مجله دنیای میکروب‌ها
سال دوازدهم شماره دوم (پیاپی ۳۹) تابستان ۱۳۹۸
صفحات ۱۷۱-۱۶۰

Original Article

اثر هم افزایی مهاری آنزیم آلژینات لیاز نوترکیب باکتریایی و آنتی بیوتیک های رایج درمانی بر رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا*

حدیث طوافی*[۱]، احیا عبدی عالی[۲]، پریناز قدم[۳]، سارا غروی[۳]

[۱]استادیار، دانشگاه ملایر، دانشکده ی علوم پایه، گروه زیست شناسی، [۲]دانشیار، دانشگاه الزهرا، دانشکده ی علوم زیستی، گروه میکروبیولوژی،
[۳]دانشیار، دانشگاه الزهرا، دانشکده ی علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی.

چکیده

سابقه و هدف: آلژینات، یکی از مهمترین عوامل بیماری زایی *سودوموناس آئروجینوسا* است. این مطالعه با هدف سنجش اثر هم افزایی آلژینات لیاز نوترکیب باکتریایی و آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های سودوموناسی بر رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* انجام شد.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر *سودوموناس آئروجینوسا* TAG48 از نمونه بالینی جدا سازی و شناسایی شد. به منظور تخلیص آنزیم آلژینات لیاز و اثر آن بر سلول های پلانکتونی، ژن آلژینات لیاز (*algL*) جداسازی، همسانه سازی، تعیین توالی و بیان شد و با استفاده از ستون کروماتوگرافی تمایلی تخلیص گردید. اثر آنزیم خالص شده و آنتی بیوتیک های سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و سفکسیم بر سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* بررسی شد و آزمون های حداقل غلظت مهاری، حداقل غلظت کشندگی و همچنین بررسی اثر توام آنتی بیوتیک ها و آنزیم بر سلول های یاد شده ارزیابی شد.

یافته‌ها: بررسی آنتی بیوتیک ها و آنزیم نشان دادند که MIC مربوط به سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، سفکسیم و آنزیم آلژینات لیاز در باکتری TAG48 به ترتیب ٤، ١٦، ١٢٨ و ٩/٣٧ میکروگرم بر میلی لیتر می باشد. میزان MBC نیز برابر با MIC محاسبه گردید. همچنین نتایج نشان داد که آلژینات لیاز با توبرامایسین و سفکسیم بر رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* TAG48 اثرهم افزایی مهاری دارند، اما این اثر هم افزایی با سیپروفلوکساسین دیده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به اهمیت آلژینات در بیماری زایی *سودوموناس آئروجینوسا*، تخریب آن می تواند در کاهش بیماری زایی موثر باشد. شناسایی ژن های جدید *algL* در جوامع میکروبی می تواند رویکرد جدیدی برای مطالعه و تحقیق آلژینات لیاز هایی با فعالیت های ویژه علیه آلژینات های باکتریایی در نمونه های میکروبی بالینی باشد.

واژگان کلیدی: آلژینات لیاز، مهارآنتی بیوتیکی، سلول های پلانکتونی، *سودوموناس آئروجینوسا*.

دریافت مقاله: بهمن ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: اسفند ماه ۹۷

مقدمه

باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* (*Pseudomonas aeruginosa*) باسیلی گرم منفی و پاتوژنی فرصت طلب است. این باکتری به دلیل قدرت سازشی بالا به طور منحصر به فرد توانایی زیست در انواعی از محیط ها مانند زیستگاه های خاکی و آبی، بدن حیوانات و گیاهان را دارد (۱).

* آدرس برای مکاتبه: ملایر، دانشگاه ملایر، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی
تلفن: ۰۸۱۳۳۳۳۹۸۴۱ پست الکترونیک: hadistavafi@yahoo.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

سودوموناس آئروجینوسا یکی از مهمترین پاتوژن های انسانی شناخته شده انسانی است که می تواند موجب عفونت های حاد و مزمن چشم، گوش، پوست، دستگاه ادراری، تنفسی در بیماران فیبروز سیستیک، عفونت زخم های سوختگی و عفونت در افراد دارای نقص ایمنی شود (۲).

به دلیل بالا بودن میزان مرگ و میر ناشی از عفونت های مرتبط با این باکتری، چالش های درمانی را به خود اختصاص داده است. با وجود پاسخ های التهابی و درمان های آنتی بیوتیکی مؤثر و طولانی مدت، ریشه کنی این باکتری به طور واقعی غیر ممکن است . یکی از دلایل سازگاری قابل توجه *سودوموناس آئروجینوسا* به شرایط مختلف، اندازه بزرگ ژنوم بزرگ و داشتن ٦٠٠٠ ژن است که می تواند تنوع مسیرهای متابولیکی، فاکتورهای ویرولانس، تشدید افلاکس و کموتاکسی در این باکتری را به دنبال داشته باشد (۳).

همچنین توانایی برجسته ی این باکتری برای تشکیل بیوفیلم در اکثر محیط ها باعث شده است که درمان های ضد سودوموناسی، کارایی لازم را ندلشته باشد و بدین ترتیب شرایط برای مزمن شدن بیماری فراهم می گردد(٤).

تشکیل بیوفیلم شامل ٤ مرحله است که به ترتیب اتصال اولیه، اتصال برگشت ناپذیر، بلوغ و پراکندگی را شامل می شود. در مرحله ی اول و مرحله ی چهارم، سلول های پلانکتونی حائز اهمیت هستند.بیوفیلم ها با توجه به ساختار پیچیده ی خود، امروزه یکی از مهمترین نگرانی های درمان محسوب می شوند. بنابراین در صورت مهار مرحله اول و چهارم بیوفیلم، می توان در راستای برطرف کردن این نگرانی درمانی امیدوار بود. ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی *سودوموناس آئروجینوسا* آن را در برابر بسیاری از فعالیت های باکتریوسیدالی آنتی بیوتیک ها مقاوم کرده و باعث شده است که نسبت به درمان های رایج آنتی بیوتیک ها مقاوم تر شود و توانایی بیشتری برای فرار از سیستم ایمنی میزبان داشته باشد (۵).

بنابراین مطالعه در این زمینه یکی از جنبه های مهم در علم پزشکی است. از دیرباز مصرف و استفاده از آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های *سودوموناس آئروجینوسا*، مهمترین و کارآمد ترین روش برای درمان بوده است (٦).

اگزوپلی ساکارید آلژینات، یکی از فاکتورهای ویرولانس سویه های بالینی *سودوموناس آئروجینوسا* جدا شده از ریه بیماران فیبروز سیستیک است. این پلیمر در پایداری ساختاری و حفاظت بیوفیلم ها نقش های مهمی را دارد. تولید بیش از اندازه ی آلژینات می تواند موجب مقاومت به آنتی بیوتیک ها گردد (۷).

آنزیم آلژینات لیاز، یکی از پلی ساکارید لیازها (PLs) تجزیه کننده آلژینات است. این آنزیم از طریق واکنش β- elimination اتصال گلیکوزیدی آلژینات را تخریب کرده و موجب تجزیه ی آلژینات می شود (۸ و ۹). آلژینات لیاز ها دارای ویژگی سوبسترایی مختلفی می باشند. از این رو این آنزیم ها براساس ویژگی های سوبسترایی به گروه های Poly M- specific lyase، Poly G- specific lyase و Poly MG- specific lyase طبقه بندی شده اند (۱۰).

براساس مطالعات گذشته، این آنزیم ها می توانند فعالیت باکتری کشی آنتی بیوتیک ها را افزایش دهند، به طوری که مشاهده شده در بیماران فیبروز سیستیک، هم زمان با کاهش ویسکوزیته کشت های جدایه های بالینی، فاگوسیتوز افزایش می یابد. هم چنین از بین رفتن *سودوموناس آئروجینوسا* به وسیله سلول های ایمنی انسانی نیز افزایش یافته و کارایی انواع آنتی بیوتیک های ضد سودوموناسی نیز می یابد. مجموع این گزارش ها، کاربرد آلژینات لیاز ها را در درمان عفونت های مزمن *سودوموناس آئروجینوزا* بیشتر مشخص می کند (۱۱ و ۱۲).

مطالعات نشان داده است که آلژینات لیاز، نقش مهمی در کنترل طول پلیمر آلژینات و بهینه سازی واکنش پلیمریزاسیون در فرآیند بیوسنتز آلژینات ایفا می کند (۱۳). موتانت های *سودوموناس آئروجینوسا* فاقد ژن *algL*، در مقایسه با نوع وحشی میزان کمتری آلژینات تولید می کنند. این یافته ها فرضیه ی مبنی بر اینکه ژن *algL* *سودوموناس آئروجینوسا* در تولید الیگوساکارید های کوتاه به عنوان پرایمرهایی برای ساخت زنجیره های جدید آلژینات و تعیین طول زنجیره پلیمر

شرکت دارند را تقویت می کند (١٤).

آنتی بیوتیک ها علیه سلول هایی که در سطح بیوفیلم قرار دارند و معمولاً در حالت فعال عمل می کنند، مؤثر هستند و فعالیت آنها در نواحی میانی و عمقی بیوفیلم که سلول ها دارای فعالیت متابولیکی کمتری هستند، کاهش می یابد. بنابراین می توان با از بین بردن سلول های سطحی (آماده برای تبدیل به حالت پلانکتونی) ناپایداری بیوفیلم را افزایش داد (١٥). با توجه به تدابیر درمانی حاضر، افزایش شدت بیماری زایی و مقاومت علیه آنتی بیوتیک های شناخته شده نیز از مشکلات مهم در طراحی داروها و راه های درمانی می باشد (١٦).

از آنجایی که تولید بیش از اندازه ی آلژینات در بیوفیلم *سودوموناس آئروجینوسا* می تواند مقاومت به آنتی بیوتیک را به دنبال داشته باشد و با توجه به نقش سلول های پلانکتونی در سطح بیوفیلم و توانایی این نوع سلول ها برای انتشار باکتری (در اواخر مرحله ی پراکندگی بیوفیلم)، هدف از این پژوهش ارزیابی اثر هم افزایی آلژینات لیاز در ترکیب با آنتی بیوتیک ها به منظورمهار رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* بود.

مواد و روش ها

الف) شناسایی و تعیین ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی باکتری مورد مطالعه: ابتدا تعداد ٢٥ جدایه موکوئیدی *سودوموناس آئروجینوسا* از نمونه های سوختگی، نمونه های خلط، خون و ادرار بیماران بستری در بیمارستان های شهید مطهری، شهید رجایی و شهید مصطفی خمینی در تهران تهیه شد. به منظور شناسایی نمونه های *سودوموناس آئروجینوسا* آزمون های بیوشیمیایی افتراقی شامل آزمایش اکسیداز، کاتالاز، بررسی همولیز در محیط آگار خون دار، تجزیه ی قند های گلوکز، ساکارز و لاکتوز، آزمون های OF، سیترات، SIM، TSI و رشد در ٤٢ $^{\circ}$C انجام شد (١٩).

به منظور شناسایی مولکولی باکتری های غربالگری شده، استخراج ژنوم از باکتری های کشت داده شده در محیط LB مایع که به مدت یک شبانه روز در دمای ٣٧ $^{\circ}$C و دور ١٥٠ rpm گرماگذاری شده بودند، انجام گردید. استخراج ژنوم باکتری ها با استفاده از کیت PCR Template Purification Kit (Kiagen, Iran) انجام شد. برای تأیید وجود DNA در نمونه ها و شناسایی مولکولی جدایه ها، آزمون کنترل مرکزی با استفاده از پرایمرهای 27 F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' و 1492R: 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT- 3' (١٧) بر طبق برنامه واکنش توسط ترموسایکلر (PEQ star): حرارت اولیه ٩٥C$^{\circ}$ به مدت ١٠ دقیقه و ٣٥ سیکل متشکل از ٩٤C$^{\circ}$ به مدت ٦٠ ثانیه، ٥٨C$^{\circ}$ به مدت ٣٠ ثانیه و ٧٢ C$^{\circ}$ به مدت ٦٠ ثانیه و مرحله ی پایانی ٧٢C$^{\circ}$ به مدت ١٠ دقیقه، با ترکیب مواد واکنش: بافر 10X PCR به میزان ٢/٥ میکرولیتر، پرایمر ها در غلظت ١ میلی مولار به میزان ٠/٢٥ میکرولیتر، DNA در غلظت ٥ نانو گرم بر میکرولیتر به میزان ١ میکرولیتر، $MgCl_2$ در غلظت ٥٠ میلی مولار به میزان ٠/٧٥ میکرولیتر، آنزیم Taq پلی مراز به میزان ٠/٢٥ میکرولیتر، dNTP در غلظت ١٠ میلی مولار به میزان ٠/٥ میکرولیتر، آب مقطر به میزان ١٩/٥ میکرولیترانجام شد (١٧).

ب) بررسی وجود ژن algL در ژنوم جدایه های مورد مطالعه: ترادف قسمت انتخاب شده از ژن *algL* حدود ١١٠٤ نوکلئوتید بود، که از ابتدا وانتهای این ژن (.NC_002516.2) ، پرایمرهای *AlgL*F:5'-ATGAAAACGTCCCACCTGATCCG-3' و *AlgL*R: 5'-TCAACTTCCCCCTTCGCGGC-3' طراحی و به منظور غربالگری جدایه های مثبت حامل ژن مورد نظر، استفاده شدند. برنامه ی واکنش شامل حرارت اولیه ٩٤C$^{\circ}$ به مدت ٥ دقیقه قرار داده شد و ٣٥ سیکل متشکل از ٩٤C$^{\circ}$ به مدت ٣٠ ثانیه، ٦٤C$^{\circ}$ به مدت ٥٠ ثانیه و مرحله ی پایانی ٧٢C$^{\circ}$ به مدت ١٠ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR بعد از استخراج از ژل، توسط کیت Gel/PCR DNA Isolation System (Viogene, Taiwan)، به وسیله شرکت ژن فناوران تعیین توالی شدند. نتایج تعیین توالی مربوط به ژن ها، با استفاده از blastn پایگاه داده NCBI همترازی شدند. در میان جدایه ها، سویه *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48 (KX458102) برای بررسی های بیشتر انتخاب شد.

ج) همسانه سازی و بیان پروتئینی قطعات حاصل از تکثیر ژن algL: به منظور همسانه سازی ژن *algL* از پلاسمید pET-28a برای بیان ژن مورد نظر و از نرم افزار آنلاین NEB cutter (http://tools.neb.com/NEBcutter2)، دو آنزیم برش دهنده *Hind*III و *Eco*RI (فاقد جایگاه برش بر روی توالی) به منظور برش و همچنین پیوند زدن ژن به درون حامل استفاده شد. با توجه به نقشه ناقل انتخابی، برای پرایمر رفت جایگاه آنزیم برش دهنده *Eco*RI و برای پرایمر برگشتی جایگاه آنزیم برش دهنده *Hind*III قرار داده شد. پس از بهینه سازی و اطمینان از انجام واکنش تکثیر قطعات ژنی، محصول واکنش زنجیره ای پلی مراز با استفاده از کیت استخراج ژل (شرکت Bioneer, Korea)، جداسازی شد (۱۸). به منظور پیوند زدن قطعات هدف با حامل برش خورده با استفاده از دستورالعمل آنزیم لیگاز شرکت Promega (آمریکا) مقدار پلاسمید و محصول واکنش زنجیره‌ای پلی مراز مورد نیاز برای واکنش پیوند زدن محاسبه گردید. ترانسفورماسیون سلول‌های میزبان *E.coli* B121-DE3 با DNA نوترکیب انجام شد. کلنی های رشد کرده در محیط دارای کانامایسین، انتخاب شدند و در نهایت استخراج پلاسمید های نوترکیب انجام شد و به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن مورد نظر برای تعیین توالی به شرکت ژن فن آوران ارسال شد (۱۷).

به منظور بیان ژن نوترکیب در ناقل انتخابی، از غلظت IPTG (۱ میلی مولار)، دمای گرماگذاری (۳۷ درجه سلسیوس)، زمان القای (٦ ساعت) استفاده شد و پروتئین های حاصل از بیان ژن به کمک SDS-PAGE آنالیز شدند. تخلیص پروتئین های نوترکیب به کمک ستون کروماتوگرافی میل ترکیبی Mini IMAC Bio-Scale (Bio-Rad, Canada) صورت گرفت و برای تعیین غلظت پروتئین موجود در محلول های به دست آمده از روش برادفورد استفاده شد (۱۸).

د) بررسی اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها بر سویه انتخابی سودوموناس آئروجینوسا TAG 48 : به منظور بررسی حساسیت سویه ی انتخابی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در درمان عفونت های ریوی و سودوموناسی، آزمون انتشار دیسک با استفاده از سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم) و سفکسیم (۵ میکروگرم) انجام شد و و میزان حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها طبق روش استاندارد CLSI M100- S22 (2012) تعیین و از سویه استاندارد *P. aeruginosa* ATCC 27853 به عنوان کنترل استفاده شد (۱۹).

ه) تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) سلول‌های پلانکتونی: برای تعیین MIC آنتی بیوتیک ها و آنزیم آلژینات لیاز نوترکیب بر رشد سلول های پلانکتونی از روش میکرودیلوشن در میکروپلیت ۹٦ خانه ای استفاده شد (۱۹).

و) تعیین حداقل غلظت کشندگی (MBC) سلول‌های پلانکتونی: برای تعیین MBC آنتی بیوتیک ها و آنزیم آلژینات لیاز نوترکیب بر رشد سلول های پلانکتونی از چاهک‌های فاقد کدورت به میزان ۱۰µl بر روی محیط MHA (مرک، آلمان) کشت داده شد و به مدت ٢٤ ساعت در دمای ۳۷ °C گرماگذاری شد (۲۰).

ز) بررسی اثر هم‌افزایی به روش Checkerboard در مهار رشد سلول های پلانکتونی: بررسی اثر هم زمان آنتی بیوتیک و آنزیم آلژینات لیاز بر مهار رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48 با تکنیک رقیق سازی Checkerboard انجام شد. در این روش هر ردیف افقی به یک تراکم از آنتی بیوتیک و هر ردیف عمودی به تراکم از آنزیم اختصاص داده شد. رقت‌های مورد نظر از آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم (جدول ۱) با استفاده از محیط کشت TSB (مرک، آلمان) حاوی ۰/۲٪ گلوکز به عنوان ماده رقیق کننده به صورت جداگانه تهیه شد. از MIC به دست آمده برای هریک از آنتی بیوتیک ها و آنزیم به عنوان مرکز رقت ها استفاده شد و از رقت های ۱/۲، ۱/٤، ۱/۸ و ۱/۱٦ و ۲، ٤ و ۸ برابر MIC مورد نظر به عنوان پیش فرض آزمون هم افزایی استفاده گردید. به هر چاهک پلیت ۵۰ µl از هر رقت آنتی بیوتیک ها و آنزیم اضافه شد. در نهایت ۱۰۰µl سوسپانسیون باکتری به چاهک ها اضافه شد. هر پلیت حاوی کنترل های مثبت و منفی بود. پلیت‌های‌میکروتیتر آماده شده به مدت ٢٤ ساعت در ۳۷ °C

جدول ۱: آزمون ارزیابی وجود اثر هم‌افزایی.

آنتی‌بیوتیک	آنزیم آلژینات لیاز
توبرامایسین (µg/mg ۲۵۶–۱)	آلژینات لیاز (µg/mg ۷۵–۱/۱۷)
سفکسیم (µg/mg ۲۰۴۸–۱۶)	آلژینات لیاز (µg/mg ۷۵–۱/۱۷)
سیپروفلوکساسین (µg/mg ٦٤–١)	آلژینات لیاز (µg/mg ۷۵–۱/۱۷)

گرماگذاری شده و پس از این مدت برای تعیین MIC مورد استفاده قرار گرفتند (۲۱). با استفاده از فرمول FMIC هر آنتی‌بیوتیک و آنزیم و مجموع ∑FMIC برای موارد مورد بررسی، وجود یا عدم وجود اثر هم‌افزایی محاسبه شد.

مقدار ∑FMIC تعیین کننده نوع اثر استفاده همزمان دو عامل خواهد بود. به این ترتیب که:

$$FMIC\ (A) = \frac{MIC\ (A\ in\ the\ presence\ of\ B)}{MIC\ (A\ alone)}$$

$$FMIC\ (B) = \frac{MIC\ (B\ in\ the\ presence\ of\ A)}{MIC\ (B\ alone)}$$

$$\sum FMIC = FMIC\ (A) + FMIC\ (B)$$

∑FMIC ≥ ۰/۵ نشان دهنده وجود اثر هم‌افزایی است.

∑FMIC > ٤ نشان دهنده وجود اثر آنتاگونیسمی است.

٤ > ∑FMIC > ۰/۵ نشان دهنده بی تفاوتی میان آنتی‌بیوتیک و آنزیم مورد بررسی است (۲۲).

ح) آنالیز آماری: اختلافات معنی دار به وسیله ی آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA one- way) با مقایسه های pairwise با استفاده از روش Tukey تعیین شد. یک p≤ ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار در نظر گرفته شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار های Prism 5 و Mini Tab 17 انجام شد.

یافته‌ها

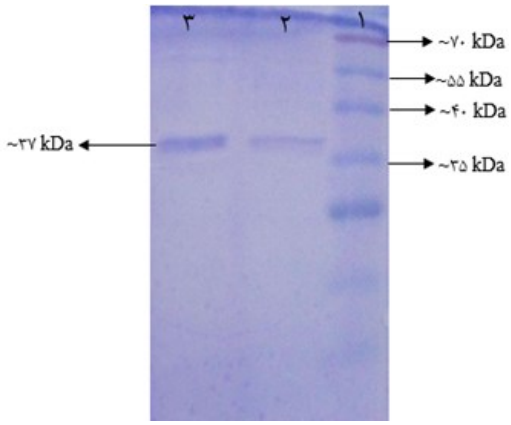
الف) جداسازی و شناسایی جدایه سودوموناس آئروجینوسا: نتایج آزمون های بیوشیمیایی انجام شده برای تمامی جدایه های بالینی مورد تائید قرار گرفت و به دلیل ویژگی های برتر آنزیم آلژینات لیاز باکتری TAG48 در بررسی هایی بیوشیمیایی (پایداری دمایی در درجه حرارت C ۸۰° به مدت ٤ ساعت و همچنین دارای ویژگی سوبسترایی دو عملکردی) این جدایه انتخاب شد.

به منظور شناسایی دقیق تر جدایه ی انتخابی، DNA ژنومی باکتری، هدف تکثیر ژن *16S rRNA* قرار گرفت، نتایج هم ترازی *سودوموناس آئروجینوسا* را تائید نمود. واکنش زنجیره ای پلی مراز ژن آلژینات لیاز در مورد تمام جدایه های بالینی اجرا شد. در نهایت با توجه به تمام ویژگی های بیوشیمیایی و فیزیولوژی مورد بررسی در مورد جدایه ها، سویه *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48 (دارای فعالیت آنزیمی مناسب در دماهای مختلف نسبت به سایر جدایه های دیگر) به عنوان کاندیدای مناسب برای مطالعات بعدی انتخاب شد. نتیجه تعیین توالی ژن مربوطه با مشخصات KX458102 در بانک ژنی در NCBI ثبت شد (۱۸).

ب) همسانه سازی قطعه تکثیر شده در ناقل pET-28a و تخلیص پلاسمید از همسانه های به دست آمده: پس از ترانسفورماسیون محصول واکنش با روش شوک حرارتی به سلول های میزبان *E.coli* BL21(DE3)، غربال گری روی محیط LB آگار حاوی کانامایسین انجام شد. پس از غربالگری، پلاسمیدها به روش کافت قلیایی تخلیص شدند. واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای ویژه ژن *algL* در پلاسمیدهای نوترکیب به عنوان DNA الگو برای همسانه های به دست آمده، انجام شد. تعیین توالی قطعه ی همسانه سازی شده، ژن *algL* انجام شد. بررسی های انجام شده حاکی از شباهت ۹۸٪ قطعه ژنی همسانه سازی شده با توالی اصلی ژن *algL* بود. قطعه تعیین توالی شده، برای ادامه کار مناسب ارزیابی شد.

ج) بیان ژن نوترکیب و تخلیص پروتئین هدف: تولید پروتئین نوترکیب در ساعات مختلف پس‌از القا در *E.coli* BL21 (DE3) مورد بررسی قرار گرفت و به منظور تخلیص پروتئین نوترکیب هدف، از ستون کروماتوگرافی گرایشی Mini IMAC Bio-Scale استفاده شد و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه تخلیص پروتئین نوترکیب AlgL در شکل ۱ نشان داده شده است (۱۸).

د) بررسی اثر ضد میکروبی آنتی بیوتیک ها: به منظور بررسی حساسیت جدایه انتخابی نسبت به آنتی بیوتیک های رایج در



شکل ۱: SDS-PAGE پروتئین نوترکیب AlgL تخلیص شده. ستون ۱) نشانهٔ اندازه مولکولی پروتئین (۱۸۰–۱۰ کیلو دالتون). ستون های ۲ و ۳) نمونهٔ خروجی ستون پس از بارگذاری مایع روماند حاوی پروتئین نوترکیب.

درمان عفونت های ریوی، آزمون انتشار دیسک انجام و میزان حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها طبق روش استاندارد CLSI تعیین شد. نتایج نشان داد که سویه *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48 نسبت به آنتی بیوتیک های ایمی پنم، سیپروفلوکساسین و سفتازیدیم حساس و نسبت به آمیکاسین نیمه حساس می باشد.

ه) نتایج تعیین حداقل غلظت مهار کننده رشد (MIC): نتایج حاصل از این بررسی در جدول ۲ نشان داده شده است. آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین نسبت به سایر فاکتور های دیگر تاثیر معنی داری بر مهار رشد سلول های پلانکتونی نشان داد و در درجه دوم توبرامایسین اثر بخشی بیشتر داشت ($p\leq 0.05$).

و) نتایج تعیین MBC: میزان MBC در چاهک‌های فاقد کدورت بر محیط مولر هینتون آگار در جدول ۳ نشان داده شده است.

ز) نتایج بررسی وجود هم افزایی به روش Checkerboard. نتایج ارزیابی هم افزایی آنتی بیوتیک ها و آنزیم در جدول ٤ نشان داده شده است. هم چنین از چاهک‌هایی که رشد در آن‌ها مشاهده نشد، کشت و میزان Σ FMBC محاسبه شد. نتایج نشان دادند که Σ FMIC= Σ FMBC است. آنتی بیوتیک سیپروفلوکساسین در مقایسه با آنتی بیوتیک های دیگر همراه با آلژینات لیاز، بر مهار رشد اثر آنتاگونیسمی را نشان داد.

بحث

آلژینات مهمترین اگزوپلی ساکاریدی است که در ماتریکس بیوفیلمی سودوموناس قرار دارد (۲۳). جدایه های *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48. که به شکل موکوئیدی هستند، از بیان بالای آلژینات برخوردار هستند که نقش مهم و حفاظتی برای باکتری در شرایط سخت محیط ریه بیماران CF بازی می کند و احتمالاً این نقش آلژینات، به دلیل شرکت آن در تشکیل بیوفیلم است (۲٤).

آلژینات لیاز آنزیمی است که میکروارگانیسم های تجزیه کننده آلژینات و تولید کننده بیوفیلم آلژیناتی قادر به تولید آن هستند. این آنزیم توسط منابع مختلفی از جمله جلبک های دریایی، نرم تن های دریایی، قارچ ها، باکتری ها، باکتریوفاژ ها و ویروس ها تولید می شود (۲۵).

در مطالعات گذشته گزارش شده است که در میان باکتری ها، *باسیلوس سیرکولانس*، *کلبسیلا نمونیه*، گونه های مختلف *سودوموناس* و *سودوموناس آئروجینوسا* قادر به سنتز آنزیم

جدول ۲: میزان MIC آنتی بیوتیک ها و آنزیم آلژینات لیاز بر باکتری مورد مطالعه در محیط MHB با روش Broth Microdilution.

آنتی‌بیوتیک و آنزیم	دامنه غلظت µg/ml	MIC (µg/ml)	
		P.aeruginosa PAO1	*P.aeruginosa* TAG48
سفکسیم	۱–۵۱۲	۱۲۸	۱۲۸
توبرامایسین	۰/۵–٦٤	۸	۱٦
سیپروفلوکساسین	۰/۵–٦٤	۲	٤
آنزیم آلژینات لیاز	۰/۵–۱۵۰	۳۷/۵	۹/۳۷

جدول ۳: میزان MBC آنتی بیوتیک ها و آنزیم آلژینات لیاز بر باکتری مورد مطالعه در محیط MHA.

آنتی‌بیوتیک و آنزیم	دامنه غلظت µg/ml	MBC (µg/ml)	
		P.aeruginosa PAO1	*P.aeruginosa* TAG48
سفکسیم	۱–۵۱۲	۲۵٦	۱۲۸
توبرامایسین	۰/۵–٦٤	۸	٦٤
سیپروفلوکساسین	۰/۵–٦٤	۲	٤
آنزیم آلژینات لیاز	۰/۵–۱۵۰	۳۷/۵	۳۷/۵

جدول ٤: وجود هم افزایی آنتی بیوتیک ها با آنزیم آلژینات لیاز در میزان MIC بر جدایه ی *سودوموناس آئروجینوزا* TAG.

آنتی‌بیوتیک‌ها و آلژینات لیاز	اثر هم افزایی	MICبه تنهایی (µg/ml)	MICدر ترکیب با آنزیم (µg/ml)
سفکسیم	دارد	۱۲۸	۳۲
آلژینات لیاز		۹/۳۷	۲/۳٤
توبرامایسین	دارد	۱٦	٤
آلژینات لیاز		۹/۳۷	۲/۳٤
سیپروفلوکساسین	ندارد	٤	–
آلژینات لیاز		۹/۳۷	

آلژینات لیاز هستند (۲٦).

با توجه به اهمیت آلژینات به عنوان یکی از عوامل ویرولانس *سودوموناس آئروجینوسا* و نقش آن در تشکیل بیوفیلم، راهکاری مانند تجزیه آن و همچنین کاهش اثرات آن در پایداری بیوفیلم ها مورد بررسی قرار گرفته است.

مطالعات فراوانی در مورد غربالگری و مطالعه ی باکتری های تولید کننده آلژینات لیاز انجام شده است. امروزه ریشه کنی و مهار بیوفیلم بزرگترین نگرانی در درمان محسوب می شود، بنابراین بررسی ویژگی های آنزیمی آلژینات لیاز و اثر گذاری آن بر بیوفیلم های پایدار و همچنین سلول های پلانکتونی سهیم در تشکیل بیوفیلم، می تواند از راهکار های مقابله با اثرات مضر بیوفیلم باشد. در مطالعه حاضر از میان ۲۵ نمونه جدا شده از بیماران، *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48، بر اساس داشتن ویژگی های بیوشیمیایی و مولکولی مطلوب، انتخاب شد و بررسی های بیوشیمیایی، آزمون های افتراقی و مولکولی تأیید کننده این بود که جدایه متعلق به گونه *سودوموناس آئروجینوسا* و دارای ژن سنتز کننده آلژینات لیاز است.

مطالعات فراوانی در مورد روش های مختلف بیوشیمیایی و مولکولی برای بررسی آنزیم های داخل و خارج سلولی آلژینات لیاز وجود دارد که امروزه بیشتر از روش های مولکولی برای همسانه سازی ژن آلژینات لیاز، بیان آن و تخلیص آنزیم لیاز استفاده می شود (۲۷).

افتخار (Eftekhar) و همکاران در سال ۱۹۸۸ آنزیم آلژینات لیازی را از باکتری *باسیلوس سیرکولانس* استخراج کردند و بر عصاره خام آنزیم با استفاده از روش رسوب دادن با آمونیوم سولفات ۷۰٪ تخلیص نسبی پروتئین را انجام دادند. این گروه از کروماتوگرافی تعویض یونی بر ستون DEAE- sephacel به منظور تخلیص بیشتر استفاده کردند و پروتئینی با وزن مولکولی تقریباً ۵۰ کیلو دالتون را تخلیص کردند که آنزیم تخلیص شده بر تجزیه بیوفیلم *سودوموناس آئروجینوسا* موکوئیدی تاثیر گذار بوده و توانسته بود اگزوپلی ساکارید سویه های موکوئیدی را تجزیه کرده و فاگوسیتوز را افزایش دهد (۲۷).

کانکو (Kaneko) و همکاران در سال ۱۹۹۰ توانستند دو نوع آنزیم آلژینات لیاز را از کشت مخلوط باکتری های *فلاوو باکتریوم*، *آلکالیژنز* و *باسیلوس* از نمونه خاک جداسازی و تخلیص کنند. این گروه عصاره ی سلولی را از ستون DEAE- cellulose گذراندند و پس از بررسی باSDS- PAGE وزن مولکولی آنزیم ها را تخمین زدند. آنزیم ها دارای وزن مولکولی ۵۵ و ۸۸ کیلو دالتون بودند (۲۸).

مطالعات ژنتیکی بر روی میکروارگانیسم های تولید کننده آلژینات لیاز، نشان می دهد که ژن های آلژینات لیاز، در جایگاه ژنی سایر ژن های موثر در سنتز آلژینات قرار گرفته اند (۱۲). از جمله باکتری هایی که در این زمینه بیشتر مورد بررسی قرار گرفته است، *سودوموناس آئروجینوسا* می باشد. مطالعات نشان داده است که در بیوسنتز آلژینات، آلژینات لیاز، نقش مهمی در کنترل طول پلیمر آلژینات و بهینه سازی واکنش پلی مریزاسیون ایفا می کند (۲۹).

در مطالعه حاضر ژن آلژینات لیاز سویه منتخب *سودوموناس آئروجینوسا* TAG 48 شناسایی، جداسازی و تکثیر شد. سپس این ژن در باکتری *E.coli* DH5α همسانه سازی شد و بعد از بیان در باکتری *E.coli* BL21 پروتئین حاصل توسط ستون کروماتوگرافی تمایلی IMAC Bio-Scale Mini تخلیص شد و نتایج با SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت و وزن مولکولی پروتئین، تقریبا ۳۷ کیلو دالتون گزارش شد. در سال ۲۰۰۹ در مطالعه کیم (Kim) و همکاران، ویژگی های آلژینات لیازی در باکتری دریایی گونه *استرپتومایسس* 5 -ALG تعیین شد. آنها

ژن *algL* این باکتری را با استفاده از PCR با پرایمرهای اختصاصی طراحی شده از توالی های نوکلئوتیدی همولوگ، همسانه سازی کردند و بعد از بیان ژن و تخلیص پروتئین و بررسی با کمک روش SDS- PAGE وزن مولکولی پروتئین را ۳۲ کیلو دالتون تخمین زدند (۳۰) که این یافته با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی دارد.

همانطور که اشاره شد، . بیوفیلم ها از جمله مشکلات مهم در درمان هستند. بنابراین اگر بتوان مرحله ی اول و مرحله چهارم تشکیل بیوفیلم را مهار کرد، می توان در راستای برطرف کردن این نگرانی درمانی امیدوار بود (۵).

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که از میان آنتی بیوتیک های بررسی شده (سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و سفکسیم) بر سلول های پلانکتونی، سیپروفلوکساسین نسبت به دو آنتی بیوتیک دیگر فعال تر عمل کرده است و توبرامایسین در مقام دوم اثرگذاری قرار دارد که این خود می تواند با فعالیت فلوروکینولونی سیپروفلوکساسین آن مرتبط باشد که توانایی نفوذ در بیوفیلم های باکتری های در حال رشد و زنده را دارد. لوتز (Lutz) و همکاران در سال ۲۰۱۲، MIC و MBIC آنتی بیوتیک های سفتازیدیم، سیپروفلوکساسین، توبرامایسین، ایمی پنم و مروپنم را بر ٦٨ جدایه بالینی بررسی کردند و نشان دادند که مروپنم در بین آنتی بیوتیک های مورد مطالعه، فعال ترین آنتی بیوتیک در شرایط پلانکتونی است و حال آنکه سیپروفلوکساسین فعال ترین آنتی بیوتیک در شرایط بیوفیلمی می باشد (۵).

امروزه ترکیبات ضد میکروبی و بیوفیلمی متنوعی شناخته شده اند که اثرات موثری در فعالیت های ضد بیوفیلمی از خود نشان می دهند. علاوه بر ترکیبات ضد میکروبی مصنوعی و ساختگی، ترکیبات طبیعی نیز وجود دارند که بر تشکیل بیوفیلم ها اثر می گذارند (٤).

آنزیم های ضد میکروبی تولید شده توسط خود میکروب ها در پراکندگی و گسیختگی ماشین سلولی باکتریایی و مهار تشکیل بیوفیلم نیز اثر گذار هستند (۳۱). بیش از دو دهه است که آلژینات لیاز به عنوان کاندیدای درمانی برای عفونت های *سودوموناس آئروجینوسا* موکوئیدی معرفی شده است. در مطالعه حاضر، اثر سیپروفلوکساسین، توبرامایسین و سفکسیم به تنهایی و در ترکیب با آلژینات لیاز بر مهار رشد سلول های پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* بررسی شد.

نتایج نشان داد که سیپروفلوکساسین به تنهایی نسبت به ۳ تیمار دیگر بهتر عمل کرده است و حال آنکه توبرامایسین و سفکسیم همراه با آلژینات لیاز، اثر هم افزایی را نشان دادند. سیپروفلوکساسین به تنهایی بر مهار رشد پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* نسبت به هر کدام از عوامل مورد بررسی مؤثر تر عمل کرده است. اما همراه با آلژینات لیاز هیچ گونه اثر هم افزایی نشان نداد و در مهار رشد پلانکتونی *سودوموناس آئروجینوسا* اثر آنتاگونیسمی نیز نشان داد.

در مطالعه کاتن (Cotton) و همکاران، سیپروفلوکساسین همراه با آلژینات لیاز به طور معنی داری بر مهار رشد سلول و ریشه کنی بیوفیلم اثر گذار بود (۳۲). اما در مطالعه حاضر اثر سیپروفلوکساسین در ریشه کنی بیوفیلم و مهار رشد سلول های پلانکتونی، با نتایج آن ها سازگار نمی باشد. بر اساس نتایج حاصل از پژوهش حاضر، می توان گفت که تجزیه ی آنزیمی آلژینات بوسیله ی آلژینات لیاز، اثر آنتی بیوتیک های توبرامایسین و سفکسیم را افزایش می دهد و می توان پیشنهاد کرد که استفاده از آلژینات لیاز در ترکیب با توبرامایسین و سفیکسیم ممکن است در مقابله با عفونت های *سودوموناس آئروجینوسا* مفید باشد.

در مطالعه ما نیز مشابه مطالعه تسنگ (Tseng) و همکاران، سیپروفلوکساسین نسبت به سایر آنتی بیوتیک ها در غلظت های ٤ میکروگرم بر میلی لیتر توانایی اثر معنی داری بر هر دو حالت پلانکتونی و بیوفیلمی سلول ها نشان داده است که این اثر مرتبط با بار خنثی این آنتی بیوتیک و نفوذ راحت آن به بیوفیلم است و توبرامایسین در مقایسه با سیپروفلوکساسین به ترتیب در غلظت های ١٦ و ٦٤ میکرو گرم بر میلی لیتر بر سلول های پلانکتونی و بیوفیلمی اثر خود را نشان داد (۳۳).

بر اساس یافته های تسنگ (Tseng) و همکاران می توان نتیجه گرفت که توبرامایسین پاسخ تنشی موضعی را تحریک می کند

و باکتری ها را در بیوفیلم محیطی (حاشیه ای) از بین می برد و در بیوفیلم عمقی اثر چندانی ندارد.

نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از آنزیم آلژینات لیاز به همراه برخی آنتی بیوتیک ها می توانند به عنوان یکی از ابزار های مفید در درمان عفونت های *سودوموناس آئروجینوسا*، مورد استفاده قرار گیرد همچنین شناسایی ژن های جدید *algL* از جوامع میکروبی می تواند رویکرد های جدیدی برای مطالعه و تحقیق آلژینات لیاز هایی با فعالیت های ویژه علیه آلژینات های باکتریایی از نمونه های میکروبی بالینی باشد و شناخت مکانیسم مقاومت آنتی بیوتیکی و نقش ساختاری بیوفیلم به پزشکان این اجازه را می دهد تا در روش های درمانی و شیمی درمانی خود بهترین راه درمانی را انتخاب کنند.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده ها و داده سازی را در این مقاله رعایت کرده اند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از حمایت مالی دانشگاه الزهرا در انجام این پژوهش کمال تشکر و قدردانی را دارند.

تعارض در منافع

وجود ندارد

References

1. Khan NH, Ahsan M, Taylor WD, Kogure K. Culturability and survival of marine, freshwater and clinical *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Environ. 2010; 25(4): 266-274.
2. Tashiro Y, Yawata Y, Toyofuku M, Uchiyama H, Nomura N. Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. Microbes Environ. 2013; 28(1): 13-24.
3. Silby MW, Winstanley C, Godfrey SA, Levy SB, Jackson RW. *Pseudomonas* genomes: diverse and adaptable. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(4): 652-680.
4. Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. BioMed Res Int. 2015; 2015.
5. Lutz L, Pereira DC, Paiva RM, Zavascki AP, Barth AL. Macrolides decrease the minimal inhibitory concentration of anti-pseudomonal agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients in biofilm. BMC Microbiol. 2012; 12(1): 1.
6. Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH. Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. Appl Environ Microbiol. 2011; 77(15): 5238-5246.
7. Wei Q, Ma LZ. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Mol Sci. 2013; 14(10): 20983-31005.
8. Wong TY, Preston LA, Schiller NL. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. Annu Rev Microbiol. 2000; 54(1): 289-340.

9. Shankar T, Sivakumar T, Satya C, Ponmanickam P. Purification, characterization and immobilization of alginase produced by *Bacillus* sp associated with *Sargassum wightii*. Universal J Microbiol Res. 2016; 4(1): 11-22.

10. Zhu B, Yin H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure -function analysis and applications. Bioengineered. 2015; 6(3): 125-131.

11. Park HH, Kam N, Lee EY, Kim HS. Cloning and characterization of a novel oligoalginate lyase from a newly isolated bacterium *Sphingomonas* sp. MJ-3. Mar Biotechnol. 2012; 14(2): 189-202.

12. Kim HS, Lee C-G, Lee EY. Alginate lyase: structure, property, and application. Biotechnol Bioprocess Eng. 2011; 16(5): 843-851.

13. Ghadaksaz A, Fooladi AAI, Hosseini HM, Amin M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. J Appl Biomed. 2015; 13(1): 61-68.

14. Preis J, Ashwell G. Alginic acid metabolism in bacteria. J Biol Chem. 1962; 237: 309-316.

15. English BK, Gaur AH. The use and abuse of antibiotics and the development of antibiotic resistance. Hot Topics in Infection and Immunity in Children VI: Springer; 2010. p. 73-82.

16. Chatterjee M, Anju C, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG, Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int J Med Microbiol. 2016; 306 (1): 48-58.

17. Tavafi H, Abdi-Ali AA, Ghadam P, Gharavi S. Screening of alginate lyase-producing bacteria and optimization of media compositions for extracellular alginate lyase production. Iran Biomed J. 2017; 21(1): 48.

18. Tavafi H, Ali AA, Ghadam P, Gharavi S. Screening, cloning and expression of a novel alginate lyase gene from P. aeruginosa TAG 48 and its antibiofilm effects on *P. aeruginosa* biofilm. Microb Pathog. 2018; 124: 356-364.

19. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 22nd Informational Supplement. CLSI Document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne, Pennsylvania; 2012.

20. Lorian V. Antibiotics in laboratory medicine: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.

21. Sabaeifard P, Abdi-Ali A, Soudi MR, Dinarvand R. Optimization of tetrazolium salt assay for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm using microtiter plate method. J Microbiol Methods. 2014; 105: 134-140.

22. Shafiei M, Ali AA, Shahcheraghi F, Saboora A, Noghabi KA. Eradication of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using the combination of n-butanolic cyclamen coum extract and ciprofloxacin. Jundishapur J Microbiol. 2014; 7(2):e14358.

23. May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. Clin Microbiol Rev. 1991; 4(2): 191-206.

24. Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Proc Natl Acad Sci. 2003; 100(13): 7907-7912.

25. Dong S, Yang J, Zhang XY, Shi M, Song XY, Chen XL. Cultivable alginate lyase-excreting bacteria associated with the arctic brown alga Laminaria. Mar Drugs. 2012; 10(11): 2481-2491.

26. Hatch RA, Schiller NL. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 1998; 42(4): 974-977.

27. Eftekhar F, Speert DP. Alginase treatment of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* enhances phagocytosis by human monocyte-derived macrophages. Infect Immun. 1988; 56(11): 2788-2793.

28. Kaneko Y, Yonemoto Y, Okayama K, Kimura A, Murata K. Symbiotic formation of alginate lyase in mixed culture of bacteria isolated from soil. J Biosci Bioeng. 1990; 69(3): 192-194.

29. May TB, Chakrabarty AM. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. Trends Microbiol. 1994; 2(5): 151-157.

30. Kim DE, Lee EY, Kim HS. Cloning and characterization of alginate lyase from a marine bacterium *Streptomyces* sp. ALG-5. Mar Biotechnol. 2009; 11(1): 10-16.

31. Thallinger B, Prasetyo EN, Nyanhongo GS, Guebitz GM. Antimicrobial enzymes: an emerging strategy to fight microbes and microbial biofilms. Biotechnol. J. 2013; 8(1): 97-109.

32. Cotton LA, Graham RJ, Lee RJ. The role of alginate in *P. aeruginosa* PAO1 biofilm structural resistance to gentamicin and ciprofloxacin. J Exp Microbiol Immunol. 2009; 13: 58-62.

33. Tseng BS, Zhang W, Harrison JJ, Quach TP, Song JL, Penterman J. The extracellular matrix protects *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by limiting the penetration of tobramycin. Environ Microbiol. 2013; 15(10): 2865-2878.

Journal of Microbial World
Volume 12, No. 2, July 2019

Original Article

Evaluation of the synergistic effect of bacterial recombinant alginate lyase and therapeutic antibiotics on the growth of planktonic *Pseudomonas aeruginosa*

Hadis Tavafi[1], Ahya Abdi-Ali[2], Parinaz Ghadam[3], Sara Gharavi[3]

[1]Assistant professor, Department of Biology, Faculty of science, Malayer University, Malayer, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.
[3]Associate Professor, Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Tehran, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Alginate is one of the most important virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa*. This study aimed to evaluate the synergistic effect of recombinant alginate lyase and common antibiotics in the treatment of *Pseudomonas* infections on the growth of planktonic cells of *P. aeruginosa*.

Materials & Methods: In this study, *P. aeruginosa* TAG48 was isolated and identified from the clinical sample. To purify alginate lyase and its effect on planktonic cells, the alginate lyase gene (*algL*) was isolated, cloned, sequenced and expressed. The resultant enzyme was purified by affinity chromatography. The ciprofloxacin, tobramycin, and cefixime were also used to test the effectiveness of these antibiotics on planktonic cells of *P. aeruginosa* by carrying out MIC, MBC. The synergistic effects of these antibiotics and the recombinant alginate lyase enzyme on planktonic cells were evaluated.

Results: Our results indicated that the antibiotics and the enzyme have shown MIC for ciprofloxacin, tobramycin, cefixime and enzyme in the following concentrations: 4, 16,128 and 9.37 µg/ml, respectively. MBC was also calculated equal to MIC. Also, alginate lyase exhibited synergy with tobramycin and cefixime on the growth of planktonic cells of *P. aeruginosa* TAG48 but not with ciprofloxacin.

Conclusion: Regarding the importance of alginate in the pathogenicity of *P. aeruginosa*, its degradation could reduce this characteristic of the bacteria. Detection of novel *algL* genes in bacterial communities can also lead the way for the study of alginate lyases with specific activities against alginates from pathogenic bacteria in microbial samples.

Keywords: Alginate lyase, Antibiotic inhibition, Planktonic cells, *Pseudomonas aeruginosa*.

Correspondence to: Hadis Tavafi

Tel: +98 33339841

E-mail: hadistavafi@yahoo.com

Journal of Microbial World 2019, 12(2): 160-171.

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.