در بین سویه‌های با مقاومت چنددارویی بدست آمده از منابع مختلف بالاست که می‌تواند هشدار برای عفونت‌های حاصل از این باکتری باشد (۵۵).

○ لیانت و همکارش در سال ۲۰۱۰ به بررسی ایجاد نوترکیبی روی ژن مولد فن‌زین در سویه‌های سودوموناس پرداختند. نتایج این پژوهش حاکی از آن بود که اصلاح ژن بدون عارضه مبتنی بر سیستم نوترکیب در سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند باعث تولید ژن سه گانه (*PAO1*،  $\Delta phzH\Delta phzM\Delta phzS$ ) می‌شود که می‌تواند کارآمد باشد و منحصر یکی دیگر از فرآورده‌های فن‌زین، (PCA) را تولید نماید (۵۶).

○ ماورودی و همکاران نیز در سال ۱۹۹۸ به مطالعه و بررسی فعالیت آنتی بیوتیکی روی ۷ ژن *PhzABCDEFG* در سودوموناس آئروژینوزا که برای سنتز PCA مناسب هستند، پرداختند (۵۷).

○ بونسالی و همکاران در سال ۲۰۰۱ به تجزیه و تحلیل عملکرد ژن‌های بیوسنتز فن‌زین (PCA) در باکتری سودوموناس آئروژینوزا پرداختند (۲۵).

○ رسیوز و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی ایجاد جهش روی دو اپرون *phz1*، *phz2* پرداختند. مطالعه آنها نشان داد که بروز جهش در هر اپرون منجر به کاهش تولید PCA از اپرون دیگر می‌شود. همچنین نتایج آنها نشان داد که با

حذف *phz1* تولید PCA کمی کاهش می‌یابد، درحالی‌که حذف *phz2* بطور قابل توجهی باعث کاهش تولید PCA شده است (۵۸).

- فینان و همکارانش در سال ۲۰۰۴ در بروکسل و ایرلند با جداسازی ۱۲ جدایه از بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس، فراوانی ژن‌های *phz I*, *phzS*, *phzH*, *phz II*, *phzM*, *phzM* را مورد بررسی قرار دادند. که در این مطالعه فراوانی ژن *phzM* (۹۱/۶ درصد)، *phz II* (۱۰۰ درصد)، *phzH* (۱۰۰ درصد)، *phzS* و *phz I* (۸/۳ درصد) گزارش شد (۵۹).
- داممنش و همکاران در سال ۲۰۱۴ به مطالعه ای در خصوص عفونت ادراری کودکان در بیمارستان بقیه‌الله تهران روی ۲۳ جدایه با مقاومت دارویی پرداختند. میزان فراوانی ژن‌های فنازین *phz I* (۳۰/۴ درصد)، *phzH* (۱۳/۴ درصد)، *phz II* (۳۶ درصد)، *phzM* (۴۳/۴ درصد) و *phzS* (۲۵/۵ درصد) گزارش شد (۶۰).
- سان و همکاران در سال ۲۰۱۷ در پژوهشی بیان داشتند که سیستم کوآروم سنسینگ بطور متفاوتی در تنظیم تولید فنازین در سودوموناس آئروژینوزا مؤثر است. آنها به بررسی ۴ سیستم تنظیمی کوآروم سنسینگ و همچنین بیان ژن‌های *phz I* و *phz II* پرداختند. مکانیسم‌های احتمالی برای بیان *phz I* و *phz2* مورد بحث قرار گرفت و یک مدل ارائه شد. این یافته‌ها مبنایی برای مهندسی ژنتیک کوآروم سنسینگ را برای بهبود تولید PCA فراهم می‌کند (۶۱).
- HARJAI و همکاران در سال ۲۰۰۵ به بررسی اثر pH بر تولید فاکتورهای ویروالانس در سلول‌های بیوفیلیمی سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. نتایج آنها بیانگر این بود که تولید آلزینات و پروتئیناز در pH 8 بالاتر بود؛ در مقابل، سیدورفورها (پئوهلین و پیوردین) در pH 5 به شدت سنتز شدند (۶۲).

### روش تحقیق

در این مطالعه در مجموع تعداد ۵ جدایه باکتری سودوموناس آئروژینوزا از بیماران بستری در بخش‌های مختلف بیمارستان‌های سطح شهر قم جمع‌آوری گردید و مورد بررسی قرار گرفت.

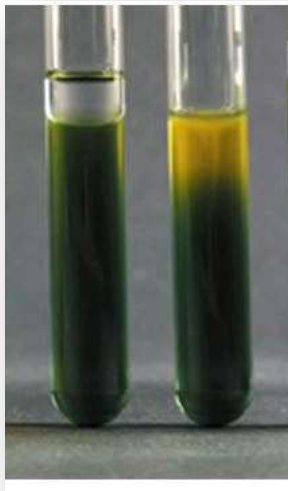
### آزمون اکسیداسیون-فرمانتاسیون<sup>۷</sup>

این تست روشی مناسب برای بررسی و شناسایی باکتری‌هایی که قادر به شکستن کربوهیدرات‌ها بیشتر از طریق اکسیداسیون یا فرمانتاسیون (تخمیر) باشند، می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا در محیط OF گلوکز را به روش اکسیداتیو مورد مصرف قرار می‌دهد، گلوکونات را اکسید نموده و کتوگلوکونات تولید می‌کند (سایر سودوموناس‌ها فاقد این خاصیت هستند).

در این تست باکتری‌ها را در دو لوله کشت داده و در سطح یکی از لوله‌ها پارافین اضافه کردیم تا شرایط بی‌هوازی مهیا گردد. سپس به مدت ۲۴ ساعت لوله‌ها را در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری نمودیم.

**نتیجه:** این ارگانسیم توانایی تخمیر قندها را ندارد بلکه آن را به روش اکسیداسیون مصرف می‌کند. بنابراین فقط در شرایط هوازی قند مصرف شد. مصرف قند همراه با تولید اسید است که موجب تغییر رنگ معرف از سبز به زرد شد (شکل ۱).

<sup>7</sup> Oxidation-fermentation



شکل ۱: نتیجه ی تست O/F در باکتری سودوموناس آئروژینوزا

#### روش کار:

ابتدا ۷۰۰ میلی لیتر آب مقطر در داخل یک ارلن ریخته و ۲۸ گرم پودر محیط کشت را به آن اضافه و حل نمودیم. محتویات ارلن را روی هیتر حرارت دادیم تا بجوشد و شفاف شود. سپس محیط کشت را به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو استریل نمودیم و در نهایت پس از خنک شدن محیط کشت در مجاورت شعله، ۱۰-۵٪ خون دفیبرینه‌ی گوسفندی به آن اضافه و محیط را در پلیت‌های استریل توزیع کردیم. پلیت‌ها را در دمای یخچال نگهداری نمودیم.

#### استخراج DNA

از باکتری‌های موردنظر در محیط کاملا استریل بوسیله لوپ برداشته و به محیط BHI<sup>۸</sup> انتقال داده شد و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار دادیم.

سپس طبق مراحل زیر جهت استخراج DNA به روش بویلینگ از محیط BHI حاوی باکتری اقدام نمودیم:

(۱) سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه

(۲) تخلیه مایع رویی

(۳) اضافه کردن ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر خنک

(۴) ۱۰۰ بار سمپلینگ

<sup>8</sup> Brain Heart Infusion Broth

(۵) قرار دادن در دستگاه ترموبلاک ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه

(۶) سانتریفیوژ در دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه

(۷) جدا کردن ۱۰۰ میکرولیتر از هر نمونه (مایع رویی) و دور انداختن مابقی نمونه

در نهایت DNA استخراج شده را در دمای فریزر نگهداری کردیم (شکل ۲).



شکل ۲: مراحل استخراج DNA

#### روش کار:

در ابتدا در هر میکروتیوب ۱۲/۵ میکرولیتر مسترمیکس می‌ریزیم و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر استریل شده به هر یک از آنها اضافه نموده سپس به هر یک ۱ میکرولیتر پرایمر رفت و ۱ میکرولیتر پرایمر برگشت روی دیواره‌های میکروتیوب اضافه کردیم و نهایتاً از هر کدام از DNA ها ۳ میکرولیتر روی درب میکروتیوب ریختیم. میکروتیوب‌ها را بسته و به مدت ۳۰ ثانیه اسپین نمودیم و طبق برنامه دمایی-زمانی مشخص در دستگاه ترموسایکلر قرار دادیم.

جدول ۱: توالی پرایمری ژن‌های *phz1* و *phz2*

Genes		Primer Sequence	Amplicon (bp)	References
<i>phz A1-G1</i>	F	CTCGAGAACGGCCGGATAAA	۱۰۸	In study
	R	GGTGGGAATACCGTCACGTT		
<i>phz A2-G2</i>	F	AACCACTTCTGGGTCGAGTG	۲۰۳	In study
	R	GTGGGAATACCGTCACGTTT		



جدول ۲: برنامه دمایی-زمانی PCR ژن *phz A1-G1*

برنامه	دما	زمان	سیکل
Initial Denaturation	۹۴ °C	۷ دقیقه	۳۳
Denaturation	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	
Annealing	۵۴ °C	۳۰ ثانیه	
Extension	۷۲ °C	۶۰ ثانیه	
Final Extension	۷۲ °C	۵ دقیقه	

جدول ۳: برنامه دمایی-زمانی PCR ژن *phz A2-G2*

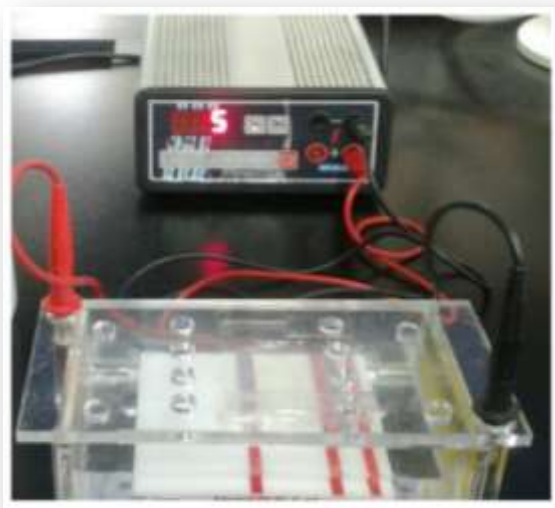
برنامه	دما	زمان	سیکل
Initial Denaturation	۹۴ °C	۷ دقیقه	۳۲
Denaturation	۹۴ °C	۳۰ ثانیه	
Annealing	۵۸ °C	۳۰ ثانیه	
Extension	۷۲ °C	۸۰ ثانیه	
Final Extension	۷۲ °C	۵ دقیقه	

### طرز تهیه ی بافر

بافر برای تهیه ژل آگاروز و برقراری جریان الکتریکی در درون تانک الکتروفورز کاربرد دارد. ترکیبات این ماده شامل تریس، EDTA و بوریک اسید می‌باشد. TBE محلول غلیظی است که برای استفاده از آن، باید توسط آب مقطر رقیق گردد و در واقع محلول کاری از آن تهیه شود. بدین منظور بافر TBE 10 X خریداری شده را در استوانه مدرج توسط آب مقطر به نسبت ۲۰ : ۱ رقیق کرده و به آهستگی تکان داده تا محلول یکنواخت گردد. بدین طریق بافر ۰/۵ ساخته می‌شود.

### روش کار:

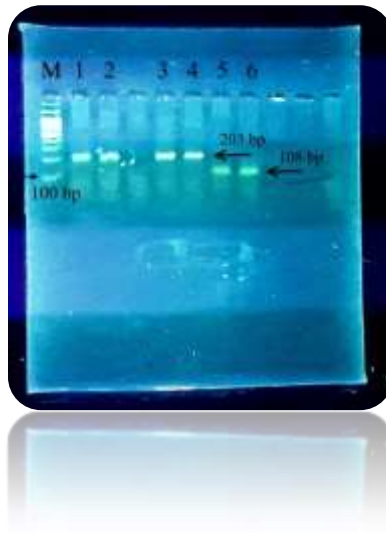
برای الکتروفورز در هر بار استفاده طبق پروتوکل مقدار ۱/۰۸ گرم از پودر آگارز ۲-۱/۵ درصد را در ۷۲ میلی‌لیتر بافر TBE<sup>۱</sup> که با نسبت ۱:۲۰ رقیق سازی کردیم توسط حرارت دهی با دستگاه میکروویو حل نموده تا محلولی هموژن و یکدست به دست آید که پس از قدری سرد شدن و قبل از بستن آگارز با توجه به حجم ژل به آن رنگ Safe Stain اضافه کردیم و سپس درون کاست که درون آن شانه الکتروفورز قرار داده‌ایم توزیع می‌گردد و منتظر بسته شدن ژل آگارز شدیم، سپس با رعایت احتیاط شانه را خارج ساخته و کاست را درون تانک الکتروفورز در محل خود قرار داده و در درون تانک هم حدوداً مقدار ۷۰۰ ml بافر TBE افزودیم به نحوی که روی کاست را فرا گیرد سپس مقدار ۵  $\mu$ l از محصول PCR را درون چاهک هایی که توسط شانه ایجاد شده توزیع کرده و در چاهک اول مارکر مولکولی را به میزان ۳  $\mu$ l ریختیم و دستگاه را پس از تنظیم ولتاژ ۷۰، آمپر ۴۰۰ و مدت زمان ۵۰ دقیقه به کار انداخته و منتظر حرکت مارکر مولکولی و تشکیل احتمالی باندهای حاصل حرکت محصول PCR شدیم (شکل ۳-۶). پس از اتمام زمان محصول الکتروفورز را برای مشاهده باندهای حاصل درون دستگاه ژل داکيومنت مورد ارزیابی قرار دادیم.



شکل ۳: تصویری از دستگاه الکتروفورز حین انجام کار

### نتایج سنتز cDNA

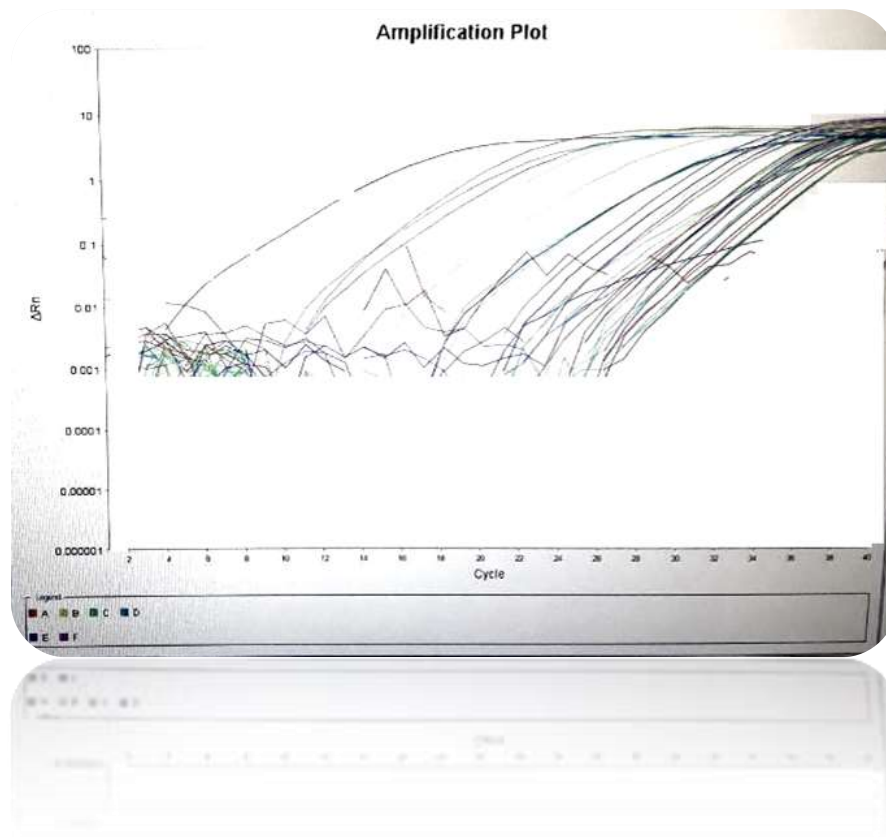
نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR نمونه cDNA سنتز شده با استفاده از پرایمرهای ژن *phz1* و *phz2* روی ژل آگارز در شکل (۴) نشان داده شده است.



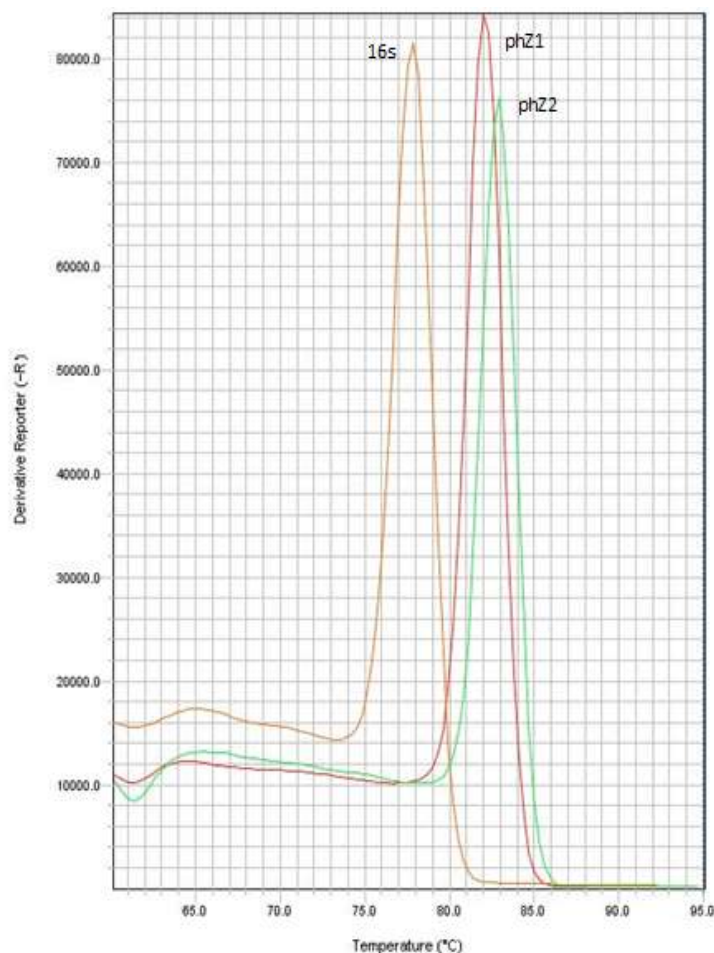
شکل ۴: تصویر الکتروفورز محصولات ژن های *phz1* و *phz2* روی cDNAهای سنتز شده. ستون M مربوط به مارکر مولکولی (100bp)، و چاهک های ۱ تا ۴ مربوط به ژن *phz2* و چاهک های ۵ و ۶ مربوط به ژن *phz1* است.

### نتایج Real-Time PCR

بیان ژن های *phz1*، *phz2* به روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نمودار تکثیر و منحنی ذوب حاصل از آنها (نمودار ۱ و ۲) بعنوان نمونه آورده شده است.



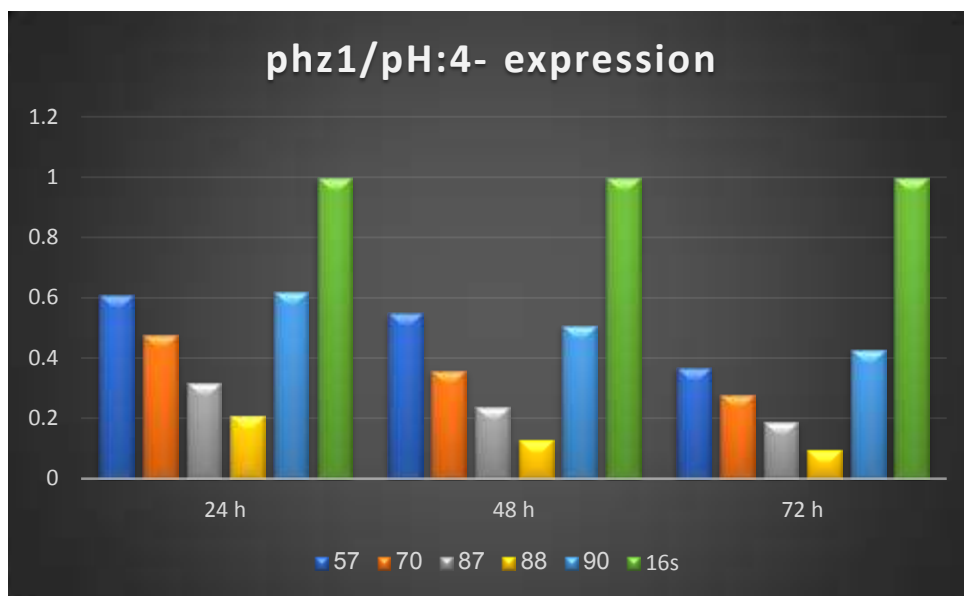
نمودار ۱: نمودار تکثیر ژن در **Real-Time PCR** انجام شده. محور عمودی در این نمودار بیانگر تغییرات رنگ فلورسنت و محور افقی بیانگر شماره سیکل‌های واکنش است. در این نمودار هر خط نشانه‌ی یکی از نمونه‌های مورد بررسی است که با رنگ‌های مختلف نمایش داده شده است. در فاز آخر نمودار ترکیبات واکنش از بین می‌رود و افزایشی در میزان فلورسنت مشاهده نمی‌شود بنابراین خط منحنی به صورت صاف مشاهده می‌شود.



نمودار ۲: نمودار منحنی ذوب (Melting curve) نمونه ی **Real-Time PCR**. این نمودار حاصل تغییرات یک رنگ فلورسانس ریپورتر، در اثر تغییرات دمایی واکنش می باشد. نمودار به صورت سینوسی بوده و کلیه خطوط این نمودار برهم منطبق هستند. قله نمودار نمایانگر نقطه ذوب یک محصول **PCR** است.

#### گزارش بیان نسبی ژن *phz1* در $pH=4$

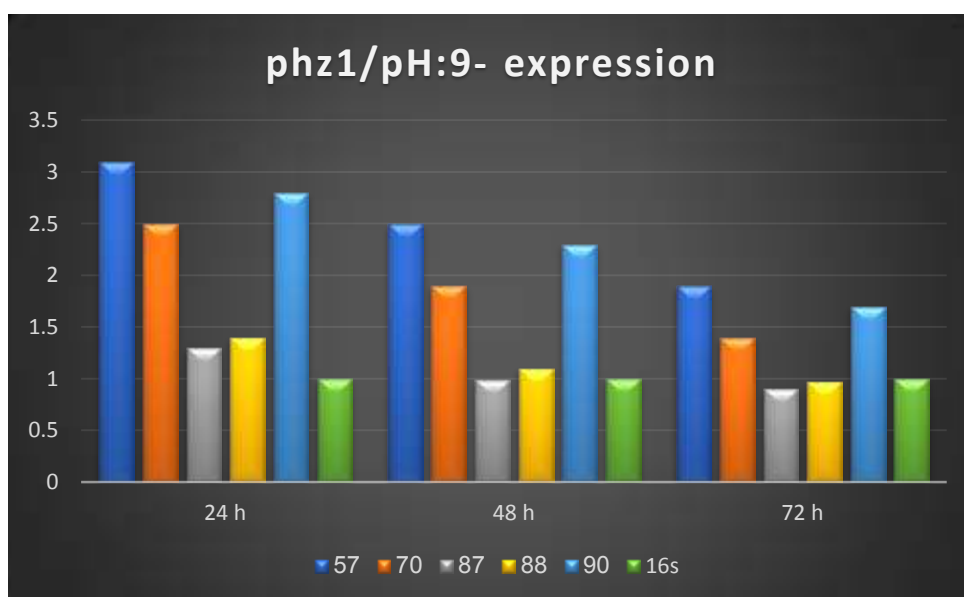
بیان نسبی ژن *phz1* تحت تاثیر  $pH=4$  در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). این کاهش بیان هرچه که زمان بیشتری می گذرد چشمگیرتر و بیشتر می شود بطوریکه به عنوان مثال بیان ژن *phz1* در نمونه ۷۲ ساعته در جدایه شماره ۵۷، به میزان ۰/۳۷ بوده در صورتی که میزان بیان این ژن در نمونه ۴۸ ساعته، ۰/۵۵ و در نمونه ۲۴ ساعته ۰/۶۱ بوده است (نمودار ۳).



نمودار ۳: گزارش بیان نسبی ژن *phz1* در pH=4

گزارش بیان نسبی ژن *phz1* در pH=9

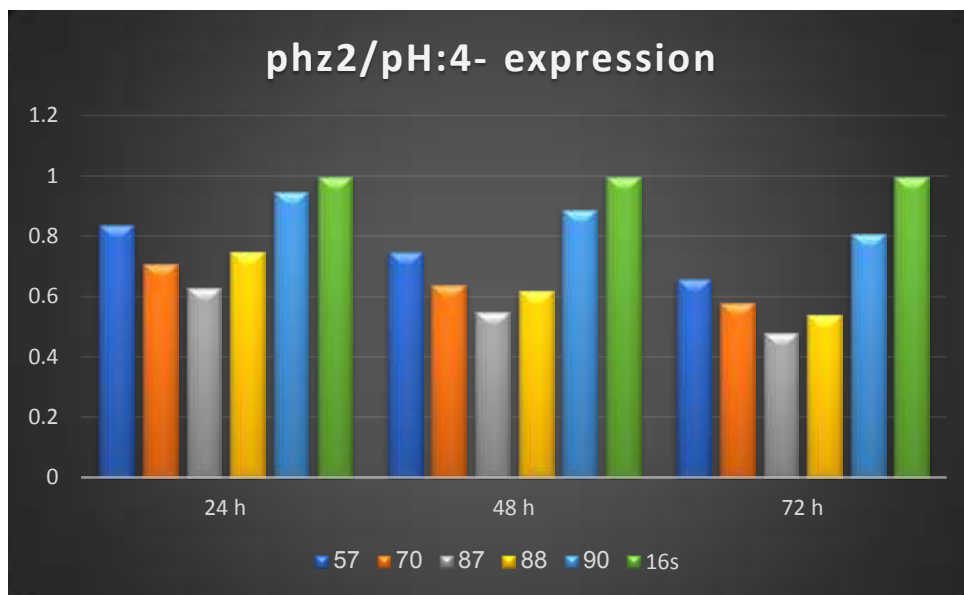
بیان نسبی ژن *phz1* تحت تاثیر pH=9 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه‌های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). بعنوان مثال میزان بیان ژن *phz1* در جدایه شماره ۷۰ در نمونه ۷۲ ساعته، ۱/۴، در نمونه ۴۸ ساعته ۱/۹ و در نمونه ۲۴ ساعته ۲/۵ بوده است. همانطور که مشاهده می شود با گذشت زمان میزان بیان این ژن نیز کاهش می یابد. اما می توان گفت در pH اسیدی در مقایسه با pH قلیایی بیان ژن به میزان کمتری صورت گرفته است (نمودار ۴).



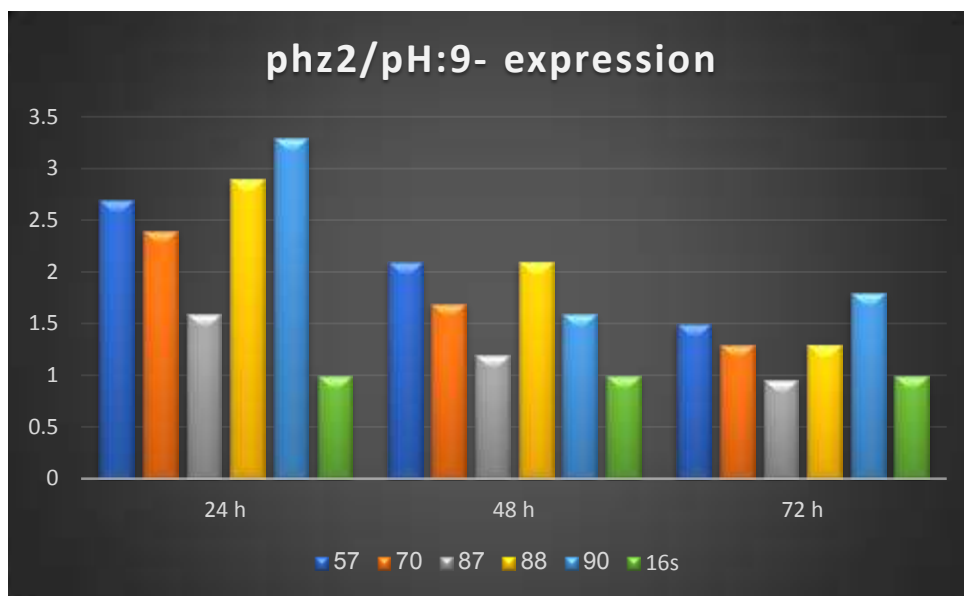
نمودار ۴: گزارش بیان نسبی ژن *phz1* در pH=9

گزارش بیان نسبی ژن *phz2* در pH=4

بیان نسبی ژن *phz2* تحت تاثیر pH=4 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه‌های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). این کاهش بیان هرچه که زمان بیشتری می‌گذرد چشمگیرتر و بیشتر می‌شود بطوریکه به عنوان مثال بیان ژن *phz2* در نمونه ۷۲ ساعته در جدایه شماره ۸۷، به میزان ۰/۴۸ بوده در صورتی که میزان بیان این ژن در نمونه ۴۸ ساعته، ۰/۵۵ و در نمونه ۲۴ ساعته ۰/۶۳ بوده است (نمودار ۵).

نمودار ۵: گزارش بیان نسبی ژن *phz2* در pH=4گزارش بیان نسبی ژن *phz2* در pH=9

بیان نسبی ژن *phz2* تحت تاثیر pH=9 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه‌های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). بعنوان مثال میزان بیان ژن *phz2* در جدایه شماره ۹۰ در نمونه ۷۲ ساعته، ۱/۸، در نمونه ۴۸ ساعته ۱/۶ و در نمونه ۲۴ ساعته ۳/۳ بوده است. همانطور که مشاهده می‌شود با گذشت زمان میزان بیان این ژن نیز کاهش می‌یابد (نمودار ۶).



نمودار ۶: گزارش بیان نسبی ژن *phz2* در pH=9

#### بحث

سودوموناس آئروژینوزا یکی از عوامل فرصت طلب و جدی در عفونت‌های بیمارستانی است که در بیماران دچار نقص سیستم ایمنی، نوتروپنی، سوختگی و دریافت کنندگان پیوند ایجاد بیماری‌های جدی و مخرب می‌کند. به علت بیماری‌زایی بالا و نقش برجسته آن در بیماری‌زایی انسان در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است (۷). در واقع ریشه‌کنی سودوموناس آئروژینوزا به دلیل دارا بودن مقاومت آنتی بیوتیکی بالا و مقاومت به ضدعفونی‌کننده‌های متداول مشکل است. گفته شده، مقاومت به عوامل ضد میکروبی تهدیدی جدی برای سلامت عمومی است به طوریکه گزینه‌های درمان را محدود می‌کند و منجر به افزایش مرگ و میر می‌شود (۶۴). این باکتری از محیط‌هایی چون آب، سوخت هواپیماهای جت و محلول‌های ضد عفونی کننده به علت توانایی استفاده از انواع متفاوت ترکیبات آلی، جدا شده است و قادر به زیست در غیاب ظاهری مواد غذایی می‌باشد. سودوموناس آئروژینوزا در ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت یک ساعت از بین می‌رود. لذا مقاومت خاصی در برابر گرما ندارد. این باکتری قادر است ماه‌ها در دمای محیط در داخل آب زنده بماند و به حیات خود ادامه دهد. این باکتری نسبت به بسیاری از مواد شیمیایی مقاوم است. سودوموناس آئروژینوزا در بسیاری از محلول‌های شیمیایی و ضدعفونی‌کننده‌های موجود در بیمارستان‌ها و نیز در محلول‌های چشمی به راحتی یافت می‌شود. لذا توصیه شده است در این محلول‌ها از فنل اتانول همراه با یک محلول ضدعفونی‌کننده وسیع‌الطیف مانند بنزالکونیوم کلراید و یا کلروهگزیدین، کلروکرزول و برخی ترکیبات مرکب مؤثر مانند EDTA- بنزالکونیوم استفاده شود (۶۵). گونه‌های مختلف این باکتری از مقاومت نسبی در برابر ترکیبات چهار ظرفیتی آمونیوم به ویژه استریماید، دتول و بنزالکونیوم کلراید برخوردار هستند. این باکتری از صابون‌ها و کرم‌های حاوی هگزاکلروفن، محلول‌های پویدون-آیو داین و کلرهگزیدین جدا شده است. سیدکس به شکل محلول قلیایی ۲ درصد گلو تار آلدهید، ماده مؤثر علیه این باکتری می‌باشد. این ارگانیزم به اسید و نمک‌های نقره نیز حساس است. همچنین اکثر سویه‌های سودوموناس آئروژینوزا به پارا آمینو بنزن سولفونامید (مافنید) و سولفادیازین نقره حساس هستند (۶۶).



با این اوصاف بر آن شدیم تا تأثیر دو نوع pH قلیایی و اسیدی را بر روی نحوه بیان ژن *phz1*, *phz2* در سودوموناس آئروژینوزا، بررسی نماییم.

در بیماری زایی سودوموناس آئروژینوزا چندین فاکتور بیماری زا مانند ترکیبات ساختاری، توکسین ها و آنزیم ها دخالت دارد. از این میان مشخص شده سودوموناس ها فنازین های مختلفی تولید می کنند که مهم ترین عوامل بیماری زا در سودوموناس آئروژینوزا به حساب می آید. همچنین به عنوان مولکول های پیام رسان سلول به سلول عمل می کنند و علیه باکتری های دیگر فعالیت مهارکنندگی دارند. این سمیت فنازین ها به دلیل فعالیت اکسایش-کاهش ذاتی آنهاست. مطالعات انجام شده در مدل عفونت های حیوانی و گیاهی نیز نقش بیماری زای فنازین ها را مشخص کرده است (۶۷).

فنازین ها، ترکیبات هتروسیکلیک حاوی نیتروژن است که توسط چندین گونه باکتریایی تولید می شود. بیشتر فنازین ها توسط سودوموناس آئروژینوزا تولید می شود که به دلیل خواص ضد میکروبی و نقش آنها در بیماری زایی به شدت حائز اهمیت هستند. فنازین ها به عنوان عوامل بیماری زا به تشکیل بیوفیلم کمک کرده و به عنوان پیام های سلول عمل می کند که بوسیله سیستم کوروم سنسینگ الگوهای بیان ژن را تنظیم می کند (۱۱). این سیستم با تولید سیگنال های شیمیایی موسوم به ان-اسیل هموسرین لاکتون (N-AHL) روی فعالیت های آنتاگونیستی نقش بسزایی دارند. دو اپرون همولوگ با نام های *phzA1 phzA1B1C1D1G1* و *phzA2 phzA2B2C2D2G2* (۱۱)، سنتز ترکیبات فنازین را به عهده دارند. برای تولید اکثر فنازین ها بیان می شود. علاوه بر این، تولید ژن های *phzS* و *phzH phzM* برای تبدیل ۱-فنازین کربوکسیلیک اسید (PCA) به سایر محصولات نهایی از جمله فنازین ۱-کربوکسامیدی، ۱-هیدروکسی فنازین و پیوسیانین مورد نیاز است (۲۹).

در مطالعه ی اخیر بیان دو ژن *phz1* و *phz2*، که نقش مهمی در بیماری زایی و پایداری عفونت ناشی از سودوموناس آئروژینوزا دارد، تحت تأثیر تغییرات pH بررسی شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که بیان نسبی ژن *phz1* و *phz2* تحت تأثیر pH=4 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه های زمانی کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). این کاهش بیان هرچه که زمان بیشتری می گذرد چشمگیرتر و بیشتر می شود بطوریکه بیان ژن *phz1* در نمونه های ۷۲ ساعته بسیار کمتر از نمونه های ۲۴ ساعته بوده است. این نکته بیانگر این است که هرچه باکتری مدت زمان بیشتری تحت تنش محیطی (کاهش یا افزایش pH) قرار بگیرد، میزان بیان ژن بیماری زای *phz* کمتر خواهد شد. بیان نسبی ژن *phz1* و *phz2* تحت تأثیر pH=9 در هر ۵ جدایه مورد مطالعه در تمامی بازه های زمانی نیز کاهش داشته است. در واقع در pH قلیایی میزان کاهش بیان ژن های *phz1* و *phz2* در مقایسه با pH اسیدی کمتر بوده اما به هر روی در تمامی جدایه ها کاهش بیان، مشاهده شده است. جدایه شماره ۸۷، بیشترین کاهش بیان ژن را در هر دو pH و هر دو ژن را داشته است. و کمترین کاهش بیان ژن در بین جدایه ها در تمامی مراحل، مربوط به جدایه شماره ۹۰ می باشد.

بطور کلی در pH اسیدی کاهش بیان ژن نسبت به pH قلیایی بیشتر بوده که در مورد ژن *phz1* این کاهش بیشتر از *phz2* بوده است. اما pH قلیایی تأثیر کمتری بر کاهش بیان این دو ژن داشته است.

Raad و همکارانش ترکیب EDTA با مینوسایکلین را برای جلوگیری از تشکیل بیوفیلم استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس، استافیلوکوکوس اورئوس و سودوموناس آئروژینوزا مورد بررسی و گزارش نموده اند که این دو باعث کاهش شدید باکتری های بیوفیلم می شوند. به همین دلیل EDTA به عنوان نگهدارنده در اغلب محصولات بکار می رود (۶۸). Kite و همکارانش گزارش کرده اند که EDTA دارای سه سدیم باعث مرگ بیوفیلم کاترها می شود (۶۹). Banin و همکاران نیز معتقدند EDTA بر روی سلول های سودوموناس آئروژینوزا زنده بیوفیلم تأثیر دارد (۷۰).

این نتایج همسو و هم راستای نتایج بدست آمده در پژوهش ما نیز می باشند.

سلول‌های بیوفیلیم در مرحله آخر تشکیل بیوفیلیم کننده و آزاد می‌شوند. مکانیسم دقیق این عمل هنوز مشخص نیست و احتمالاً به علت کوثروم سنسینگ و فرایند پیچیده تمایز صورت می‌گیرد. استرس اکسیداتیو و استرس نیتروساتیو در این امر دخالت دارند. استرس اکسیداتیو در اثر تولید واسطه‌های اکسیژن مانند  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $HO$  و استرس نیتروساتیو در اثر واسطه‌های نیتروژن مانند  $ONOO^-$ ,  $HNO_2$ ,  $NO$  و  $N_2O_3$  ایجاد می‌شود. در نتیجه پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک دچار آسیب می‌شود. آب اکسیژنه نقش کشنده روی باکتری‌ها داشته و کوثروم سنسینگ نقش مهمی در مقاومت در برابر هیدروکسید هیدروژن دارد. آب اکسیژنه سبب جهش در ژن کدکننده فاکتور ضد سیگما شده و بالاخره باعث تبدیل بیوفیلیم به شکل آزاد می‌شود (۷۱).

Yoon و همکاران نشان دادند که در شرایط بی‌هوای واسطه‌های نیترواستاتیو خاصیت کوثروم سنسینگ خود را از دست می‌دهند. این مواد غیر از خاصیت اتولیز در مسیرهای تنظیمی زیادی شرکت دارند. تولید  $NO$  در سودوموناس آئروژینوزا سبب فعال شدن ژن‌های متابولیسم بی‌هوای باکتری می‌گردد و در شرایط بی‌هوای حاکم بر بیوفیلیم راحت‌تر ایجاد می‌شود (۷۲).

Barraud و همکاران گزارش کردند که سودوموناس آئروژینوزا در مرحله توقف رشد در شرایط بی‌هوای تولید رادیکال‌های آزاد نیتروژن کرده و از شکل بیوفیلیم به شکل آزاد تبدیل می‌گردد. این محققین انگلیسی پیشنهاد می‌نمایند که از این گاز برای درمان بیوفیلیم استفاده گردد. باکتری آزاد به آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد ضد میکروبی بیشتر حساس می‌باشند. از طرفی اگر  $NO$  به همراه آنتی‌بیوتیک مصرف شود تأثیر آن بیشتر است (۷۳).

HARJAI و همکاران در سال ۲۰۰۴ به بررسی اثر pH بر تولید فاکتورهای ویرولانس در سلول‌های بیوفیلیمی سودوموناس آئروژینوزا پرداختند. نتایج آنها بیانگر این بود که تولید آلزینات و پروتئیناز در pH 8 بالاتر بود؛ در مقابل، سیدورفورها (پئوهلین و پیوردین) در pH 5 به شدت سنتز شدند. همچنین تولید بیوفیلیم نیز در pH اسیدی کاهش یافت (۶۲).

نتایج این مطالعه نیز با نتایج ما همخوانی دارد. در مطالعه ما نیز هر دو pH 4 و pH 9 منجر به کاهش بیان ژن‌های *phz* شدند.

رن و همکاران در سال ۲۰۱۴ به بررسی بیان ژن *phzA2-G2* در حضور فعال کننده *RsmA* در سودوموناس آئروژینوزا M18 پرداختند. آنها عنوان کردند که پروتئین‌های متصل شونده به RNA از خانواده *RsmA/CsrA* به عنوان تنظیم کننده‌های بعد از رونویسی روی ژن‌های هدف خود عمل می‌کنند. نتایج حاصل از این بررسی نشان دادند که *RsmA* به ناحیه ۵' ترجمه نشونده از ژن *phz2* متصل می‌شود (۵۰).

رسینوز و همکاران در سال ۲۰۱۲ به بررسی ایجاد جهش روی دو اپرون *phz1*, *phz2* پرداختند. مطالعه آنها نشان داد که بروز جهش در هر اپرون منجر به کاهش تولید PCA از اپرون دیگر می‌شود. همچنین نتایج آنها نشان داد که با حذف *phz1*، تولید PCA کمی کاهش می‌یابد، درحالی‌که حذف *phz2* بطور قابل توجهی باعث کاهش تولید PCA شده است (۵۸).

نتیجه‌ی مطالعه فوق با نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر تقریباً همسو بوده، در مطالعه ما نیز هر دو ژن *phz1*, *phz2* به نسبت مشابهی کاهش بیان داشتند. این موضوع نشان دهنده‌ی فعالیت هماهنگ این دو ژن در جهت پاتوژنز سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد.

توتونچی و ضیغمی در سال ۱۳۹۴ به شناسایی ژن‌های مولد فنازین در جدایه‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا با مقاومت چند دارویی پرداختند. در مطالعه آنها، از بین ۹۳ جدایه، ۸۵ جدایه (۹۶/۵ درصد) حامل ژن *phz I* ۸۲ جدایه (۹۳/۱ درصد) حامل ژن *phz II* ۴۰ جدایه (۴۵/۴ درصد) حامل ژن *phzM* و ۲۴ جدایه (۲۷/۲ درصد) حامل ژن‌های *phzS*, *phzH* بودند. فراوانی

ژن‌های *phz I* و *phz II* در بین سویه‌های با مقاومت چنددارویی بدست آمده از منابع مختلف بالاست که می‌تواند هشدار برای عفونت‌های حاصل از این باکتری باشد (۵۵).

دیوید آلفونسو در سال ۲۰۱۲ در پژوهشی به بررسی نقش و تنظیم اپرون تولیدکننده فنازین در سودوموناس آئروژینوزا PA14 پرداختند. آنها عنوان کردند که پاتوژن فرصت طلب سودوموناس آئروژینوزا می‌تواند در بیمارانی که دارای نقص سیستم ایمنی هستند ایجاد بیماری می‌کند. این تنها یک جنبه از فعالیت‌های این باکتری است. آنها عنوان کردند که اگرچه دو اپرون ژنی *phz I* و *phz 2* در حدود ۹۸٪ به هم شبیه هستند اما به صورت متفاوت کنترل می‌شوند. مثلاً *phz I* با استفاده از سیستم کوروم سنسینگ تنظیم می‌شود در حالیکه مکانیسم‌های کنترلی *phz 2* هنوز بخوبی شناخته نشده است (۵۱).

در مطالعه ما نیز، بیان هر دو ژن کاهش داشته است اما این میزان کاهش در ژن *phz I* بیشتر بوده است که می‌تواند بیانگر شباهت عملکرد این دو ژن در روند بیماریزایی باشد.

سویی و همکاران در سال ۲۰۱۶ در یک پژوهش به بررسی ارتباط تنظیمی بین دو ژن *phzA1-G1(phz1)* و *phzA2-G2(phz2)* در حفظ تعادل تولید فنازین در باکتری سودوموناس آئروژینوزا PAO1 پرداختند. ژن دوپلیکیشن یک مکانیسم انتخابی برای افزایش سازگاری میکروارگانیسم‌ها با محیط اطرافشان است. سودوموناس آئروژینوزا PAO1 دارای ۷ سری ژنی *phz I* (*phzA1B1C1D1E1F1G1*) و *phz 2* (*phzA2B2C2D2E2F2G2*) است که فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید و مشتقاتش را سنتز می‌کند. این دو دسته ژنی همولوگ هم هستند و ساختار آنها به خوبی شناخته شده است اما عملکرد آنها بخوبی شناخته نشده است. با استفاده از سویه‌های ناک اوت که فاقد دسته‌های ژنی بودند عملکرد این ژن‌ها بررسی شد. نتایج حاصل از این بررسی نشان داد که بین این ژن‌ها ارتباط وجود داشته و حضور دوگانه این دسته‌های ژنی باعث حفظ تعادل در بیان ژن‌ها و بیوسنتز فنازین می‌شود (۵۳).

نتیجه‌ی بدست آمده از مطالعه‌ی ما با نتیجه‌ی مطالعه‌ی فوق همخوانی دارد و گفته‌ی آنها را تأیید می‌نماید.

دادمنش و همکاران در سال ۲۰۱۳ به مطالعه‌ی در خصوص عفونت ادراری کودکان در بیمارستان بقیه‌الله تهران روی ۲۳ جدایه با مقاومت دارویی پرداختند. میزان فراوانی ژن‌های فنازین *phz I* (۳۰/۴ درصد)، *phzH* (۱۳/۴ درصد)، *phz II* (۳۶ درصد)، *phzM* (۴۳/۴ درصد) و *phzS* (۲۵/۵ درصد) گزارش شد (۶۰).

از تمام نتایج فوق، این مطلب قابل برداشت است که بیان این دو ژن نقش بسیار حائز اهمیتی در بیماریزایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا دارد. بنابراین هر عاملی که منجر به کاهش بیان این ژن‌ها گردد نقش بسیار موثری در روند درمان و پزشکی خواهد داشت.

## نتیجه‌گیری

سودوموناس آئروژینوزا علاقه زیادی به پایداری در فضای بیمارستان دارد، زیرا در برابر بسیاری از ضدعفونی‌کننده‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم است. انتقال آن بوسیله پزشکان و پرستاران، وسایل تنفسی و غیره صورت می‌گیرد و به همین دلیل از عوامل خطرناک برای بیماران بستری می‌باشد. این باکتری به علت داشتن مقاومت به بسیاری از داروها و مواد ضدعفونی‌کننده، در مواد مصرفی (الکل، بتادین رقیق و ...) که برای ضدعفونی نمودن بیماران استفاده می‌شود، رشد نموده و با استفاده از آنها سبب آلودگی و عفونت می‌گردد. معمولاً برای شست و شوی زخم‌های ناشی از سودوموناس از اسید استیک ۱٪ استفاده می‌شود. لذا نقش pH در

بیان ژن‌های *phz* که در ایجاد بیوفیلیم و مقاومت باکتریایی نقش دارد ممکن است به درمان این باکتری مقاوم که بیشتر در بیماران با ضعف ایمنی ایجاد بیماری می‌کنند مؤثر می‌باشد.

در مطالعه حاضر باتوجه به اهمیت فن‌زین‌ها در فرآیند بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا، و از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ای در ایران روی بیان ژن‌های *phzA1-G1(phz1)* و *phzA2-G2(phz2)* صورت نگرفته بود، به بررسی این موضوع پرداختیم. نتایج ما بیانگر این است که بیان ژن‌های *phz1* و *phz2* در pH اسیدی کاهش موثرتری یافته است تا pH قلیایی. در نتیجه می‌توان چنین استنباط کرد که pH اسیدی باعث کاهش بیان ژن مولد فن‌زین، و در نتیجه کاهش بیماری‌زایی سودوموناس آئروژینوزا می‌شود. هرچند pH قلیایی نیز باعث کاهش بیان این ژن‌ها شده و به نوبه ی خود نیز موثر واقع گردیده است. این یافته می‌تواند مورد اهمیت زیادی برای بیمارستان‌ها و کادر درمان و پزشکی واقع شود.

## منابع

۱. Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology 27 E: McGraw Hill Professional; 2015.
۲. Das K, Mukherjee AK. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. *Bioresource technology*. 2007;98(7):1339-45.
۳. Morales E, Cots F, Sala M, Comas M, Belvis F, Riu M, et al. Hospital costs of nosocomial multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *BMC Health Services Research*. 2012;12(1):122.
۴. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(9):2233.
۵. Liang R, Liu J. Scarless and sequential gene modification in *Pseudomonas* using PCR product flanked by short homology regions. *BMC microbiology*. 2010;10(1):209.
۶. اصلانی مم، پور مه، بین وسن، شاهچراغی ف، عیدی ا، شرفی ز. شناسایی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از نمونه‌های تنفسی با استفاده از واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) اختصاصی ژنهای لیوپروتئین غشایی خارجی *oprL* و *oprI* و آگزوتوکسین A. یافته. ۲۰۱۴؛ ۳(۳).
۷. پور ر، عربستانی، مشعوف ی، علیخانی، محمدیوسف. تعیین MIC سه کلاس مختلف آنتی بیوتیکی در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آئروژینوزا جدا شده از بیماران بستری در بیمارستانهای آموزشی شهر همدان (۹۱-۱۳۹۰). مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۲۰۱۳؛ ۷(۳): ۱۸-۲۵.
۸. Schmidt T, Schaechter M. Topics in ecological and environmental microbiology: Elsevier; 2012.
۹. Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. Interactions of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Molecular microbiology*. 2003;48(1):199-210.
۱۰. Möker N, Dean CR, Tao J. *Pseudomonas aeruginosa* increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. *Journal of bacteriology*. 2010;192(7):1946-55.
۱۱. Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenberg E. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the national academy of sciences*. 2001;98(5):2752-7.

۱۲. D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB, Pesci EC. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. *Journal of bacteriology*. 2002;184(23):6481-9.
۱۳. Govan J. Studies on the pyocins of *Pseudomonas aeruginosa*: morphology and mode of action of contractile pyocins. *Microbiology*. 1974;80(1):1-15.
۱۴. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(1):105-16.
۱۵. Stover C, Pham X, Erwin A, Mizoguchi S, Warrener P, Hickey M, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*. 2000;406(6799):959.
۱۶. Diggle SP, Winzer K, Chhabra SR, Worrall KE, Cámara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal molecule overcomes the cell density-dependency of the quorum sensing hierarchy, regulates rhl-dependent genes at the onset of stationary phase and can be produced in the absence of LasR. *Molecular microbiology*. 2003;50(1):29-43.
۱۷. Pethani BP. Involvement of small molecules in the interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and *Scedosporium aurantiacum*. 2015.
۱۸. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiological reviews*. 1996;60(3):539-74.
۱۹. Li Z, Kosorok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, et al. Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *Jama*. 2005;293(5):581-8.
۲۰. Timm A, Steinbüchel A. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied and environmental microbiology*. 1990;56(11):3360-7.
۲۱. Wayne P. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 2011.
۲۲. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Medecine et maladies infectieuses*. 2006;36(2):78-91.
۲۳. بزنجانی فا، محمودی\* ر، امینی ک. بررسی و شناسایی ژنهای کروم سنسینگ در سویه های سودوموناس آنروژینوزا جدا شده از نمونه های بالینی انسانی به روش Multiplex PCR و تعیین مقاومت آنتی بیوتیکی. یافته. ۲۰۱۶؛ ۱۸(۲).
۲۴. انگوتی محزمسیپگ، editor الگوي مقاومت آنتي بيوتیکی در ایزوله های سودوموناس آنروژینوزا جدا شده از بیمارستان امام رضا (ع) تبریز.
۲۵. Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS. Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*. 2001;183(21):6454-65.
۲۶. Karatuna O, Yagci A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010;16(12):1770-5.
۲۷. Franklin MJ, Nivens DE, Weadge JT, Howell PL. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in microbiology*. 2011;2:167.

۲۸. مهدوی، صالحی ز، امینی، مبصری. بررسی فراوانی ژن‌های *exoS*، *exoY*، *exoT* و *exoU* از سودوموناس آنروژینوزا جدا شده از بیماران بیمارستان‌های تهران با روش Multiplex-PCR. مجله میکروب شناسی پزشکی ایران. ۲۰۱۷؛ ۱۱(۱): ۹-۱۷.
۲۹. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends in molecular medicine*. 2004;10(12):599-606.
۳۰. Wolf P, Elsässer-Beile U. *Pseudomonas* exotoxin A: from virulence factor to anti-cancer agent. *International Journal of Medical Microbiology*. 2009;299(3):161-76.
۳۱. Pozzi CR, Braghini R, Arcaro JR, Zorzete P, Israel ALM, Pozar IO, et al. Mycoflora and occurrence of alternariol and alternariol monomethyl ether in Brazilian sunflower from sowing to harvest. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2005;53(14):5824-8.
۳۲. Ochsner UA, Koch AK, Fiechter A, Reiser J. Isolation and characterization of a regulatory gene affecting rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 1994;176(7):2044-54.
۳۳. Kang C-I, Kim S-H, Kim H-B, Park S-W, Choe Y-J, Oh M-d, et al. *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: risk factors for mortality and influence of delayed receipt of effective antimicrobial therapy on clinical outcome. *Clinical infectious diseases*. 2003;37(6):745-51.
۳۴. ولدبیگی، فر ص، نورخدا، طباطبایی ر، ریاب، ملکی. بررسی فراوانی ژن‌های توکسین A و آلزینات در ایزوله‌های بالینی سودوموناس آنروژینوزا. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ایلام. ۲۰۱۲؛ ۲۰(۱): ۵۸-۶۴.
۳۵. Engel JN. Molecular pathogenesis of acute *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Severe infections caused by Pseudomonas aeruginosa*: Springer; 2003. p. 201-29.
۳۶. Ochsner UA, Reiser J. Autoinducer-mediated regulation of rhamnolipid biosurfactant synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1995;92(14):6424-8.
۳۷. O'Neill JF, Hope CK, Wilson M. Oral bacteria in multi-species biofilms can be killed by red light in the presence of toluidine blue. *Lasers in surgery and medicine*. 2002;31(2):86-90.
۳۸. Olson ME, Ceri H, Morck DW, Buret AG, Read RR. Biofilm bacteria: formation and comparative susceptibility to antibiotics. *Canadian Journal of Veterinary Research*. 2002;66(2):86.
۳۹. Murray TS, Okegbe C, Gao Y, Kazmierczak BI, Motterlini R, Dietrich LE, et al. The carbon monoxide releasing molecule CORM-2 attenuates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PLoS One*. 2012;7(4):e35499.
۴۰. Ghorashi Z, Nezami N, Ghotaslou R, Ghorashi S. Pattern of *Pseudomonas aeruginosa* drug resistance in Tabriz Children Hospital. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*. 2010;13(8): ۴۰۰-۴۰۴.
۴۱. Eriksen H, Iversen B, Aavitsland P. Prevalence of nosocomial infections in hospitals in Norway, 2002 and 2003. *Journal of Hospital Infection*. 2005;60(1):40-5.
۴۲. Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(1):43-8.
۴۳. Chang P, Blackwood A. Simultaneous production of three phenazine pigments by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Canadian Journal of Microbiology*. 1969;15(5):439-44.
۴۴. Dietrich LE, Price-Whelan A, Petersen A, Whiteley M, Newman DK. The phenazine pyocyanin is a terminal signalling factor in the quorum sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular microbiology*. 2006;61(5):1308-21.

- ۴۵ Mentel M, Ahuja EG, Mavrodi DV, Breinbauer R, Thomashow LS, Blankenfeldt W. Of two make one: the biosynthesis of phenazines. *ChemBioChem*. 2009;10(14):2295-304.
- ۴۶ Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;86(6):1659-70.
- ۴۷ Price-Whelan A, Dietrich LE, Newman DK. Rethinking 'secondary' metabolism: physiological roles for phenazine antibiotics. *Nature chemical biology*. 2006;2(2):71.
- ۴۸ Latifi A, Winson MK, Foglino M, Bycroft BW, Stewart GS, Lazdunski A, et al. Multiple homologues of LuxR and LuxI control expression of virulence determinants and secondary metabolites through quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecular microbiology*. 1995;17(2):333-43.
- ۴۹ Oliver A, Cantón R, Campo P, Baquero F, Blázquez J. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*. 2000;288(5469):1251-3.
- ۵۰ Ren B, Shen H, Lu ZJ, Liu H, Xu Y. The *phzA2-G2* transcript exhibits direct RsmA-mediated activation in *Pseudomonas aeruginosa* M18. *PLoS One*. 2014;9(2):e89653.
- ۵۱ Recinos DA. The Roles and Regulation of the Redundant Phenazine Biosynthetic Operons in *Pseudomonas aeruginosa* PA14: Columbia University; 2012.
- ۵۲ Cezairliyan B, Vinayavekhin N, Grenfell-Lee D, Yuen GJ, Saghatelian A, Ausubel FM. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* phenazines that kill *Caenorhabditis elegans*. *PLoS pathogens*. 2013;9(1):e100.۳۱۰۱
- ۵۳ Chua SL, Yam JKH, Hao P, Adav SS, Salido MM, Liu Y, et al. Selective labelling and eradication of antibiotic-tolerant bacterial populations in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature communications*. 2016;7:10750.
- ۵۴ Fazeli N, Momtaz H. Virulence gene profiles of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Iranian hospital infections. *Iranian Red Crescent Medical Journal*. 2014;16(10).
- ۵۵ Tutunchi F, Zeighami H. Detection of Phenazine Genes in Multi-Drug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *Pathobiology Research*. 2016;19(1):1-11.
- ۵۶ Green LK, La Flamme AC, Ackerley DF. *Pseudomonas aeruginosa* MdaB and WrbA are water-soluble two-electron quinone oxidoreductases with the potential to defend against oxidative stress. *Journal of microbiology*. 2014;52(9):771-7.
- ۵۷ Mavrodi DV, Ksenzenko VN, Bonsall RF, Cook RJ, Boronin AM, Thomashow LS. A seven-gene locus for synthesis of phenazine-1-carboxylic acid by *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Journal of bacteriology*. 1998;180(9):2541-8.
- ۵۸ Recinos DA, Sekedat MD, Hernandez A, Cohen TS, Sakhtah H, Prince AS, et al. Redundant phenazine operons in *Pseudomonas aeruginosa* exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012:201213901.
- ۵۹ Finnan S, Morrissey JP, O'gara F, Boyd EF. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(12):5783-92.
- ۶۰ Dadmanesh M, Pilehvarzadeh M, Eramabadi M, Eramabadi P, Moghadam MB, Mashayekhi F. Community acquired *Pseudomonas aeruginosa* urinary tract infections in children hospitalized in a Baqiatallah hospital, Tehran, Iran: Virulence profile and antibiotic resistance properties. *Biosci Biotech Res Asia*. 2014;11(2):417-26.

- ۶۱ Sun S, Chen B, Jin ZJ, Zhou L, Fang YL, Thawai C, et al. Characterization of the multiple molecular mechanisms underlying RsaL control of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in the rhizosphere bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201. *Molecular microbiology*. 2017;104(6):931-47.
- ۶۲ Harjai K, Khandwaha R, Mittal R, Yadav V, Gupta V, Sharma S. Effect of pH on production of virulence factors by biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa*. *Folia microbiologica*. 2۰۲۰-۲۰۲۱;(۲)۵۰۰;۵۰۵
- ۶۳ Pérez-Osorio AC, Williamson KS, Franklin MJ. Heterogeneous rpoS and rhlR mRNA levels and 16S rRNA/rDNA (rRNA gene) ratios within *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, sampled by laser capture microdissection. *Journal of bacteriology*. 2010.۳۰۰۰-۲۹۹۱;(۱۲)۱۹۲;
- ۶۴ Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical infectious diseases*. 2002;34(5):634-40.
- ۶۵ Costerton JW, Ellis B, Lam K, Johnson F, Khoury AE. Mechanism of electrical enhancement of efficacy of antibiotics in killing biofilm bacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1994;38(12):2803-9.
- ۶۶ Hassett DJ, Cuppoletti J, Trapnell B, Lyman SV, Rowe JJ, Yoon SS, et al. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced drug delivery reviews*. 2002;54(11):1425-43.
- ۶۷ Wood DW, Pierson LS. The phzI gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene*. 1996;168(1):49-53.
- ۶۸ Raad I, Chatzinikolaou I, Chaiban G, Hanna H, Hachem R, Dvorak T, et al. In vitro and ex vivo activities of minocycline and EDTA against microorganisms embedded in biofilm on catheter surfaces. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(11):3580-5.
- ۶۹ Kite P, Eastwood K, Sugden S, Percival S. Use of in vivo-generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(7):3073-6.
- ۷۰ Banin E, Brady KM, Greenberg EP. Chelator-induced dispersal and killing of *Pseudomonas aeruginosa* cells in a biofilm. *Applied and environmental microbiology*. 2006;72(3):2064-9.
- ۷۱ Hoang TT, Kutchma AJ, Becher A, Schweizer HP. Integration-proficient plasmids for *Pseudomonas aeruginosa*: site-specific integration and use for engineering of reporter and expression strains. *Plasmid*. 2000;43(1):59-72.
- ۷۲ Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental cell*. 2002;3(4):۶۰۳-۵۹۳
- ۷۳ Barraud N, Hassett DJ, Hwang S-H, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*. 2006;188(21):7344-53.