استخلاص وتنقية بروتينات الغشاء الخارجي (البورينات) لبكتريا *Pseudomonas* species وحالات مرضية مختلفة

إشراق عبد الرزاق صالح*، علي حازم عبد الكريم* ومثنى بديع فرحان**
*كلية العلوم/ جامعة الانبار
**كلية التربية للبنات/ جامعة الانبار

الخلاصة

للبورينات دورا كبيراً في التأثير على حساسية ومقاومة البكتريا للعديد من المضادات الحياتية. تم اختيار 3 عزلات لبكتريا *P. aeruginosa*، وعزلتان تعود لبكتريا *P. fluorescens* و *P.oryzihabitans* على التوالي كمصدر لاستخلاص وتنقية وتوصيف بروتينات الغشاء الخارجي (porins). وانتخبت هذه العزلات بالاعتماد على مدى حساسيتها للمضادات وخاصة مضادي Imipinem، Ciprofloxacin. تعتمد طريقة الاستخلاص بصورة اساسية على وجود مادة الصوديوم كولايت sodium cholate و EDTA وبعدها تمت التنقية باستعمال كروماتوگرافيا الترشيح الهلامي (Sephacryl S-200). ومن ثم تعيين الوزن الجزيئي لبروتينات الغشاء الخارجي باستعمال الترحيل الكهربائي تحت ظروف ماسخه للبروتين وكان بوزن جزيئي 48 و25 كيلودالتون على التوالي بالنسبة لبورينات بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الجروح وبورينات بكتريا *P. fluorescens* المعزولة من التهاب الاذن. وسجل اعلى تركيز لبروتينات الغشاء الخارجي (porins) المنقاة جزئيا لـ *P. aeruginosa* و *P. fluorescens* هو 1.92، 1.32 ملغرام/ ملليلتر على التوالي في المستحضر النهائي.

الكلمات المفتاحية: بكتريا السيدوموناس، بورين، الاستخلاص، الترحيل الكهربائي.

E. mail: Ishraq7a@gmail.com, Alibacter1974@yahoo.com, Muthana_bba@yahoo.com

Extraction and purification of outer membrane (porins) from Pseudomonas species bacteria and different cases of patient

I. A. Saleh*, A. H. Abdul-Kareem* and M. B. Farhan**
***College of Science/ University of Anbar**
****College of Education for Woman/ University of Anbar**

Abstract

There are important role in the effect of porins to the bacterial sensitivity and resistance to antibiotic. Three isolates were selected from bacteria *P. aeruginosa*, and two isolates of bacteria *P. fluorescens* and *P. oryzihabitans*, respectively, as a source of extraction, purification and characterization of the outer membrane proteins (porins). These isolates were selected based on their sensitivity to antibiotics, especially Imipinem, Ciprofloxacin. The extraction method depends mainly on the presence of sodium cholate and EDTA and then using chromatography purification by gel filtration (Sephacryl S-200) Then the molecular weight of the outer membrane proteins (porins) determined using electrophoresis under denaturing conditions. The molecular weight of the protein was 48 and 25 KDa, respectively, for Porins of *P. aeruginosa* isolated from wounds and Porins of *P. fluorescens* isolated from otitis media in the final product, the highest concentration of the outer membrane proteins (porins) partially purified from *P. aeruginosa* and *P. fluorescens* was 1.92, 1.32 mg/ ml, respectively

Keywords: Pseudomonas, Porin, Extraction, Electrophoresis

المقدمة

البورينات عبارة عن قنوات بروتينية مملؤة بالماء تسمح بدخول المركبات المحبة للماء hydrophilic مثل السكريات، الاحماض الامينية، العديد من المضادات الحيوية الى داخل الخلية البكتيرية (1). تم التعرف على أول بورين Porin في عام 1976 م ووصف بأنه تركيب بروتيني ذات قناة داخلية، تسمح بتدفق influx غير محدد من المواد الغذائية وتعمل ايضا على إزالة المواد السامة (2). البورينات هي بروتينات بيتا β-barrel الموجودة في الغشاء الخارجي للبكتريا، والمايتوكوندريا، والبلاستيدات الخضراء (3). بروتينات الغشاء الخارجي التي تشكل porins تلعب أدوارا رئيسية في المقاومة الذاتية في البكتيريا السالبة لصبغة كرام التي يتم تغييرها في ظل التعرض للمضادات الحيوية(4). الية التدفق لداخل الخلية Influx يتم السيطرة عليها بصورة كبيرة بواسطة البورينات، وهي قنوات مائية مفتوحة ممتدة عبر الغشاء الخارجي وتسمح بالانتقال السلبي passive penetration للمواد المحبة للماء(5). وبشكل مثير للاهتمام، ممكن للعديد من المركبات ان يتم امتصاصها بوساطة متماثلات بورين OprD المتخصصة من خلال ارتباط المركبات بهذا البورين عند التراكيز الواطئة، وقدرتها على الانتشار خلال متماثلات اخرى لبورين OprD بطريقة التدرج بالتركيز (6).

المواد وطرائق العمل

تم استخلاص البورينات طبقا لما ورد في(7). حيث تم اجراء الاستخلاص والتنقية في مركز التقانة الحيوية وكلية العلوم/ جامعة النهرين خلال الفترة من 4/4/ 2015 الى 18/ 7/ 2015. تم انتخاب خمس عزلات لبكتريا *Pseudonomas* من مصادر مختلفة كما مذكور في الجدول (1) ادناه، اخذ 10 مل من كل عزلة مزروعة على وسط nutrient broth وتم تلقيحها في دوارق تحتوي 4 لتر من وسط اللوريا بروث L.B وحُضنت الدرواق بدرجة 37 م° في حاضنة هزازة Shaker incubator وبعد مرور 18 ساعة تم اجراء طرد مركزي بسرعة 6000rpm لمدة 10 دقائق ثم أُهمل الرائق وغُسل الراسب المحتوي على البكتيريا (pellet) بـ 50 مل من الماء المقطر وأُجري طرد مركزي بسرعة 6000rpm لمدة 10 دقائق وبعدها وزن الراسب للخلايا (للعزلات الخمس). بعد اجراء الطرد المركزي علق الراسب pellet للعزلات الخمس بدارئ التعليق Suspending buffer ثم اجري طرد مركزي للخلايا بسرعة 6000rpm لمدة 10 دقائق بعدها أُهمل الرائق وخلطت الخلايا (الراسب) مع 5 مل من دارئ الاستخلاص، ومن ثم تم تكسير الخلايا بجهاز Sonicator. ومن ثم اضيفت كبريتات الامونيوم ببطء وبنسبة اشباع 35% على النماذج وحرك بلطف لمدة 4 ساعة، بعدها عمل طرد مركزي وبسرعة 6000rpm لمدة 10 دقائق للتخلص من كبريتات الامونيوم واخذ المحلول الراشح.

جدول (1) يوضح عزلات *Pseudonomas sp.* المنتخبة لاستخلاص البورينات، تم اعتماد الرموز الآتية لتعريف مستخلصات البورينات في الدراسة الحالية

المصدر	العمر	الجنس	البكتيريا	رمز المستخلص البروتيني (البورينات) المشتق من كل عزلة
الحروق burn	57	ذكر	*Pseudonomas aeruginosa*	2a
الحروق burn	29	ذكر	*oryzihabitans Pseudonomas*	1o
الجروح wound	23	ذكر	*Pseudonomas aeruginosa*	1a
التهاب الاذنear swab	4	انثى	*fluoresens Pseudonomas*	1f
التربة soil	-	-	*aeruginosa Pseudonomas*	3a

اخذ 10 مل من محلول البورينات الخام المحضر سابقا وتمت تعبئته بلطف في العمود باستخدام ماصة باستور معقمة بعدها اضيف 250 مل من المحلول الدارئ لموازنته. تم استرداد 50 جزء fraction وبمعدل جريان 5 مل لكل جزء/ 3 دقائق، ثم قرأت الامتصاصية لجميع الاجزاء على طول موجي 280 نانوميتر. وهذه التعبئة تم اجرائها بنفس الخطوات لجميع نماذج البورينات الخمس (2a,1a.3a,1o,1f) وبعد ذلك تم وضع 4 مل من محلول البورينات لكل نموذج من النماذج الخمس المنقاة جزئيا (حيث اخذ الجزء الذي اعطى اعلى امتصاصية لكل نموذج) في كيس الديلزة وتم تركيزه ضد محلول يتكون من 10 mM من Tris-C1 pH له (8.0) في درجة حرارة 4 م° لمدة (2-1) ساعة لإزالة كلوريد الصوديوم والكولايت cholate. تم اجراء الترحيل الكهربائي SDS-PAGE، تم وضع هلام الترحيل resolving gel في وحدة الترحيل الكهربائي ومن ثم اضيف الايزوبروبانول لسطح الهلام، وترك الجل لمدة 45 دقيقة الى ساعة بدرجة حرارة الغرفة ليتبلمر، ومن ثم غسل سطح الجل بالماء المقطر، وبعدها اضيف هلام التراص stacking gel وبنفس الطريقة وترك ليتبلمر. ومن ثم ادخل المشط بين وحدة الجهاز وتمت ازالته بعد تصلب هلام التراص. اضيف 5 مايكروليتر من صبغة التحميل loading stain الى 15 مايكروليتر من كل نموذج لمستخلصات البورينات الخمس المنقاة جزئيا، ومن ثم تم غلي النماذج بدرجة 100 مْ لخمس دقائق، ليتم مسخ البروتينات لتساعد بذلك على ترحيلها بصورة افضل، ومن ثم اضيفت هذه البروتينات الى حافة جدار الهلام بواسطة ماصة micropipette. وتم اجراء الترحيل بدرجة حرارة 24 م وبفولتية 125 فولت وبتيار كهربائي 25 ملي امبير لمدة 1.5 ساعة. وبعد انهاء الترحيل الكهربائي تم ازالة الهلام من وحدة الترحيل الكهربائي وغمس الهلام في المحلول المثبت fixation solution لمدة 1 ساعة، وثم غمس الهلام في صبغة كومازي R-250 coomassie brilliant blue لمدة 3-1 ساعة. واخيرا غمس الهلام في محلول destaining solution لإزالة الصبغة الزائدة الى حين ظهور الحزم البروتينية الزرقاء. تم قياس حركة صبغة bromophenol blue من نقطة البداية الى مركز الحزم وايضا تم قياس حركة البروتينات القياسية من نقطة البداية الى مركز الحزم البروتينية ومن ثم تم تطبيق قانون الحركة النسبية (R_m) كالتالي.

$$R_m = \frac{\text{Mobility of protein}}{\text{Mobility of bromophenol blue}}$$

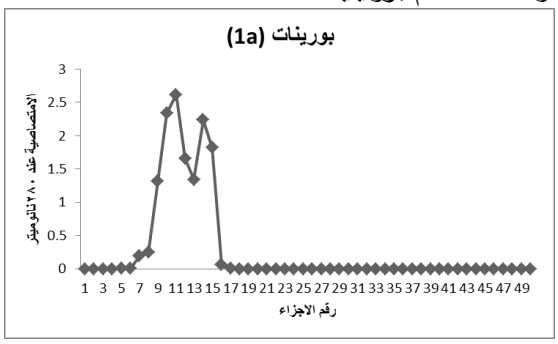
تم استخدام البروتينات القياسية للاستدلال على احجام البورينات عند ترحيلها كهربائيا

البروتينات القياسية	الوزن الجزيئي (Dalton)
Aprotinin, bovine lung	6500
α-lactalbumin, bovine milk	14200
Carbonic anhydrase, bovine erythrocytes	29000
Ovalbumin, chicken egg	45000
Phosphorylase B, rabbit muscle	97000

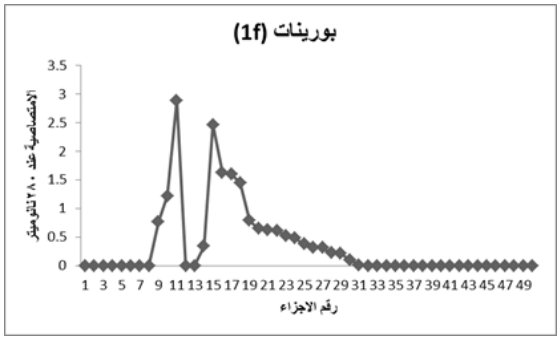
النتائج والمناقشة

تم اختيار بكتريا *Pseudomonas sp.* لاستخلاص البورينات لكونها فريدة من نوعها باستخدام البورينات المتخصصة حصريا للامتصاص خلال الغشاء الخارجي، خلافا لباقي انواع البكتريا السالبة الاخرى مثل *Escherichia coli* التي تمتلك عدد كبير من البورينات العامة (غير المتخصصة) وعدد قليل من البورينات المتخصصة(6). لقد تم تطبيق الطريقة التي وصفت من قبل (7) لاستخلاص وتنقية البورينات من الغشاء الخارجي لبكتريا *Pseudomonas* لأنه من السهولة الحصول على بورينات متجانسة homogeneous porins وبكميات عالية reproducibly وكذلك عزلها بشكل نقي نوعا ما اكثر من باقي المكونات الخلوية مثل (البروتينات والدهون). ببساطة تعتمد هذه الطريقة بشكل اساسي على الأستخلاص الانتقائي بوجود العامل الدارئ detergent

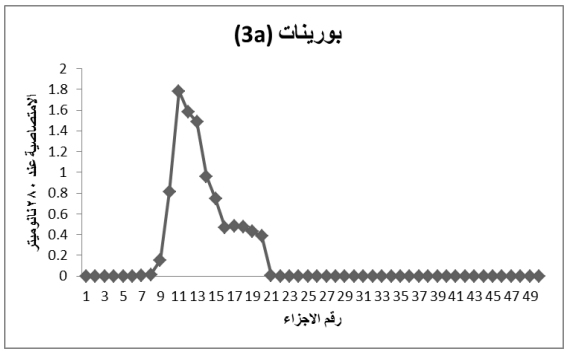
صوديوم كولايت ولقد اشار ايضا (8) الى ان الاستخلاص بالكولايت cholate مع NaCl او EDTA ثم التنقية بالترشيح الهلامي gel filteration يعتبر من الطرق المطبقة عالميا لاستخلاص تحضيرات متماثلة من البورينات من انواع بكتيرية مختلفة. استخدمت تقنية الكروموتوگرافيا في الدراسة الحالية، لإزالة الدهون متعددة السكرايد Lps من محلول البروتين(9). حيث ان اغلب طرق تنقية البورينات تعتمد على كروماتوگرافيا الترشيح الهلامي لفصل البورينات عن باقي المحتويات(10). وقد استخدم الترشيح الهلامي بوجود مادة الجل Sephacryl في الدراسة الحالية لان هذه المادة تكون ملائمة جدا للاستخدام المختبري وكذلك الصناعي لقابليتها على تحمل معدل الجريان السريع وامتلاكها استقرارية كيميائية عالية. وكذلك استخدم (7، 11) الترشيح الهلامي بوجود Sephacryl-200 لتنقية البورينات. وقد استخدم عمود Sephacryl-S-200 (1.5 X 91) سم وبسرعة جريان 5 مليلتر/3 دقيقة وتمت الموازنة بدارئ الغسل (Sodium cholate %1) وبرقم هيدروجيني 8.0 فلوحظ ظهور قمتين بروتينية عند قياس الا جزاء على طول موجي 280 في شكل (1 و2). بينما شكل (3 و4) فظهرت قمة واحدة اما شكل (5) لوحظ عدة قمم بروتينية.



شكل (1) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين (1a) المنتج من بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من الجروح



شكل (2) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين (1f) المنتج من بكتريا *P.fluorescens* المعزولة من التهاب الاذن

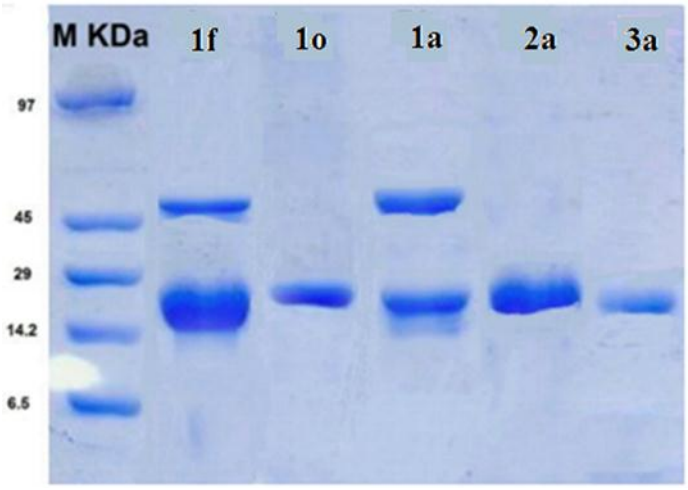


شكل (3) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين (3a) المنتج من بكتريا *P.aeruginosa* المعزولة من التربة

شكل (4) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين (1o) المنتج من بكتريا *P. oryzihabitans* المعزولة من الحروق

شكل (5) الترشيح الهلامي لتنقية بروتين البورين (2a) المنتج من بكتريا *P. aeruginosa* المعزولة من الحروق

بعد التنقية واجراء الديلزة لنماذج البورينات الخمس المنتخبة تم ترحيل البورينات كهربائيا باستخدام SDS-page وبدرجة 100 مْ لان البورينات تكون مقاومة للمسخ بواسطة SDS او المنظفات detergents الاخرى عند درجات الحرارة المنخفضة لكن في درجات الحرارة العالية يتم مسخ هذه البروتينات (12)، ولقد بينت نتائج الدراسة الحالية توافق نتائج الترحيل الكهربائي للبورينات المنتخبة (1a) و(1f) من عزلات تعود لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* و *Pseudomonas fluorecens* على التوالي مع نتائج حساسية المضادات فلقد ظهرت لكلا العزلتين الحساسة للمضاد الحيوي imipenem حزمتين بروتينية وبوزن جزيئي 48kd ربما تمثل بورين oprD، وتتفق هذه النتائج للدراسة الحالية مع (13، 14) اذ بينت نتائجهم الحصول على حزمة بروتينية بوزن جزيئي 48kd لعزلات *P.aeruginosa* الحساسة لـ imipenem. ولزيادة التأكد اكثر لوحظ ان نموذج البورينات المنقاة (3a) التي تعود للبكتريا المعزولة من التربة حيث كانت مقاومة لـ imipenem فلم تظهر اي حزمة بروتينية على الهلام عند الوزن الجزيئي 45KD شكل (6)، وذلك يتفق ايضا مع دراسات عديدة اذ بينت نتائجهم باستخدام الترحيل الكهربائي عدم ظهور حزمة بروتينية لبورين oprD عند الوزن الجزيئي 45KD لعزلات*Ps. aeruginosa* المقاومة لمضاد imipenem (15، 16، 17). وكما بين (18) ان 98% من العزلات السريرية*P. aeruginosa* المقاومة لمضاد imipenem تكون فاقدة لإنتاج بورين OprD. وقد يعزى سبب عدم وجود حزمة بروتينية بوزن 45KD لمستخلص بورينات (3a) الى احتواء التربة التي عزلت منها هذه البورينات على المعادن الثقيلة ويتفق هذا مع ما ذكره (19) ان مقاومة *Ps. aeruginosa* في التربة لمضاد imipenem تكون مقترنة بوجود انظمة الضخ التي تعمل على تدفق المعادن خارج الخلية من خلال كبح البورين porin. بينما لم تظهر اي حزمة بروتينية عند وزن جزيئي 45KD (نسبة للبروتين القياسي المستخدم في هذه الدراسة) لنموذجي (1o),(2a) شكل (6) على الرغم من حساسية عزلات هذين النموذجين لمضاد imipenem OprD. وربما يعزى سبب ذلك بالنسبة لبورينات (1o) الى عدم امتلاك بكتريا *P.oryzihabitans* لبورين oprD او قلة التعبير عن انزيم carbapenemase وربما لوجود انظمة التدفق Efflux pump. ومن المحتمل ان يكون سبب عدم وجود حزمة بروتينية بالنسبة لبورينات 2a عند الوزن الجزيئي45KD لفقدان او انخفاض التعبير عن بورين OprD وذلك يتفق مع دراسة (20) اذ استدل الى انخفاض تعبير downregulation بورين OprD لبكتريا *P.aeruginosa* الفاقدة لأنزيم MBL لعزلات الحروق.



شكل (6) الترحيل الكهربائي للبورينات على هلام متعدد الاكريلامايد (SDS-PAGE)، يشير M الى البروتينات القياسية

وايضا في الدراسة الحالية تم الحصول على حزمة بروتينية بوزن جزيئي 25KDa لنماذج البورينات للعزلات الخمسة من المحتمل ان هذه الحزم تمثل بورين OprG والسبب هو حساسية عزلات مستخلصات البورينات 1a 2a, 3a, 1f لمضاد Ciprofloxacin وهذا يتفق مع ما اقترحه (21) الى اهمية بورين OprG في امتصاص مركبات quinolones (Ciprofloxacin، norfloxacin) من خلال عزلهم لهذا البورين من سلالات *P. aeruginosa* وبوزن جزيئي 25.5Kda. وكذلك بين (22) من خلال دراسته لبورين OprG الى اهمية مضاد Ciprofloxacin الممتص من قبل بورين OprG في خلب ايونات الحديد وايضا اظهرت نتائج الترحيل الكهربائي لدراستهم وجود خمس حزم بروتينية من ضمنها حزمتان بوزن جزيئي 45KDa و25KDa تمثل بورينات , oprG oprD على التوالي لعزلة *P. aeruginosa* المنماة على وسط غني بالحديد CDM. ونتائج الدراسة الحالية تختلف مع نتائج (23) حيث اقترحوا وجود علاقة بين انخفاض التعبير downregulation عن بورين OprG ومقاومة *P. aeruginosa* للمضادات الحيوية بسبب ارتباط زيادة المقاومة tetracycline مع اختفاء البورين. علاوة على ذلك، فأن بورين OprG وغيرها من اصناف عائلة OmpW (OmpW family members) تشكل قنوات تسهل انتشار الجزيئات الصغيرة الكارهة للماء hydrophobic عبر الغشاء الخارجي بالية انتشار مماثلة لبورين FadL(oprG) لبكتريا *E. coli* (24). وهذا يثبت ان بورين OprG خاص بالمركبات الكارهة للماء (hydrophilic) وليس له علاقة بمضاد التتراسايكلين كما ان مضادات الكينولونات (Ciprofloxacin، enoxacin، norfloxacin) تمتلك خواص كارهة للماء، خاصة عند الموقع N-1، وذلك يتضح من قابلية الذوبان الضعيفة عند pH من 5 الى 9 بان هذه المركبات لها صفات كارهة hydrophobicity ومحبة hydrophilicity للماء بنفس الوقت (25).

المصادر

1. Ferenci, T. & Phan, K. (2015). How porin heterogeneity and Trade-Offs affect the antibiotic susceptibility of Gram-Negative bacteria. Genes, 6: 1113-1124.
2. Akimana, C. & Lafontaine, E. R. (2007). The moraxella catarrhalis outer membrane protein CD contains two distinct domains specifying adherence to human Lung Cells. FEMS Microbiol. Lett., 271 (1): 12-19.
3. Sukumaran, V. (2004). Spectroscopic investigation of stability, unfolding and refolding of outer membrane protein porin from Paracoccus denitrificans [Elektronische Ressource]. goethe _ universitat _ frankfurt _ am _ main
4. Viveiros, M.; Dupont, M.; Rodrigues, L.; Couto, I. & Davin-Regli, A. (2007). Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. PLoS ONE, 2(4): e365.
5. Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 67: 593-656.
6. Tamber, S.; Ochs, M. M. & Hancock, R. E. W. (2006). Role of the novel OprD family of Porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol., 188 (1): 45-54.
7. Yoshimura, F.; Zalman, L. S. & Nikaido, H. (1982). Purification and properties of Pseudomonas aeruginosa Porin. J. Biological. Chem., 258 (4): 2308-2314.
8. Nikaido, H. & Rosenberg, E. Y. (1983). Porin channels in Escherichia coli: studies with liposomes reconstituted from purified proteins. J. Bacteriol., 153:241–252.
9. Ongkudon, C. M.; Chew, J. H.; Liu, B. & Danquah, M. K. (2012). Chromatographic removal of Endotoxins: A bioprocess engineer's perspective. ISRN Chromatogr., PP. 1-9.
10. Meghji, S.; Henderson, B.; Nair, S. P. & Tufano, M. A. (1997). Bacterial porins stimulate bone resorption. Infect. Immun., 65(4):1313-1361.
11. Puntervoll, P.; Ruud, M.; Bruseth, L. J.; Kleivdal, H.; Høgh, B. T.; Benz, R. & Jensen, H. B. (2002). Structural characterization of the fusobacterial non-specific porin FomA suggests a 14- stranded topology, unlike the classical porins. Microbiology. 148: 3395-3403.

12. Koebnik, R.; Locher, K. P. & Van Gelder, P. (2000). Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in anutshell. Mol. Microbiol., 37: 239-253.
13. Sakyo, S.; Tomita, H.; Tanimoto, K.; Fujimoto, S. & Ike, Y. (2006). Potency of carbapenems for the prevention of Carbapenem-Resistant mutants of Pseudomonas aeruginosa the high potency of a new Carbapenem Doripenem. J. Antibiot., 59(4): 220-228.
14. Skurnika, D.; Rouxa, D.; Cattoirb, V.; Danilchankab, O.; Lua, X.; Yoder-Himesd, D. R.; Hanb, K.; Guillarda, T.; Jianga, D.; Gaultiera, C.; Guerinc, F.; Ascharde, H.; Leclercqc, R.; Mekalanosb, J. J.; Loryb, S. & Pier, G. B. (2013). Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of Pseudomonas aeruginosa revealed through high-throughput sequencing. 110 (51): 20747-20752.
15. Yoneyama, H. & Nakae, T. (1993). Mechanism of efficient elimination of protein D2 in outer membrane of imipenem-resistant Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother, 37: 2385-2390.
16. Kolayli, F.; Karadenizli, A.; Savli, H.; Ergen, K.; Hatirnaz, O.; Balikci, E.; Budak, F. & Vahaboglu, H. (2004). Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the oprD, oprM and oprN genes in Pseudomonas aeruginosa. J. Med. Microbiol., 53: 915-920.
17. Yan, Y.; Yao, X.; Li, H.; Zhou, Z.; Huang, W. W.; Stratton, C.; Dar Lu, C. & Tang, Y. (2014). A novel Pseudomonas aeruginosa strain with an oprD mutation in relation to a nosocomial respiratory infection outbreak in an intensive care unit. J. Clin. Microbiol., 52 (12): 4388-4390.
18. Naenna, P.; Noisumdaeng, P.; Pongpech, P. & Tribuddharat, C. (2010). Detection of outer membrane porin protein, an imipenem influx channel, in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health., 41: 614-624.
19. Dieppois, G.; Ducret, V.; Caille, O. & Perron, K. (2012). The transcriptional regulator CzcR modulates antibiotic resistance and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS ONE, 7(5): e38148.
20. Aghazadeh, M.; Hojabri, Z.; Mahdian, R.; Nahaei, M. R.; Rahmati, M.; Hojabri, T.; Pirzadeh, T. & Pajand, O. (2014). Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo-b-lactamase producing Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis and burn patients. Infect. Genet. Evol., 24:187-192.
21. Chamberland, S; Bayer, A. S.; Schollaardt, T; Wong, S. A. & Bryan, L. E. (1989). Characterization of mechanisms of quinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa strains isolated in vitro and in vivo and during experimental endocarditis. Antimicrob. Agents. Chemother., 33(5): 624-634.
22. McPhee, J.; Tamber, S.; Bains, M.; Maier, E.; Gellatly, S.; Lo, A.; Benz, R. & Hancock, R. E. W. (2009). Themajoroutermembrane protein OprG of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to cytotoxicity and forms an anaerobically regulated, cation-selective channel. FEMS Microbiol. Lett., 296: 241-247.
23. Peng, X.; Xu, C.; Ren, H.; Lin, X.; Wu, L. & Wang, S. (2005). Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Pseudomonas aeruginosa* responding to ampicillin, kanamycin, and tetracycline resistance. J. Proteome. Res., 4: 2257-2265.
24. Touw, D. S.; Patel, D. R. & van den Berg, B. (2010). The crystal structure of OprG from *Pseudomonas aeruginosa*, a potential channel for transport of hydrophobic molecules across the outer membrane. PLoS ONE 5(11): e15016.
25. Bedard, J. & Bryan, L. E. (1989). Interaction of the fluoroquinolone antimicrobial agents ciprofloxacin and enoxacin with liposomes. Antimicrob. Agents. Chemother., 33(8): 1379-1382.