دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۱، صفحه ۱۳ - ۱ (فروردین و اردیبهشت ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(1): 1-13

شناسایی ژن‌های مقاومت به فلزات سنگین و تاثیر ذرات نانو آهن بر بیان آن در *سودوموناس آئروجینوسا* به روش Real time-PCR

مرضیه رستمی (MSc)[1*]، کیومرث امینی (PhD)[2**]، بابک خیرخواه (PhD)[3]

[1] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد سیرجان، دانشگاه آزاد اسلامی، سیرجان،- ایران
[2] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران
[3] گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد کرمان، دانشگاه آزاد اسلامی، کرمان، ایران

(دریافت مقاله: ۹۷/۱۰/۲۲- پذیرش مقاله: ۹۸/۸/۱۲)

چکیده

زمینه: فلزات سنگین از طریق فعالیت‌های صنعتی به محیط زیست وارد می‌گردند و باعث آلودگی اکوسیستم‌های طبیعی می‌شوند. شناسایی باکتری‌های مقاوم به فلزات سنگین نقش مهمی در رابطه با آلودگی محیط و در نهایت پاکسازی آن ایفا می‌نماید. لذا، هدف از مطالعه حاضر جداسازی ژن‌های مقاوم به فلزات سنگین سودوموناس *آئروجینوسا* و تأثیر ذرات نانو آهن بر بیان ژن آن به روش **Real time-PCR** می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه توصیفی- مقطعی، تعداد ۶۰ جدایه *سودوموناس آئروجینوسا* تحت مطالعه قرار گرفت. فراوانی ژن **czr** به روش **PCR** تعیین شد. همچنین اثرات نانوپارتیکل آهن بر بیان ژن **czr** به روش **Real-time PCR** پس از استخراج **RNA** ارزیابی گردید.

یافته‌ها: در این مطالعه تعداد ۲۵ جدایه حامل ژن **czr** بودند. همچنین نانوذره آهن توانست در محیط آزمایشگاهی بیان ژن مقاومت به فلزات سنگین را در سودوموناس *آئروجینوسا* کاهش دهد.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که مقاومت گونه‌های مختلف باکتری سودوموناس آئروژینوزا به فلز سنگین کادمیوم متفاوت است.

واژگان کلیدی: سودوموناس *آئروجینوسا*، فلزات سنگین، ژن **czr**، **Real-time PCR**

*ساوه، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی، ساوه، ایران.

Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
***ORCID: 0000-0002-5659-3584**
****ORCID: 0000-0003-2579-6618**

مقدمه

سطح جهانی آلودگی محیطی به فلزات در دو قرن اخیر به شدت افزایش یافته است. حضور برخی از فلزات سنگین در اکوسیستم‌ها، تهدیدی همیشگی برای سلامت جوامع بشری است. زیست پالایی که در آن از میکروب‌ها جهت سمیت‌زدایی و تجزیه آلاینده‌های زیست محیطی استفاده می‌شود، گزینه‌ای مناسب جهت جایگزینی استراتژی‌های فیزیکوشیمیایی فعلی برای حذف فلزات سنگین است (۱).

از آنجایی که میکروارگانیسم‌ها روش‌های مختلفی جهت زنده باقی ماندن در محیط‌های آلوده به فلزات دارند، بنابراین مکانیسم‌های سمیت‌زدایی آن‌ها متفاوت است. برخی از این استراتژی‌ها عبارتند از: تجمیع زیستی، جذب زیستی، فروشویی زیستی تبدیل زیستی و معدنی‌سازی زیستی، از این استراتژی‌ها می‌توان در محل آلودگی و یا خارج از محل آلودگی برای آلودگی‌زدایی استفاده نمود (۲).

نانو ذرات آهن صفر ظرفیتی عوامل احیاء کننده قوی می‌باشند و توانایی احیای ترکیبات آلی کلردار و سایر ترکیبات آلی را دارند. از ویژگی‌های این روش فراوانی و سهولت دسترسی به تجمیع زیستی؛ عدم افزایش مواد شیمیایی مضر به محیط زیست جهت حذف کلروفنل و فنل و سادگی حذف آهن افزوده شده به سیستم می‌باشد. از طرف دیگر در مقایسه با روش‌های متداول حذف کلروفنل این روش از هزینه کمتری برخوردار است و همچنین انتظار می‌رود کارایی این روش از سایر روش‌های حذف کلروفنل بالاتر باشد.

در مجموع مزایا بر شمرده شده به کاربرد این روش جهت حذف کلروفنل ویژگی خاصی خواهد داد. اندازه ذره یک ویژگی نسبتاً مهم ذرات در جذب و واکنش با آلاینده‌ها است بنابراین هرچه اندازه ذره کمتر و سطح مقطع ذره بیشتر شود میزان واکنش‌پذیری این ذرات افزایش می‌یابد. نانوذرات آهن به دلیل سطح مؤثر بالا، میزان آلاینده را به‌صورت قابل توجه‌ای کاهش می‌دهد (۳).

روش‌های متعددی مثل پوشش دادن اکسیدآهن با طلا، پلیمر و سیلیکا برای اصلاح سطح نانوذرات اکسیدآهن استفاده شده است، در این بین سیلیس پرکاربردترین ماده برای پوشش است، زیرا ترکیب آن از نظر شیمیایی پایدار است و مانع از اکسیدشدن نانوذره آهن و پراکنده شدن نانوذرات اکسید آهن در محلول می‌شود (۴).

به علت خاصیت زیست سازگاری و سوپرپارامغناطیسی اکسیدآهن این ماده بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در میان اکسیدهای آهن Fe_3O_4 به لحاظ زیست سازگاری از همه مطمئن‌تر است. نانو ذرات مغناطیسی اکسید آهن به دلیل پایداری شیمیایی بالا، زیست سازگاری مطلوب و نیز فرآیند تولید نسبتاً ساده در زمینه پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. تولید نانوذرات با شیوه‌های متفاوتی قابل دستیابی است.

یکی از روش‌های تولید نانوذرات، روش زیستی با استفاده از قارچ‌ها، باکتری‌ها، مخمرها، ویروس‌ها و همچنین گیاهان می‌باشد. استفاده از باکتری‌ها به عنوان منبع تولید ارزان قیمت نانوذرات آهن کاملاً مطابق با اصول شیمی سبز می‌باشد. سادگی، سرعت بالا، عدم نیاز به دستگاهای گران قیمت و سازگاری با محیط زیست از مهم‌ترین مزایا می‌باشد. در سنتز زیستی، دیواره سلولی میکروارگانیسم‌ها نقش اصلی در سنتز نانوذرات بازی می‌کند. دیواره سلولی با بار منفی از لحاظ الکتریسیته ساکن با یون‌های فلزی با بار مثبت تأثیر متقابل دارد و باعث کاهش زیستی یون‌های فلزی به نانوذرات می‌شوند (۵ و ۶).

نانو موادی که در تحویل آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود دارای مزیت چندگانه ۱- توزیع شکل یکنواخت در بافت

هدف ۲- بهبود قابلیت حل شدن ۳- رهاسازی کنترل شده و تحمیل شده را دارند. علاوه بر این، گزارش شده که نانوذرات با اندازه کوچک فعالیت ضد میکروبی خوبی نشان داده است.

سودوموناس‌ها یکی از مهم‌ترین جنس‌های موجود در خانواده سودوموناداسه محسوب می‌شوند. تولید زیستی نانوذرات زمینه جدیدی برای محققین به شمار می‌رود. با توجه به اندازه کوچک، نانوذرات می‌توانند خصوصیات فیزیکی- شیمیایی فلزات را اصلاح کنند. بیشترین توجهات روی نانو ذرات، به‌علت همین ویژگی‌ها بوده است. سنتز نانوذرات می‌تواند با استفاده از روش‌های متنوعی به‌وسیله روش‌های شیمیایی، الکتروشیمیایی، اشعه دهی γ، فتوشیمیایی و غیره انجام شود. سنتز نانوذرات CDS و PBS به‌وسیله باکتری‌ها و مخمر به‌صورت موفقیت‌آمیزی انجام شده است (۷).

خصوصیات متابولیک باکتری‌ها، آن‌ها را قادر می‌سازد، نقش مهمی را در تجزیه زیستی مواد مضر ایفا نمایند. حذف زیستی فلزات سنگین توسط باکتری‌ها یک روش مناسب جهت کاهش این آلودگی‌ها می‌باشد. بررسی مکانیسم جذب در جدایه‌ها نشان داد که گروه‌های عاملی نظیر کربوکسیل، آمید، کربونیل و هیدروکسیل در حذف فلزات سنگین از محیط رشد مؤثر بودند؛ بنابراین این جدایه‌ها می‌توانند در تصفیه پساب صنایع و پاکسازی مناطق آلوده به فلزات سنگین به‌ویژه سرب، کادمیوم، نیکل، مس و روی به کار برده شوند. همچنین این باکتری‌ها می‌تواند گزینه مناسبی برای تولید نانوذرات باشند (۲).

مقاومت به کبالت، روی و کادمیوم توسط کلاستر czc کد می‌شود. کلاستر ژنی czcNICBADRS داری ۸ کلاستر OFR می‌باشد و شامل؛ CzcB، CzcC، CzcI، CzcN، CzcR، CzcD، CzcA و CzcS می‌باشند. CzcC، CzcB و CzcA پروتئین‌های ساختاری یک آنتی‌پورتر کمواسموتیک سه جزئی افلاکس پمپ که به صورت فعالی سبب انتقال کاتیون‌ها به سمت خارج می‌شود (۸). در این پژوهش جدایه باکتریایی مقاوم به سرب، کادمیوم، نیکل، مس و روی از مناطق آلوده جداسازی شد. هدف از این مطالعه شناسایی ژن‌های مقاومت به فلزات سنگین و تأثیر ذرات نانو آهن بر بیان آن در سودوموناس آئروجینوسا به روش Real time-PCR بود.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۶۰ جدایه سودوموناس *آئروجینوسا* از نمونه‌های سوختگی با سوآپ استریل در آزمایشگاه‌ها و بیمارستان‌های سطح شهر تهران جمع‌آوری و تعیین هویت شدند. حجم نمونه (N) مورد بررسی در این پروژه بر اساس داده‌هایی چون: میزان شیوع سویه‌های سودوموناس *آئروجینوسا* در نمونه‌های بالینی و اطلاعات چاپ شده و در دسترس تعیین شد.

کشت، جداسازی و تعیین هویت باکتری‌ها: کلونی‌های مشکوک به سودوموناس آئروژینوزا جداسازی و جهت انجام تست‌های بیوشیمیایی بر روی محیط‌های سیمون سیترات، SIM، MRVP و اوره کشت گردید و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نتایج قرائت گردید. با انجام تست‌های تکمیلی، اکسیداز، کاتالاز و کشت بر روی محیط‌های اختصاصی سیتریماید آگار و LB براث از شرکت مرک آلمان تشخیص داده شدند (۹).

آزمون واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز جهت شناسایی ژن کد کننده مقاومت به فلزات سنگین: به منظور شناسایی ژن‌های کد کننده مقاومت به فلزات سنگین از روش واکنش‌های زنجیره‌ای پلیمراز انجام شد. به منظور

تکثیر ژن‌های هدف، ابتدا DNA ژنومی سویه‌ها با استفاده از کیت CinnaPure-DNA (سیناکلون، ایران) استخراج گردید. جهت تأیید درجه خلوص DNA استخراج شده از دستگاه بیوفتومتر (Bio-Rad ،USA) استفاده گردید. توالی الیگونوکلئوتیدی از آغازگرهای موجود (توالی پرایمر 5′-AARACIGGIACIYTIACIAARGGIG-3′:5′→ و 5′- GIGCRTCRTTIACICCRTCICCIA-3′ در ژن هدف czr به طول آمپلیکون (bp) 655 استفاده شد (۱۰). پس از BLAST آغازگرهای انتخاب شده در سایت NCBI، واکنش PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۵/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی Taq DNA polymerase (میکرولیتر/ واحد ۰/۰۵) (۳ میلی‌مول) MgC۱۲ و (میلی‌مول ۰/۴)dNTPs ۱ میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۱ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانوگرم) و ۱۰/۵ میکرولیتر آب دوبار تقطیر استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر (اپندورف، آلمان) برای ۳۴ سیکل به صورت زیر انجام گرفت؛ با انتخاب برنامه مرتبط به صورت ذیل عمل گردید: گام اول واسرشت اولیه ۹۴ درجه سانتی‌گراد ۵۰ ثانیه، گام دوم اتصال آغازگر ۵۶ درجه برای ۳۰ ثانیه، گام سوم گسترش اولیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۲ دقیقه و یک گسترش نهایی ۷۲ درجه برای ۱۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در پایان، محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر) الکتروفورز گردید.

تعیین میزان بیان ژن czr در حضور نانوذرات آهن با روش Real-Time PCR: قبل از انجام واکنش زنجیره‌ای پلیمراز Real-time به میزان میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ۰/۱ از نانو ذره آهن تجاری از شرکت دانش‌بنیان کاوش یاران فن پویا تهیه شد. سپس میزان حجم ۲۰ میلی‌لیتر از BHI براث ریخته و معادل نیم مک فارلند به آن باکتری سودوموناس *آئروجینوسا*، czr مثبت اضافه شد. پس از ۱۵ ساعت انکوباسیون، (Late log phase) بهترین مرحله برای استخراج RNA است. پس از گذشت ۱۵ ساعت استخراج RNA انجام شد. جهت بررسی کمی RNA استخراج شده از روش جذب نوری ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر استفاده شد.

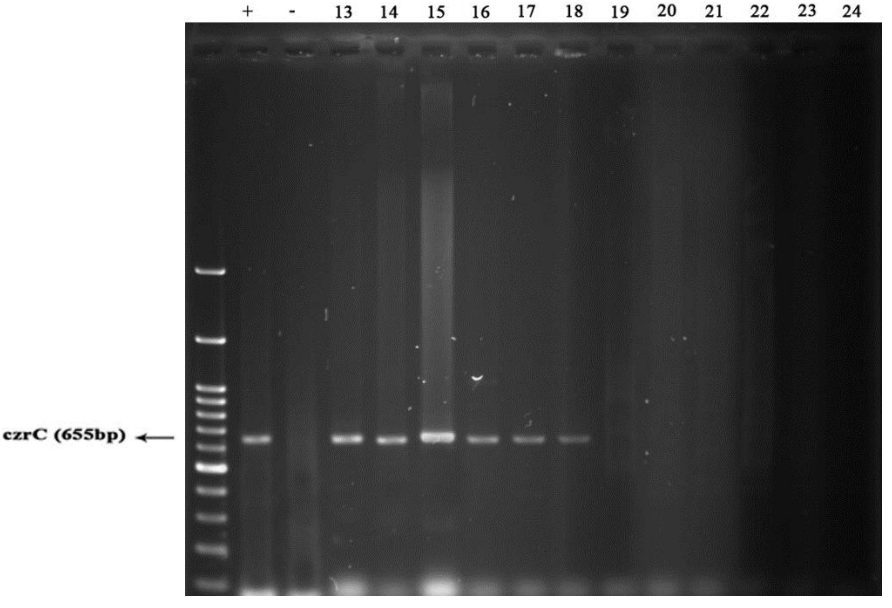
واکنش زنجیره ای پلیمراز در حجم ۲۰ میکرولیتر با استفاده از کیت شرکت (Genet bio CAT. NO: Q9210) کره چنوبی به صورت زیر انجام شد: ۱۰ میکرولیتر از Prime Qmaster mix (2x) with syber green، ۵ میکرولیتر از Depc water، ۱ میکرولیتر از پرایمر فوروارد، ۱ میکرولیتر از پرایمر ریورس، ۱ میکرولیتر از Rox dye و ۲ میکرولیتر از CDNA استفاده شد. تکثیر قطعه‌های مورد نظر در دستگاه Corbet از کشور استرالیا با برنامه دناتوراسیون اولیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱ دقیقه، تکثیر شامل ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد برای ۶۰ ثانیه در ۳۵ چرخه انجام شد. از ژن خانگی بتا اکتین به‌عنوان کنترل داخلی تست استفاده شد. سپس برای محاسبه میزان بیان ژنی و رسم نمودارهای مربوطه از نرم‌افزار REST ویراش ۳ و مقدار بیان ژن هدف محاسبه شد. آنالیز میزان بیان با اندازه‌گیری نسبی بیان mRNA در مقایسه با سویه استاندارد انجام شد (۱۱).

یافته‌ها

آزمایش‌های بیوشیمیایی بر روی نمونه‌های جداسازی شده انجام گرفت و نتایج به شرح زیر به دست آمد: در این پژوهش ۶۰ نمونه مورد بررسی قرار گرفت. معیار

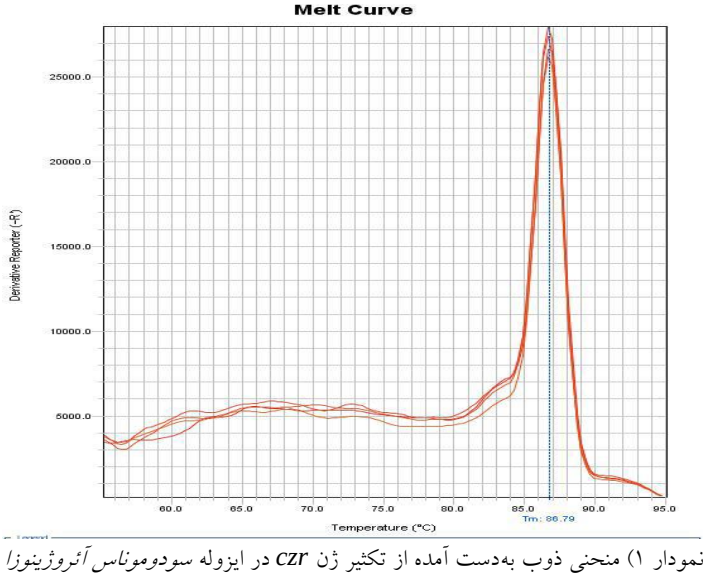
تأیید جدایه‌های سودوموناس *آئروجینوسا* ویژگی‌های مورفولوژیک و بیوشیمیایی این باکتری بود.

نتایج PCR جهت شناسایی فراوانی ژن czr: آزمون PCR صورت گرفته با پرایمرهای czr با طول باند bp ۶۵۵ بر روی نمونه‌های سودوموناس *آئروجینوسا* انجام و مشخص گردید که صرفاً در ۲۵ نمونه (۴۱/۶۶ درصد) حاوی ژن czr بوده‌اند (شکل ۱).



شکل ۱) نتایج PCR جهت شناسایی ژن *crz* با طول باند bp ۶۵۵، شماره چاهک‌ها به ترتیب از چپ به راست: چاهک اول نشانگر bp۱۰۰، چاهک +C؛ کنترل مثبت، چاهک -C؛ کنترل منفی و چاهک ۱۳ تا ۲۴ نمونه‌های تحت مطالعه.

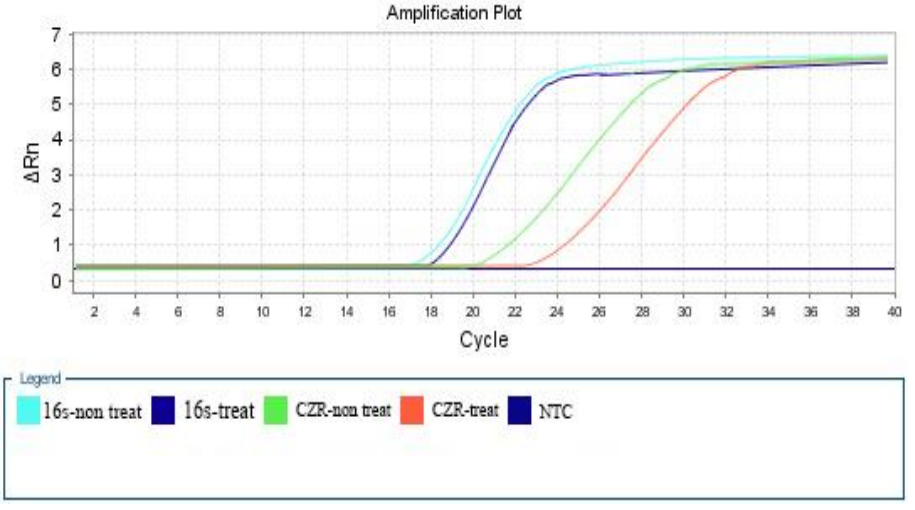
نتایج بیان ژن crz با روش qRT-PCR: نتایج آنالیز Real time- PCR نشان داد که بهترین دمای منحنی ذوب (Melting curve) برای ژن czr، ۸۶/۷۹ درجه سانتی‌گراد بود (نمودار ۱).



نمودار ۱) منحنی ذوب به‌دست آمده از تکثیر ژن *czr* در ایزوله *سودوموناس آئروژینوزا*

Fig 1) Melting curve obtained from czr gene amplification in Pseudomonas aeruginosa isolates

نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن czr در ایزوله‌های سودوموناس *آئروجینوسا* دارای ژن czr تیمار شده با نانوذره آهن نسبت به ایزوله تیمار نشده با نانوذره آهن پایین‌تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت نانوذره آهن در کاهش بیان ژن czr در ایزوله‌های مقاوم بوده است (نمودار ۲).



نمودار ۲) نتایج Real Time PCR برای ژن *crz* در ایزوله‌های *سودوموناس آئروژینوزا* تیمار شده و تیمار نشده با نانوذره آهن

Fig 2) Real time PCR results for the crz gene in Pseudomonas aeruginosa isolates treated and untreated with iron nano-particles

جدول ۱) مقادیر حاصل از Real Time PCR

Expression Fold Change	دلتا دلتا Ct اندازه	اندازه △Ct(کنترل)	اندازه △Ct (Experimental)
2 ^-△△Ct	△△Ct	△CTC	△CTE
۰/۴۲۶۳۱۷۴۴۶	۱/۲۳	۳/۶۰	۴/۸۳

نتیجه‌ای که از جدول ۱ به‌دست می‌آید آن است که بیان ژن در سلول‌های تیمار (treat) در مقایسه با گروه غیرتیمار (untreat)، ۲/۳ برابر کاهش بیان داشته است. نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن czr در ایزوله‌های سودوموناس *آئروجینوسا* دارای ژن czr تیمار شده با نانوذره آهن نسبت به ایزوله تیمار نشده با نانوذره آهن پایین‌تر بوده است که نشان‌دهنده نقش مثبت نانوذره آهن در کاهش بیان ژن czr در ایزوله‌های مقاوم بوده است.

بحث

امروزه فعالیت‌های بشر در زمینه‌های صنعتی و کشاورزی سبب آزاد شدن مقادیر زیادی از آلاینده‌ها به‌ویژه فلزات سنگین به زیست بوم‌های آبی و خشکی شده است. تحقیقات نشان داده است که میکروارگانیسم‌های محیطی در اکوسیستم‌های طبیعی مقاومت متفاوتی نسبت به فلزات سنگین نشان می‌دهند؛ بنابراین با ورود غلظت بالای فلزات سمی به محیط تنها سویه‌های مقاوم در محیط‌های طبیعی باقی می‌مانند.

مطالعات انجام شده روی باکتری‌های محیطی مقاوم به فلزات سنگین، نقش این باکتری‌های غیربیماری‌زا در ارتباط با حفظ ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها و احتمال انتقال ژن‌ها به سویه‌های بیماری‌زا در محیط‌هایی که این باکتری‌ها در تماس هستند، می‌تواند تأثیرگذار باشد (۲).

دیکسیت (Dixit) و همکاران، در بررسی با عنوان جداسازی و بررسی مولکولی باکتری‌های حذف کننده سرب، کادمیوم، نیکل، مس و روی در آب و خاک و ارزیابی تولید نانوذرات توسط آن‌ها آلودگی محیط زیست به فلزات سنگین به یکی از عمده‌ترین مشکلات زیست محیطی تبدیل شده است (۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر این است که بیان ژن در سلول‌های تیمار در مقایسه با گروه غیرتیمار، ۲/۳ برابر کاهش بیان ژن مشاهده شد.

با افزایش سطح فلزات در محیط به علت فعالیت‌های صنعتی و اعمال کشاورزی مدرن، باکتری‌ها استراتژی‌هایی را جهت کاهش غلظت درون سلولی آلوده‌کننده‌های سمی به روش‌های مختلف دارا می‌باشند؛ بنابراین محیط‌های آلوده به فلزات سنگین دارای میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت مقاومت در برابر این فلزات هستند (۱۲).

شکیبایی و هراتی، در بررسی انباشتگی فلزات در سودوموناس *آئروجینوسا* در تشکیل نانوذرات روی سطح سلول دریافتند که کمپلکس کروم (Cr) و مس (cu) در تشکیل نانوذرات الکترون دنس با سایز ۱۰ تا ۴۰ نانومتر شرکت می‌کند (۱۳). نتایج حاصل از مطالعه حاضر این است که بیان ژن در سلول‌های تیمار در مقایسه با گروه غیرتیمار، ۲/۳ برابر کاهش بیان ژن مشاهده شد.

سلطانی و همکاران در مطالعه‌ای تحت عنوان بررسی ژن مقاومت به روی در سودوموناس استوتزری مقاوم به روی و نانوذرات اکسید روی جداسازی شده از خاک دریافتند که خاک‌های آلوده به فلزات سنگین منابع بالقوه‌ای برای جداسازی سویه‌های مقاوم به فلزات سنگین و نانواکسیدهای فلزی می‌باشند. درک اساس ژنتیکی مقاومت به فلزات سنگین در باکتری‌ها می‌تواند به استفاده بهتر از این مکانیسم‌های طبیعی برای بهبود محیط زیست همه موجودات زنده منجر گردد (۱۴).

رسوب فلزات سنگین در بافت آبزیان، گیاهان و جانوران به دلیل وجود این فلزات در آب و خاک محیط اطراف، مضرات فراوانی همچون، به خطر افتادن حیات موجودات زنده و قرارگیری در چرخه محیط زیست را با خود به‌همراه دارد. از آنجایی که انسان‌ها مصرف کننده‌های اصلی منابع غذایی هستند لذا پاک‌سازی این محیط‌ها (آب، خاک) از وجود فلزات سنگین الزامی است. استفاده از این میکروارگانیسم‌ها برای کنترل و از بین بردن فلزات سنگین از فاضلاب‌ها یکی از کاربردهایی است که مطالعه‌های زیادی را به خود اختصاص داده است (۱۵).

سودوموناس *آئروجینوسا* یکی از عوامل مهم عفونت‌های بیمارستانی به ویژه در بیماران مبتلا به نقص سیستم ایمنی و کودکان است. برای درمان عفونت‌های شدید ناشی از این باکتری، آنتی‌بیوتیک‌های متعددی نظیر آمینوگلیکوزیدها، کینولون‌ها و بتالاکتام‌ها به کار می‌روند؛ اما ظهور مقاومت و شیوع بیمارستانی سویه‌های مقاومت بسیار گزارش شده است. امروزه پمپ‌های افلاکس فعال به‌عنوان یکی از مهم‌ترین مکانیسم‌های مقاومت ذاتی و اکتسابی آنتی‌بیوتیک‌ها در باکتری‌ها مطرح شده‌اند (۱۶).

نتایج حاصل از مطالعه حاضر این است که بیان ژن در سلول‌های تیمار در مقایسه با گروه غیرتیمار، ۲/۳ برابر کاهش بیان ژن مشاهده شد.

سودوموناس آئروجینوسا دارای مقاومت ذاتی بـه بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها است، در پی درمان‌هـای تجربـی نامناسـب ارگانیسم‌هـای حساس نیز مقاوم می‌شوند که این امر به‌وسیله القائ تشکیل آنزیم‌های غیرفعال کننـده آنتی‌بیوتیک‌ها و یا موتاسـیون در ژن‌های کد کننده، پورین‌های غشای خارجی و یـا از طریـق انتقـال پلاسمیدی صورت می‌گیرد (۱۷).

کادمیوم یکی از فلزات سنگین دو ظرفیتی است که در طبیعت بیشتر در سنگ‌های معدنی همراه با روی یافت می‌شود. این عنصر از طریق فعالیت‌های معدن کاوی، استخراج و پردازش سنگ‌های معدنی روی، آبکاری فلزات، استفاده از سوخت‌های فسیلی، کودهای فسفاته و حشره‌کش‌ها در کشاورزی و از طریق فاضلاب‌های شهری و صنعتی وارد خاک می‌شود. نمک‌های کادمیوم به راحتی جذب گیاهان و سبب آسیب‌های سلولی و بافتی می‌شوند (۱۸).

اغلب مقاومت به فلزات سنگین به حضور پلاسمید مربوط می‌شود که ژن‌های مربوط به مقاومت را حمل می‌کند، به‌طوری‌که قادرند با انتقال این عناصر ژنتیکی به سویه‌های دیگر سبب گسترش مقاومت شوند (مثلاً حضور ژن پلاسمید برخی از باکتری‌های مقاوم به کادمیوم)؛ اما گاهی اوقات این مقاومت‌ها منشاء کروموزومی دارند (۱۵). در مطالعه پیش‌رو، تعداد ۶۰ نمونه سودوموناس *آئروجینوسا* به منظور بررسی حضور ژن czr وارد مطالعه شد که نتایج نشان داد که این ژن در ۲۵ ایزوله (۴۱/۶ درصد) بود.

قائم‌مقامی و همکاران، در مطالعه‌ای تحت عنوان مطالعه ژن‌های کد کنندهٔ مقاومت به کادمیوم و نیکل در سویه‌های *سودوموناس آئروجینوسا* جدا شده از فاضلاب تهران، از مجموع ۲۴۰ نمونه به‌دست آمده، از فاضلاب‌ها و پساب‌ها جمع‌آوری شده، تنها ۱۰ درصد *سودوموناس آئروجینوسا* جداسازی و خالص‌سازی گردید. نتایج نشان از آن داشت که *سودوموناس آئروجینوسای* جدا شده از فاضلاب‌های سطح تهران نسبت به میلی‌مول ۱ فلز سنگین نیکل کاملاً مقاوم بوده، اما در مقابل فلز سنگین کادمیوم مقاومتی در رنج ۶/۹ میکرومول تا ۷۹ میکرومول از خود نشان می‌داد. همچنین وجود ژن مقاوم به کادمیوم، czr در این باکتری با PCR به اثبات رسید. این مطالعه نشان داد که مقاومت گونه‌های مختلف باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* به فلز سنگین کادمیوم متفاوت است. نتایج به‌دست آمده حاکی از آن بود که باکتری مورد نظر در مقابل فلز سنگین کادمیوم مقاوم بوده، اما میزان مقاومت آن، به میزان فلز سنگین موجود در محیط زندگی آن، وابسته است (۱۹). در مطالعه پیش‌رو از مجموع ۶۰ باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* تحت مطالعه تعداد ۲۵ سویه حامل ژن czr بودند که ۴۱/۶ درصد از تمامی سویه‌ها را شامل می‌شد.

نتایج حاصل از مطالعه حاضر این است که بیان ژن در سلول‌های تیمار، در مقایسه با گروه غیرتیمار، ۲/۳ برابر کاهش بیان ژن مشاهده شد و با مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققین از قبیل رجا (Raja)(۲۰) و حسن (۲۱) مغایرت داشت که یکی از علت‌های به دست آمدن مقاومت مختلف برای باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزای* استخراج شده از مکان‌های مختلف در مطالعهٔ حاضر، می‌تواند متفاوت بودن گونه‌های آن‌ها نسبت به یکدیگر باشد؛ اما این نمی‌تواند تنها دلیل این موضوع باشد، زیرا همان‌گونه که در فوق اشاره گردید، حتی مقاومت باکتری‌های یکسان نیز (از نظر نوع و گونه، مشابه باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوسا* با گونه‌های

یکسان، نسبت به یکدیگر) که در محیط‌هایی با میزان فلز سنگین متفاوت زندگی می‌کنند، می‌تواند نسبت به یکدیگر متفاوت باشد؛ بنابراین شاید علت متفاوت به دست آمدن مقاومت باکتری‌های *سودوموناس آئروجینوسای* استخراج شده از مکان‌های مختلف شهر تهران، متفاوت بودن میزان فراوانی فلز کادمیوم در محیط زندگی آن‌ها بوده باشد.

در چند دهه اخیر، نانومواد به دلیل ویژگی‌های جدید شامل بزرگ بودن نسبت سطح به حجم و فعالیت واکنشی بالا توجه زیادی پیدا کرده است. در میان نانوذرات دیگر، اخیراً به نانوذره آهن توجهات بیشتری شده است (۲۲). نتایج حاصل از مطالعه حاضر این است که بیان ژن در سلول‌های تیمار در مقایسه با گروه غیرتیمار، ۲/۳ برابر کاهش بیان ژن مشاهده شد.

نانوذرات ارزان به جای نانوذرات فلزی گران قیمت در سطح کاربردهای میکروالکتریکی پیشنهاد می‌شوند و احتمالاً آن‌ها آخرین مواد ضدمیکروبی کشف شده‌اند.

کاربردهای مواد ضدباکتریایی در صنعت منسوجات، ضدعفونی آب، پزشکی و بسته‌بندی‌های غذایی و غیره به خوبی شناخته شده است (۲۳). برخلاف ضدعفونی کننده‌های شیمیایی معمول انتظاری نیست که نانومواد ضد میکروبی، ضدعفونی کننده‌های مضر تولید کنند. همچنین قابلیت کنترل آلودگی و عفونت نانو آنتی‌بیوتیک‌ها در محیط آزمایشگاهی و سلول زنده کشف و اثبات شده است (۲۴).

تهیه نانوذرات ضد میکروبی می‌تواند تأثیر ارزشمندی در مقایسه با سنتز آنتی‌بیوتیک‌ها داشته باشد زیرا آن‌ها پایداری بیشتر و طولانی مدت دارند. نانوذرات می‌تواند در شرایط نامساعد مانند دمای بالای استریلیزاسیون که تحت آن آنتی بیوتیک‌های مرسوم غیرفعال می‌شوند، مقاومت کنند (۲۵).

بر روی فعالیت ضدمیکروبی نانوذرات روی باکتری‌های بیماری‌زای انسان مانند اشریشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس مطالعه زیادی شده است (۲۶). تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها مشکل مهم شناخته شده است زیرا از باکتری‌ها علیه آنتی‌بیوتیک‌ها حفاظت می‌کند و به همین دلیل یکی از علل اصلی توسعه عفونت‌های مزمن به‌شمار می‌رود (۲۷). ویژگی‌های الکترواستاتیکی نانوذره و بیوفیلم روی چگونگی واکنش آن‌ها اثر می‌گذارد. نانوذرات از طریق واکنش الکترواستاتیکی می‌توانند به غشای باکتری متصل شوند و با غشای باکتری تداخل ایجاد کند و باعث تخریب کامل غشای باکتری شوند (۲۸).

آمین و گروه‌های کربوکسیل لایه پپتیدوگلیگان اجزاء ترکیب کننده اصلی دیواره باکتری هستند که با مس واکنش داده و باعث آسیب دیواره سلول می‌شوندکه یکی از مکانیسم‌های ضدمیکروبی نانوذرات به‌شمار می‌آید (۲۹).

البته مکانیسم القای فعالیت ضدباکتریایی نانوذرات اکسید فلزی به‌طور کامل شناخته نشده است؛ اما مقدار رهاسازی یون و متعاقباً تولید ROS دلیل اصلی فرض می‌شود (۲۳). هر دو مکانیسم از همانندسازی DNA و سنتز آمینواسید در میکروب‌ها جلوگیری می‌کند و باعث فعالیت ضدمیکروبی می‌شود. نتایج خاصیت ضدمیکروبی مطالعه حاضر نیز نشان داد، نانوذره اکسید آهن با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دُزهای ۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خواص ضدمیکروبی به نسبت خوبی بود و توانست تقریباً رشد تمامی باکتری‌های موجود در نمونه را مهار کند. در حالی‌که امجدی و همکاران، در مطالعه مشابه دریافتند که نانوذره اکسید مس با قطر کمتر از ۲۰ نانومتر در دُزهای ۳۰ و ۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر دارای خواص ضدمیکروبی به نسبت خوبی بود و توانست

تقریباً رشد تمامی باکتری‌های موجود در نمونه را مهار کند (۳۰).

بوندارنکو (Bondarenko) و همکاران، در تحقیق خود بیان نمودند نانوذرات اکسید مس، با آمین و گروه‌های کربوکسیل روی سطح سلول‌های میکروبی واکنش داده و همچنین در طی واکنش اکسیداسیون مس Cu (I) به Cu (II)، Ros تولید می‌کنند که باعث آزاد شدن رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود که به پروتئین‌های ضروری و DNA آسیب رسانده و باعث فعالیت ضدباکتریایی می‌شود. تغییرات مشاهده شده در توالی DNA در این تحقیق همچنین می‌توانند عاملی برای بازدارندگی رشد و چرخه سلولی از طریق بروز جهش‌ها و به دنبال آن تغییر بیان ژن‌های مرتبط با رشد و کنترل چرخه سلولی باشند (۲۶).

ندافی و همکاران، به بررسی سمیت نانوذرات اکسید روی (ZnO) و اکسید تیتانیوم (TiO2) بر روی باکتری های اشرشیاکلی ATCC ۳۵۲۱۸ و استافیلوکوک اورئوس ATCC ۲۵۹۲۳ پرداختند. این مطالعه نشان داد که سمیت حاد نانوذرات اکسید روی به مراتب بیشتر از سمیت حاد نانوذرات اکسید تیتانیوم است (۳۱). شفیع‌نیا و همکاران، به بررسی شیوع عفونت با سودوموناس آئروژینوسا در بیماران مبتلا به سینوزیت مزمن پرداخته و دریافتند که تشخیص مولکولی *Pseudomonas aeruginosa* با به‌کاربردن ژن هدف oprL یک روش مؤثر و سریع جهت شناسایی *سودوموناس آئروزینوسا* می‌باشد. مطالعات این پژوهش نشان داد، مقاومت گونه‌های مختلف باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* به فلز سنگین کادمیوم متفاوت است(۳۲).

نتیجه‌گیری

نتایج Real Time PCR نشان داد که بیان ژن czr در ایزوله‌های *سودوموناس آئروجینوسا* دارای ژن czr تیمار شده با نانوذره آهن نسبت به ایزوله تیمار نشده با نانوذره آهن پایین‌تر بوده است که نشان دهنده نقش مثبت نانوذره آهن در کاهش بیان ژن czr در ایزوله‌های مقاوم بوده است. مطالعات این پژوهش نشان داد، مقاومت گونه‌های مختلف باکتری *سودوموناس آئروجینوسا* به فلز سنگین کادمیوم متفاوت است.

سپاس و قدردانی

این مقاله از پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد میکروبیولوژی استخراج شده است. این پژوهش تحت حمایت مالی هیچ سازمان یا ارگانی نبوده و کاملاً مستقل انجام شده است. بدین‌وسیله از آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد و به‌ویژه از کارشناس ارشد میکروب‌شناسی آقای مجید صادق‌پور و نیز کلیه عزیزانی که در انجام این فعالیت علمی راهنمایی مفید و ارزنده داشتند قدردانی و تشکر می‌گردد.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

1.Eslami A, Nemati R. Removal of Heavy Metal from Aqueous Environments Using Bioremediation Technology–Review. J Health Field 2015; 3(2): 43-51. (Persian)

2.Dixit R, Malaviya D, Pandiyan K, et al. Bioremediation of Heavy Metals from Soil and Aaquatic Environment: An Overview of Principles and Criteria of Fundamental Processes. Sustainability 2015; 7(2): 2189-212.
3.Bachman G, Miller W. Iron Chelate Inducible Iron/Manganese Toxicity in Zonal Geranium. J Plant Nutr 1995; 18(9): 1917-29.
4.Yguerabide J, Yguerabide EE. Light-Scattering Submicroscopic Particles as Highly Fluorescent Analogs and their use as Tracer Labels in Clinical and Biological Applications: II. Experimental characterization. Anal Biochem 1998; 262(2): 157-76.
5.Emory SR, Nie SH. Screening and Enrichment of Metal Nanoparticles with Novel Optical Properties. J Phys Chem B 1998; 102(3): 493-7.
6.Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, et al. Single Molecule Detection Using Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS). Phys Rev Lett 1997; 78(9): 1667.
7.Martin MN, Basham JI, Chando P, et al. Charged Gold Nanoparticles in Non-polar Solvents: 10-min Synthesis and 2D Self-Assembly. Langmuir 2010; 26(10): 7410-7.
8.van der Lelie D, Hassan MT, Springael D, et al. Identification of a Gene Cluster, czr, Involved in Cadmium and Zinc Resistance in Pseudomonas Aeruginosa. Gene 1999; 238(2): 417-25.
9.Connie M, Lehman D. Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th ed. Netherlands: Elsevier, 2018, 1088.
10.Chellaiah ER. Cadmium (Heavy Metals) Bioremediation by Pseudomonas Aeruginosa: A Minireview. Appl Water Sci 2018; 8: 154.
11.Fazeli H, Moslehi V, Irajian GH, et al. Determination of Drug Resistance Patterns and Detection of bla-VIM Gene in Pseudomonas Aeruginosastrains Isolated from Burned Patients in the Emam Mosa Kazem hospital, Esfahan, Iran (2008-9). Iran J Med Microbiol 2010; 3(4): 1-8. (Persian)
12.Guo H, Luo S, Chen L, et al. Bioremediation of Heavy Metals by Growing Hyperaccumulaor Endophytic Bacterium Bacillus sp. L14 . Bioresour technol 2010; 101(22): 8599-605.
13.Shakibaie MR, Harati A. Metal Accumulation in Pseudomonas Aeruginosa Occur in the form of Nanoparticles on the Cell Surface. Iran J Biotech 2004; 2(1): 55-9. (Persian)
14.Soltani NS, Rabbani KM, Emtiazi G. Analysis of Zinc Resistance Gene in Zinc and Zinc Oxide Nanoparticles Resistant Pseudomonas Stutzeri SEE-1 Isolated from Soil. J Microb World 2015; 8(2): 139-47. (Persian)
15.Shirdam R, Khanafari A, Tabatabaee A. Cadmium, Nickel and Vanadium Accumulation by Three Strains of Marine Bacteria. Iran J Biotech 2006; 4(3): 180-7. (Persian)
16.Tyrrell C, Cohen PS. Escherichia Coli at the Intestinal Mucosal Surface, in Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens, 4th ed. American Society of Microbiology, 2007, 175-96.
17.Mihani F, Khosravi A. Isolation of Pseudomonas Aeruginosastrains Producing Metallo beta Lactamases from Infections in Burned Patients and Identification of blaIMP and blaVIMgenes by PCR. Iran J Med Microbiol 2007; 1(1): 23-31. (Persian)
18.Kermani AN, Ghasemi M, Khosravan A, et al. Cadmium Bioremediation by Metal-Resistant Mutated Bacteria Isolated from Active Sludge of Industrial Effluent. J Environ Health Sci Eng 2010; 7(4): 279-86. (Persian)
19.Ghaemmaghami HS, Salehi M, Mozaffar Sabet A. Study of Genes Encoding Resistance to Cadmium and Nickel in Pseudomonas Aeruginosa Strains Isolated from Wastewater Tehran. New Cell Mol Biotechnol J 2016; 6(24): 51-6. (Persian)
20.Mustapha MU, Sun P, Song Y, et al. Removal of Heavy Metals from Electroplating Wastewater Using Bacteria. AIP Conf Proc 2010; 1251: 109-12.
21.Hassen A, Saidi N, Cherif M, et al. Effects of Heavy Metals on Pseudomonas Aeruginosa and Bacillus Thuringiensis. Bioresource Technol 1998; 65(1-2): 73-82.

22.Aruoja V, Dubourguier HC, Kasemets K, et al. Toxicity of Nanoparticles of CuO ,ZnO and TiO2 to Microalgae Pseudokirchneriella Subcapitata. Sci Total Environ 2009; 407(4): 1461-8.

23.Beranová J, Seydlová G, Kozak H, et al. Sensitivity of Bacteria to Diamond Nanoparticles of Various size Differs in Gram-Positive and Gram-Negative Cells. FEMS Microbiol Lett 2014; 351(2): 179-86.

24.Bogdanović U, Vodnik V, Mitrić M, et al. Nanomaterial with High Antimicrobial Efficacy-- Copper/Polyaniline Nanocomposite. ACS Appl Mater Interfaces 2015; 7(3): 1955-66.

25.Bondarenko O, Ivask A, Käkinen A, et al. Sub-Toxic Effects of CuO Nanoparticles on Bacteria: kinetics, Role of Cu Ions and Possible Mechanisms of Action. Environ Pollut 2012; 169: 81-9.

26.Pelgrift RY, Friedman AJ. Nanotechnology as a Therapeutic Tool to Combat Microbial Resistance. Adv Drug Deliv Rev 2013; 65(13-14): 1803-15.

27.Landini P, Antoniani D, Burgess JG, et al. Molecular Mechanisms of Compounds Affecting Bacterial Biofilm Formation and Dispersal. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86(3): 813-23.

28.Sutherland I. Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. Microbiology 2001; 147(1): 3-9.

29.Jones N, Ray B, Ranjit KT, et al. Antibacterial Activity of ZnO Nanoparticle Suspensions on a Broad Spectrum of Microorganisms. FEMS Microbiol Lett 2008; 279(1): 71-6.

30.Amjady F, Golestani EB, Karimi F. An Investigation of the Effect of Copper Nanoparticles on E. Coli Genome by RAPD Molecular Markers. J Mol Cell Res 2015; 28(4): 475-87. (Persian)

31.Naddafi K, Zare MR, Younesian M, et al. Bioassay for Toxicity Assessment of Zinc Oxide and Titanium Oxide to Escherichia Coli ATCC 35218 and Staphylococcus Aureus ATCC 25923 Bacteria. Iran J Health Environ 2011; 4(2): 171-80. (Persian)

32.Shafienia H, Shahhosseiny MH, 2, Bayat M, et al. Evaluation of prevalence of Pseudomonas aeruginosa infection in operated patients with Chronic Sinusitis in Rasoule Akram Hospital by Polymerase Chain Reaction (PCR). Iran South Med J 2015; 18(4):720-8. (Persian)

Original Article

Detection of Heavy Metals Resistance Genes and Effects of Iron Nanoparticles on the Gene Expression in *Pseudomonas Aeruginosa* Using Real-Time PCR

***M. Rostami** (MSc)[1*], **K. Amini** (PhD)[2**], **B. Kheirkhah** (PhD)[3]*

[1] Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Sirjan Branch, Islamic Azad University, Sirjan, Iran, Iran

[2] Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran

[3] Department of Microbiology, school of Basic Sciences, Kerman Branch, Islamic Azad University, Kerman, Iran

(Received 12 Jan, 2019 Accepted 3 Nov, 2019)

Abstract

Background: Heavy metals enter the environment through industrial activities and contaminate natural ecosystems. Identification of heavy metal-resistant bacteria plays an important role in environmental pollution and ultimately cleansing it. Therefore, the aim of the present study was to isolate the resistant genes of *Pseudomonas aeruginosa* and the effects of nanoparticles on gene expression using real-time PCR.

Materials and Methods In this descriptive cross-sectional study, 60 isolates of *P. aeruginosa* were studied. Frequency of czr gene was determined by PCR. Also, the effects of iron nanoparticles on czr gene expression were evaluated by real-time PCR after RNA extraction.

Results: In this study, 25 isolates were carriers of czr gene. Also, iron nanoparticles could reduce the expression of the heavy metal resistance gene in *P. aeruginosa in vitro*.

Conclusion: This study showed that the resistance of different species of *P. aeruginosa* to the heavy metal cadmium is different.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, Heavy metals, *czr* gene, Real-time PCR.

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Rostami M, Amini K, Kheirkhah B. Detection of Heavy Metals Resistance Genes and Effects of Iron Nanoparticles on the Gene Expression in Pseudomonas Aeruginosa Using Real-Time PCR. Iran South Med J 2020; 23(1): 1-13

Copyright © 2020 Rostami, et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

***Address for correspondence:* Department of Microbiology, School of Basic Sciences, Saveh Branch, Islamic Azad University, Saveh, Iran.Email: dr_kumarss_amini@yahoo.com
*ORCID: 0000-0002-5659-3584
**ORCID: 0000-0003-2579-6618