



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه سلولی و مولکولی و میکروبیولوژی ،  
آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه باکتری شناسی ۲

بررسی فنوتیپی تشکیل بیوفیلم در اشیریشیا کلای و استافیلوکوکوسی

1

## بیوفیلم چیست؟

**بیوفیلم‌ها (Biofilm)** مجموعه‌ای از یک یا چند نوع میکروارگانیسم هستند که می‌توانند در سطوح مختلف رشد کنند. میکروارگانیسم‌هایی که بیوفیلم‌ها را تشکیل می‌دهند می‌توانند از خانواده‌ی قارچ‌ها، باکتری‌ها یا آغازیان باشند. یکی از آشناترین مثال‌های بیوفیلم **پلاک‌های دندانی** هستند؛ لایه‌ای نازک از باکتری که بر سطح دندان‌ها شکل می‌گیرد.

انواع دیگری از بیوفیلم‌ها وجود دارند که می‌توانند بر سطوح بی‌جان نظیر مواد معدنی و فلزات رشد کنند. آن‌ها در زیر آب و روی زمین یافت می‌شوند؛ می‌توانند روی بافت‌های گیاهی و حیوانی و یا روی دستگاه‌هایی که به شکل مصنوعی درون بدن ایمپلنت می‌شوند، نظیر ضربان‌ساز قلبی و کاتترها رشد کنند. همه‌ی سطوح نام برده شده یک ویژگی مشترک دارند: مرطوب بودن. بیوفیلم‌ها برای مدت زمانی بسیار طولانی در این محیط‌ها رشد کرده‌اند. بقایای فسیلی در نزدیک به 3.2 بیلیون سال گذشته یافت شده‌اند. برای مثال، فسیل‌های بیوفیلمی که ۳.۲ بیلیون سال گذشته در سنگ‌های اعماق اقیانوس در شرایطی هیدروترمال رشد کرده‌اند، یافت شده‌اند.

## مراحل تشکیل بیوفیلم

مراحل تشکیل بیوفیلم در باکتری‌ها از یک مدل کلی پیروی می‌کند؛ به این صورت که در اولین مرحله اتصال و استقرار میکروارگانیسم با سطح زنده یا غیر زنده اتفاق می‌افتد. اتصال اولیه با سطح غیر اختصاصی بوده و توسط پیوندهای آب‌گریزی، واندروالسی و الکترواستاتیک صورت می‌پذیرد. در این حالت وضعیت میکروارگانیسم از فرم پالنتونی به فرم ثابت تغییر می‌یابد.

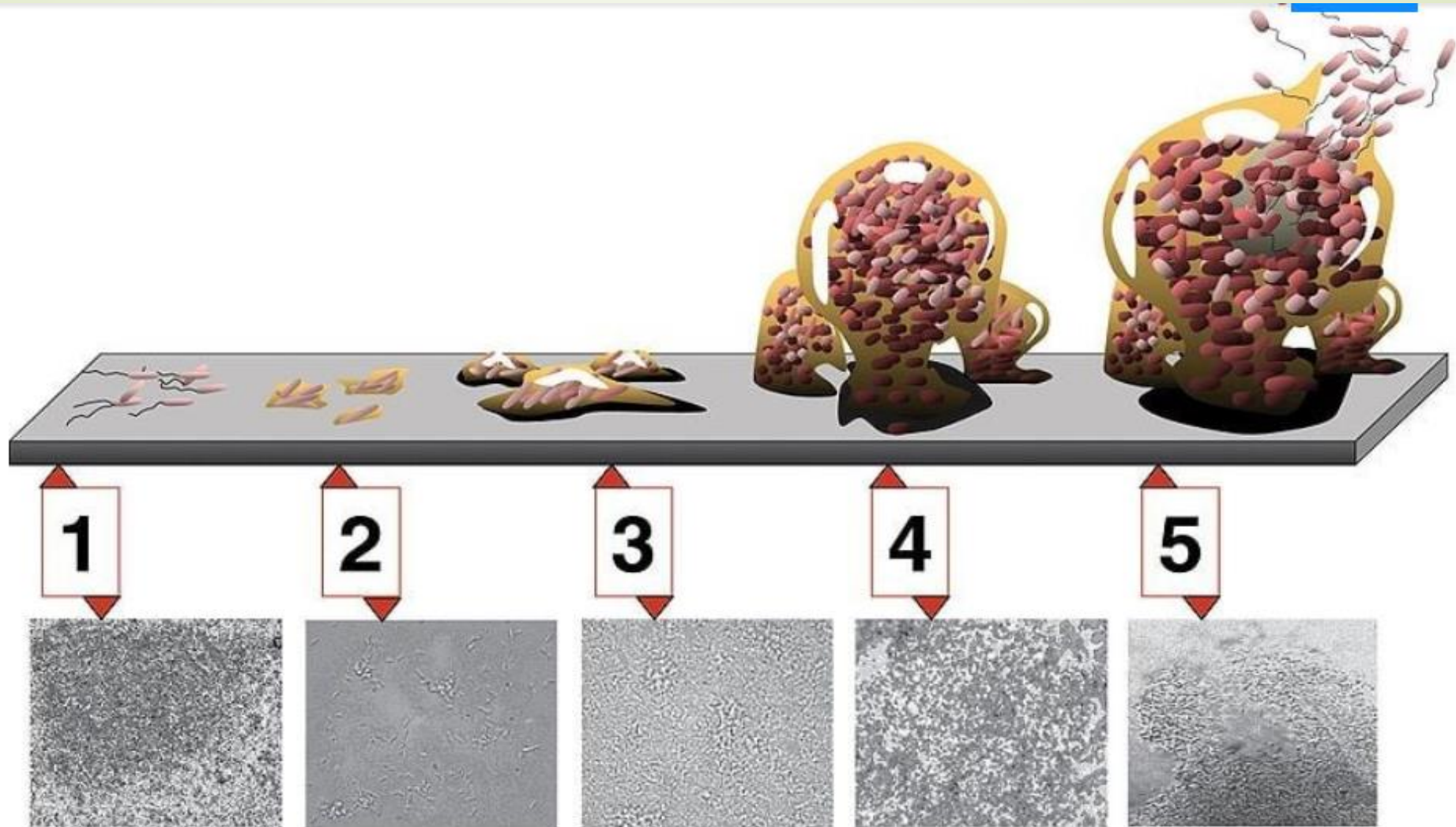
پس از اتصال اولیه، پروتئین‌های سطح میکروب متصل‌شونده به ماتریکس به صورت اختصاصی اتصال باکتری را به سطح قوی‌تر می‌کند، با تکثیر باکتری میکروکلنی باکتریایی تشکیل می‌شود و به دنبال آن ساختار سه بعدی که همان بیوفیلم بالغ است شکل می‌گیرد. این بیوفیلم بالغ پس از مدتی متلاشی شده اما سلول‌های باکتریایی آزاد شده می‌توانند در مکان‌های دیگر ایجاد عفونت و کانون جدید بیوفیلمی نمایند.



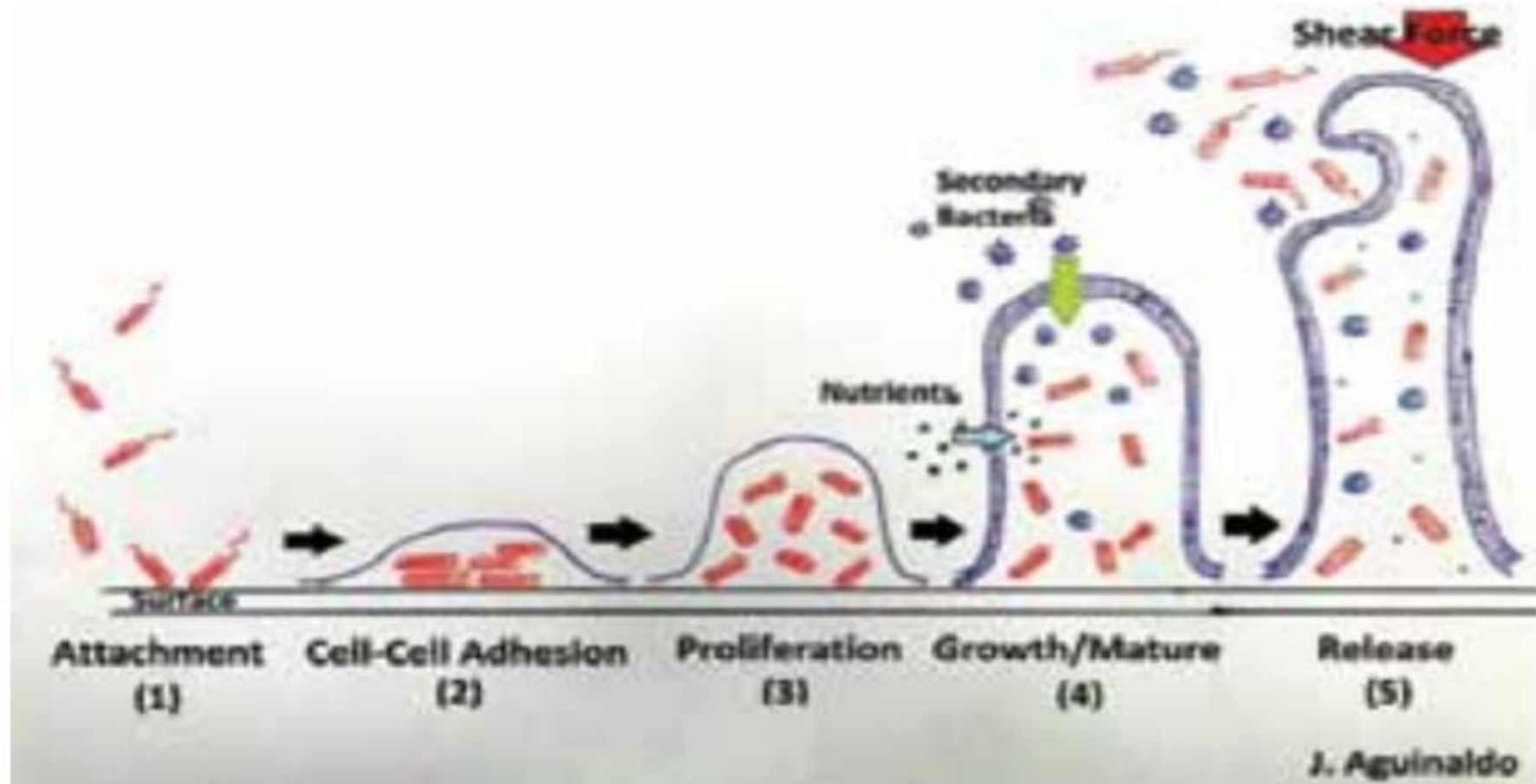
شکل ۱: در قسمت اول سلول‌های آزاد و متصل به سطح مشخص هستند. سلول‌های آزادزی (Planktonic) آزادانه در فاز آبکی شناور هستند و درون بیوفیلم محصور نیستند در حالی که سلول‌های بی پایه (Sessile) به سلول‌هایی که غیرمتحرک و ثابت هستند و درون بیوفیلم قرار دارند گفته می‌شود. پس از اتصال سلول‌ها به سطح جامد با ترشح ماتریکس خارج سلولی بیوفیلم تشکیل و گسترش پیدا می‌کند. پس از بلوغ بیوفیلم سلول‌ها جدا شده و مجدد در محیط رها می‌شوند [۱].

تشکیل بیوفیلیم به وسیله تعاملات بین سلولی (بین باکتریایی) به نام **سیستم حد نصاب** شکل می‌گیرد. سیستم حد نصاب یک فرآیند وابسته به غلظت است که هم در باکتری‌های گرم مثبت و هم باکتری‌های گرم منفی وجود دارد. در این سیستم، باکتری‌ها به واسطه مولکول‌های کوچکی به نام **ملکول‌های خودالقاگر** با هم ارتباط برقرار می‌کنند. زمانی که تراکم باکتریایی در یک محیط به یک حد خاصی می‌رسد غلظت این مولکول‌های انتقال دهنده به حد آستانه رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا می‌کنند. این تغییرات در سطح بیان ژن، فاکتورهای تهاجمی مختلفی از جمله بیوفیلیم را در باکتری تحت تأثیر (القا یا سرکوب) قرار می‌دهد. تغییرات محیط پیرامون میکروارگانیسم باعث تبدیل شدن فرم پلانکتونی به فرم بیوفیلیمی می‌شود. در گذر از فاز پلانکتونی به فاز بیوفیلیمی بیان ژن در سلول باکتریایی دستخوش تغییرات فراوانی می‌شود. مولکول‌های سطح سلول، مسیرهای متابولیسمی خاص و تولید فاکتورهای مختلف به ماندگاری باکتری در شرایط بیوفیلیم کمک می‌کنند.

در فاز بیوفیلیمی باکتری در یک ماتریکس خارج سلولی خودساز محصور می‌شود. این ماتریکس 30 درصد حجم توده بیوفیلیم را تشکیل می‌دهد. ماتریکس از پلیمرهای خارج سلولی، پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات، پپلی، DNA خارج سلولی، تاژک و سایر فیبرهای چسبنده تشکیل شده است. وظیفه این ماتریکس خارج سلولی، حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلیم می‌باشد. مواد غذایی به دام افتاده درون ماتریکس تأمین کننده نیاز غذایی باکتری‌ها در بیوفیلیم می‌باشد. آب نیز به واسطه خاصیت هیدروفیلی پلی ساکارید ماتریکس، برای حفظ حیات باکتری‌ها تأمین می‌گردد.

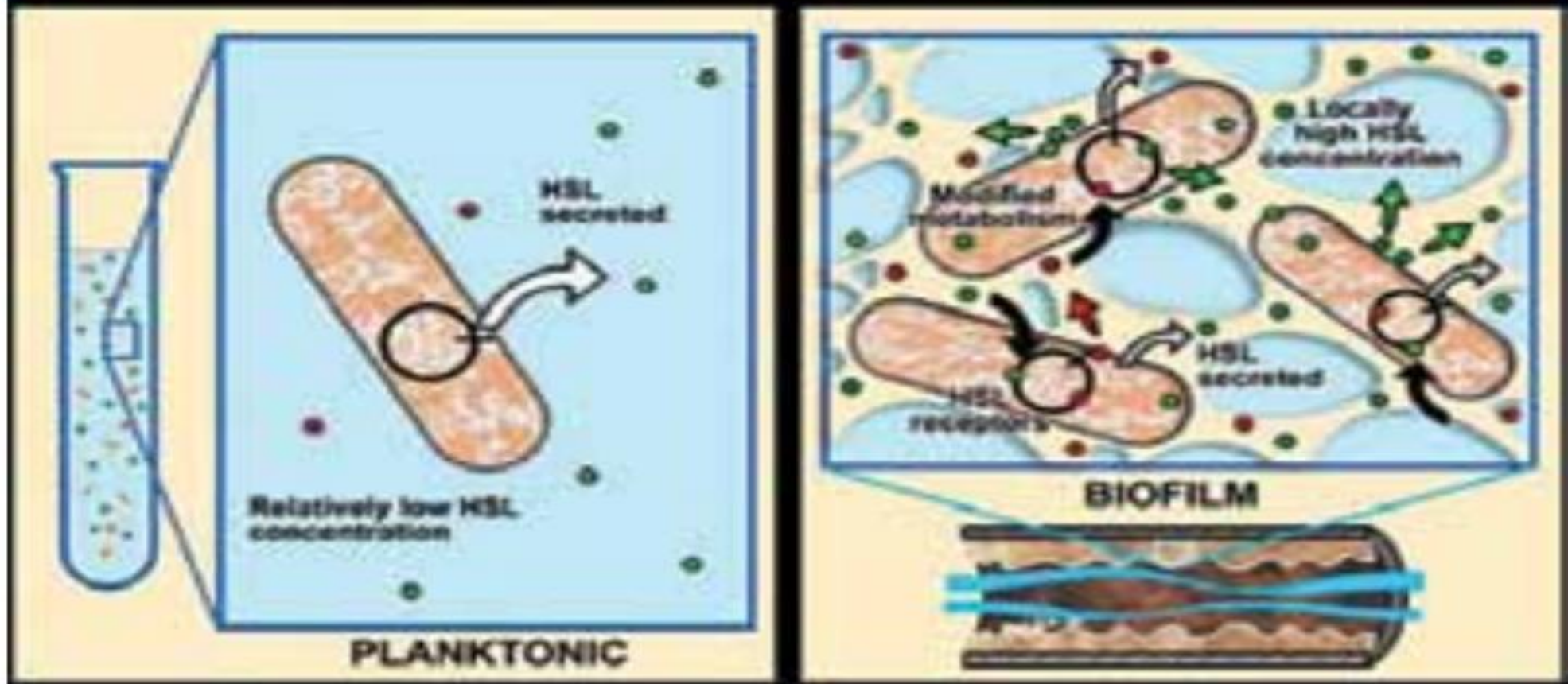


در پاسخ به تغییرات محیطی آنزیم‌هایی از باکتری محصور شده در بیوفیلم ترشح می‌شود که این آنزیم‌ها روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی تأثیر می‌گذارند. ترکیبات ماتریکس مسئول ایجاد حالت خشک شده و کاملاً مقاوم و مستحکم این ساختار می‌باشند. این خصوصیت به کنار هم قرار گرفتن سلول‌های باکتریایی کمک می‌کند. جهت ایجاد ارتباط بین سلولی مانند انتقال DNA که در فاز بیوفیلمی بسیار زیاد اتفاق می‌افتد، کنار هم قرار داشتن سلول‌های باکتریایی از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین این ماتریکس خارج سلولی باکتری را از گزند مواد شیمیایی ضدباکتریایی، ترکیبات اکسیدکننده و تأثیرات مخرب اشعه در امان نگه می‌دارد



شکل ۳- پنج مرحله اصلی در تشکیل بیوفیلم: مرحله اول اتصال به سطح به صورت برگشت پذیر بوده و استحکام چندانی ندارد. (مرحله ۱) پس از آن بین سلول‌ها اتصال سست برقرار شده و ماتریکس خارج سلولی شروع به ترشح می‌کند. (مرحله ۲) در مراحل بعدی ساختار بیوفیلم شکل خود را به دست آورده و سایر باکتری‌ها که همچنان در محیط هستند به این ساختار متصل می‌شوند. پس از بلوغ ساختار بیوفیلم سلول‌ها مجدد به محیط رها می‌شوند. (مرحله ۵)

# Quorum Sensing



باکتری با استفاده از گیرنده‌های سطح خود که نسبت به مولکول‌های ترشحی از سایر باکتری‌ها حساس است میزان تراکم میکروارگانیسم‌های محیط را احساس می‌کند. تولید این ترکیبات پروتئینی تحت تأثیر سیستم حد نصاب باکتری‌ها می‌باشد



## باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم

هم باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی می‌توانند بیوفیلم ایجاد کنند. از جمله مهم‌ترین باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند می‌توان باکتری‌های گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس‌های گروه ویریدانس* و باکتری‌های گرم منفی *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*، *پروتئوس میرابیلیس* و *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد.

**Table 2.** A list of common biofilm forming bacterial species <sup>[17]</sup>.

S.No	Common biofilm forming bacterial species
1	<i>E. coli</i>
2	<i>P. aeruginosa</i> ,
3	<i>S. epidermidis</i> ,
4	<i>S. aureus</i> ,
5	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
6	<i>E. cloacae</i>
7	<i>K. pneumoniae</i>
8	<i>Actenomyces israelii</i>
9	<i>Haemophilus influenza</i>
10	<i>Burkholderia cepacia</i>

باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند به دلیل مقاومت بالا می‌توانند عفونت‌های مزمن مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی ایجاد کنند. بیوفیلم باکتریایی ایجاد شده در این حالت به درمان توسط آنتی بیوتیک‌های معمول مقاوم می‌باشد. ایجاد بیوفیلم می‌تواند باعث چندین مشکل در زمینه پزشکی شود که از جمله آن‌ها، عفونت وسایل خارجی مانند کاتترها، لوله‌های حلقی و لنزهای تماسی و همچنین عفونت بافت‌های زنده مانند عفونت اندوگارد، عفونت زخم و عفونت اپیتلیوم ریه به‌خصوص در مبتلایان به سیستیک فیبروزیس می‌باشد.

## دلایل شکل‌گیری بیوفیلم

برای میکروارگانیسم‌ها، زندگی کردن در یک بیوفیلم با مزایای خاصی همراه است. اجتماعات میکروبی معمولاً نسبت به استرس‌ها بسیار مقاوم‌ترند. فاکتورهای استرس‌زای بالقوه نظیر کمبود آب، افزایش یا کاهش pH محیط یا وجود مواد سمی برای میکروب، نظیر آنتی‌بیوتیک‌ها، آنتی‌میکروب‌ها یا فلزات سنگین را شامل می‌شوند.

توجهات بسیاری برای سختی و مقاومت بالای بیوفیلم‌ها وجود دارد. برای مثال، **لایه‌ی EPS** که آن‌ها را می‌پوشاند، به عنوان یک عامل فیزیکی در برابر عوامل ذکر شده عمل می‌کند. این لایه می‌تواند به کمبود آب کمک کند یا در برابر اشعه‌ی UV که میکروارگانیسم‌ها را تهدید می‌کند، مقاومت ایجاد کند. به‌علاوه، مواد مضر نظیر فلزات و آنتی‌بیوتیک‌ها با نزدیک شدن به EPS یا خنثی می‌شوند یا با اتصال به آن، از کار می‌افتند. به‌علاوه، این مواد پیش از رسیدن به سلول‌های عمقی‌تر بیوفیلم، غلظت اثرگذار خود را در مواجهه با سلول‌های سطحی از دست می‌دهند.

با همه‌ی این اوصاف، برای برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها امکان نفوذ به EPS و هجوم به لایه‌های مختلف بیوفیلم وجود دارد. در این جا نیز مکانیسم دفاعی دیگری به کار می‌آید: وجود باکتری‌هایی که از نظر فیزیولوژیک به خواب رفته‌اند. همه‌ی آنتی‌بیوتیک‌ها برای اثرگذاری، به فعالیت‌های سلولی میکروب‌ها نیازمندند. در صورتی که باکتری غیرفعال باشد، چیز زیادی برای آنتی‌بیوتیک باقی نمی‌ماند.

یکی دیگر از روش‌های محافظت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها، وجود سلول‌های باکتری خاصی با نام "**پرسیستِر**" (persisters) است. این سلول‌ها تقسیم نمی‌شوند و در برابر بسیاری از آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند. بنا بر مقاله‌ای که در سال ۲۰۱۰ منتشر شد، پرسپیسترها با تولید موادی که ساختارهای هدف آنتی‌بیوتیک را هدف قرار می‌دهند، در برابر آن‌ها مقاومت می‌کنند.

در حالت کلی، میکروارگانیسم‌هایی که با یکدیگر تحت عنوان بیوفیلم زندگی می‌کنند، از وجود سلول‌های مختلف در اجتماع خود مزایایی کسب می‌کنند.

## معرفی ترکیبات ضد بیوفیلمی

ترکیبات ضد بیوفیلمی به ترکیباتی گفته می‌شود که به نحوی مانع از ایجاد فاز بیوفیلمی در باکتری‌های مستعد می‌شود. این ترکیبات با تحت تأثیر قرار دادن قسمت‌های مختلف این ساختار سه‌بعدی، سبب ایجاد نارسایی‌هایی در سطح بیوفیلیم شده و مانع از ایجاد یا گسترش آن‌ها می‌شوند. این ترکیبات به دو گروه ترکیبات ضدبیوفیلمی غیرگیاهی و ترکیبات ضدبیوفیلمی گیاهی تقسیم بندی می‌شوند.

## ترکیبات ضد بیوفیلمی غیر گیاهی

ترکیبات ضدبیوفیلمی غیر گیاهی دسته‌ای از ترکیبات هستند که منشأ غیرگیاهی دارند. در ادامه به ارائه چند نمونه از این ترکیبات پرداخته شده است:

## پوشش سطحی و مهار ایجاد بیوفیلم

از این گروه می‌توان به **پوشش ضد میکروبی** اشاره کرد. پوشاندن سطح با آنتی بیوتیک‌ها، مواد بیوساید و ترکیبات یونی یکی از روش‌های مهار تشکیل بیوفیلم می‌باشد. این روش با مهار اتصال باکتری با سطح و همچنین کشتن باکتری‌های متصل شده، از مراحل اولیه تشکیل بیوفیلم ممانعت می‌کند. اما اثربخشی این روش برای مدت زمان محدودی (تا یک هفته) است، بعد از این مدت مواد ضد میکروبی کارایی خود را از دست داده یا اثر آنها بسیار کم می‌شود.

راه دیگر مهار ایجاد بیوفیلم، ایجاد تغییرات فیزیکی بر روی سطح است. تشکیل بیوفیلم با اتصال اولیه باکتری به سطح انجام می‌گیرد. میزان آبگریزی و بار الکتریکی سطح نقش مهمی در توانایی باکتری جهت تشکیل بیوفیلم دارد بنابراین هر عاملی که باعث آبدوست کردن سطح شود تعامل باکتریایی با سطح و در نتیجه بیوفیلم را کاهش می‌دهد.

## مهارکنندگان سیستم حد نصاب بیوفیلم

مراحل تشکیل بیوفیلم تحت کنترل سیستم حد نصاب است. در این سیستم باکتری‌ها برای تجمع خود و تشکیل بیوفیلم به وسیله مواد شیمیایی مترشحه از خودشان با هم ارتباط برقرار می‌کنند. هر تکنیک یا ماده‌ای که در این فرآیند اختلال ایجاد کند را **مهار کننده سیستم حد نصاب** می‌گویند. یکی از راهکارهای مهار تشکیل بیوفیلم تداخل در سیگنال بین باکتری‌ها یا همان سیستم حد نصاب است. از جمله مواد شناخته شده‌ای که نقش QSI دارد ماده‌ای است به اسم **furanones Bromated** که اولین بار از جلبک قرمز *pulchra Delisea* به دست آمد. اما امروزه ساختارهای شبیه به آن به صورت مصنوعی سنتز می‌شود. این ماده از تشکیل بیوفیلم در استرپتوکوکوس‌های ویریدانس مانند استرپتوکوکوس موتانس که در تشکیل بیوفیلم و پلاک دندان اهمیت زیادی دارد با مهار QS ممانعت می‌کند.

## باکتریوفازها و مهار بیوفیلیم

استفاده از باکتریوفازهای لیتیک می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین آنتی بیوتیک‌ها و یا مکمل آنها در درمان عفونت‌ها به کار برده شود. باکتریوفازها برای انسان مضر نیستند و برای باکتری میزبان کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند. فازها قادر به حذف بیوفیلیم در باکتری میزبان خود هستند. به عنوان مثال فاز T4 می‌تواند درون بیوفیلیم تشکیل شده باکتری اشریشیا کلی تکثیر یابد و با کشتن این باکتری ساختار فیزیکی بیوفیلیم را تخریب کند.

بسیاری از فازها پلیمرزهایی تولید می‌کنند که پلیمر خارج سلولی بیوفیلیم را تجزیه می‌کند. برای باکتری کلبسیلا آئروژنز فاز تجزیه کننده اگزوپلی ساکارید و کپسول شناسایی شده است. همچنین فاز لیزین یا اندولیزین جزو مواد ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت محسوب می‌شوند که به خاصیت ضد بیوفیلیمی فاز کمک می‌کنند.

از جمله اشکالات استفاده از فاز به عنوان یک مکانیسم ضد بیوفیلیمی این است که ذرات فازی اختصاصی میزبان هستند، بنابراین **طیف اثر محدودی** دارند. همچنین ممکن است در باکتری‌ها مقاومت فازی ایجاد شود. یکی دیگر از معایب فاز این است که بعضی از فازها حامل ژن‌های مربوط به فاکتور مهاجم هستند که امکان انتقال این ژن‌ها به باکتری درمان شده با فاز وجود دارد.

## آنزیم‌های ضد بیوفیلمی

از آنجایی که باکتری‌های بیوفیلیم درون ماتریکس خارج سلولی محصور شده‌اند، تخریب ماتریکس بیوفیلیم می‌تواند به عنوان روشی جهت تخریب بیوفیلیم تشکیل شده، مورد استفاده قرار گیرد. پروتئازها، گلیکوزیدازها و دئوکسی ریبونوکلیئازها از جمله این آنزیم‌ها هستند. **B Dispersin** یک آنزیم تجزیه کننده ماتریکس بیوفیلیم می‌باشد. این ماده یک گلیکوزیداز بوده که از باکتری **اکتینوباسیلوس اکتینومیست-کومیتنس** به دست می‌آید. این آنزیم ماده پلی ان- استیل گلوکزآمین که در ساختار ماتریکس بیوفیلیم اکثر باکتری‌ها حضور دارد را تجزیه می‌کند.

باکتری **سودوموناس آئروژینوزا** توانایی تولید پلی ساکارید آلژینات و همچنین آنزیم تجزیه کننده آلژینات را دارد. آلژینات جزء اصلی ساختار ماتریکس بیوفیلیم این باکتری است. مطالعات نشان می‌دهد افزایش وجود آنزیم تجزیه کننده آلژینات باعث حساسیت بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا به آنتی بیوتیک‌ها می‌شود. با افزودن آنزیم به محیط پیرامون باکتری و همچنین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم تجزیه کننده آلژینات می‌توان به این هدف دست یافت.

## سورفاکتانت‌ها و بیوسورفاکتانت‌های ضد بیوفیلمی

پوشاندن سطح با **بیوسورفاکتانت‌ها** می‌تواند باعث عدم اتصال باکتری‌ها به سطح و متعاقب آن مهار تشکیل بیوفیلم شود. بیوسورفاکتانت‌ها ترکیبات میکروبی هستند که توانایی تغییر خاصیت فیزیکوشیمیایی سطوح را دارند. این تغییر ممکن است اتصال باکتریایی را به سطوح تحت تأثیر قرار دهد.

سورفاکتانت‌ها ترکیبات شیمیایی هستند که معمولاً جهت پاک کردن سطوح در کارخانجات مواد غذایی از آن‌ها استفاده می‌شود. بیوسورفاکتانت‌ها در مقایسه با سورفاکتانت‌ها سمیت کمتر و زیست تخریب پذیری یا تجزیه بیشتری دارند. **سورفاکتین** یک لیپوپپتید است که توسط باکتری **باسیلوس سابتیلیس** تولید می‌شود. این ماده توانایی تغییر سطوح را دارد و تشکیل بیوفیلم باکتریایی را دچار اختلال می‌کند. همچنین گلیکولپید ترشح شده از باکتری **سودوموناس آئروژینوزا** به نام **رامنولپید** نیز این خاصیت را داراست. جذب بیوسورفاکتانت‌ها روی سطوح می‌تواند میزان آبگریزی سطح را تحت تأثیر قرار دهد که به دنبال آن تعامل باکتری با سطح و تشکیل بیوفیلم دچار اختلال می‌شود. گزارش شده است که غلظت 0/5 درصد سورفاکتین باعث کاهش معنی‌دار چسبندگی باکتری لیستریا منوسیتوژنز و انتروباکتر ساکازاکی می‌شود.



## مشتقات گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلمی


تلاش محققان جهت معرفی ترکیباتی با خاصیت ضد بیوفیلمی منجر به شناخت ترکیبات گیاهی شده است که طبیعی گیاهان برای محافظت از خود در برابر استقرار باکتریایی از آنها استفاده می‌کنند. این ترکیبات که وزن ملکولی کمتر از یک کیلو دالتون دارند را اصطلاحاً "Parvome" می‌گویند (Parve به معنای کوچک و ome به معنای گروه). از جمله این ترکیبات می‌توان آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فالونوئید و کومارین‌ها، پپتیدها، گلیکوزیدها، نوکلئوزیدها و پلی‌فنل‌ها را نام برد.

## تأثیرات بیوفیلم بر زندگی انسان‌ها

با توجه به محیط‌های گسترده‌ای که بیوفیل‌ها در آن‌ها حضور دارند، نباید از اثرات مختلفشان بر روی زندگی انسان‌ها غافل شویم. همانطور که تشکیل بیوفیلم درون بدن انسان ممکن است بیماری‌ها و عفونت‌های بسیار سختی را سبب شود، استفاده درست و مؤثر از آن نیز می‌تواند در فرایندهای مختلف مورد توجه زیست‌شناسان قرار گیرد. در ادامه، مثال‌هایی را مطالعه خواهید کرد.

### سلامت و بیماری

پژوهش‌هایی که تا کنون روی بیوفیلم‌های قارچی و باکتریایی انجام شده است، حضور آنان را در بسیاری از مشکلات سلامتی نشان می‌دهد. در سال ۲۰۰۲، سازمان سلامت جهانی اظهار کرد که بیش از ۸۰ درصد از عفونت‌های انسانی توسط بیوفیلم‌ها ایجاد می‌شوند. بیوفیلم‌ها می‌توانند روی ابزار پزشکی ایمپلنت‌شده در بدن نظیر **دریچه‌های قلب مصنوعی**، **مفصل‌های مصنوعی**، **کاتترها** یا **ضربان‌سازها** رشد کنند و موجب عفونت شوند. این واقعه نخستین بار در سال ۱۹۸۰ زمانی که باکتری‌هایی روی کاتتر و ضربان‌ساز قلبی رشد کرد، مشاهده شد.



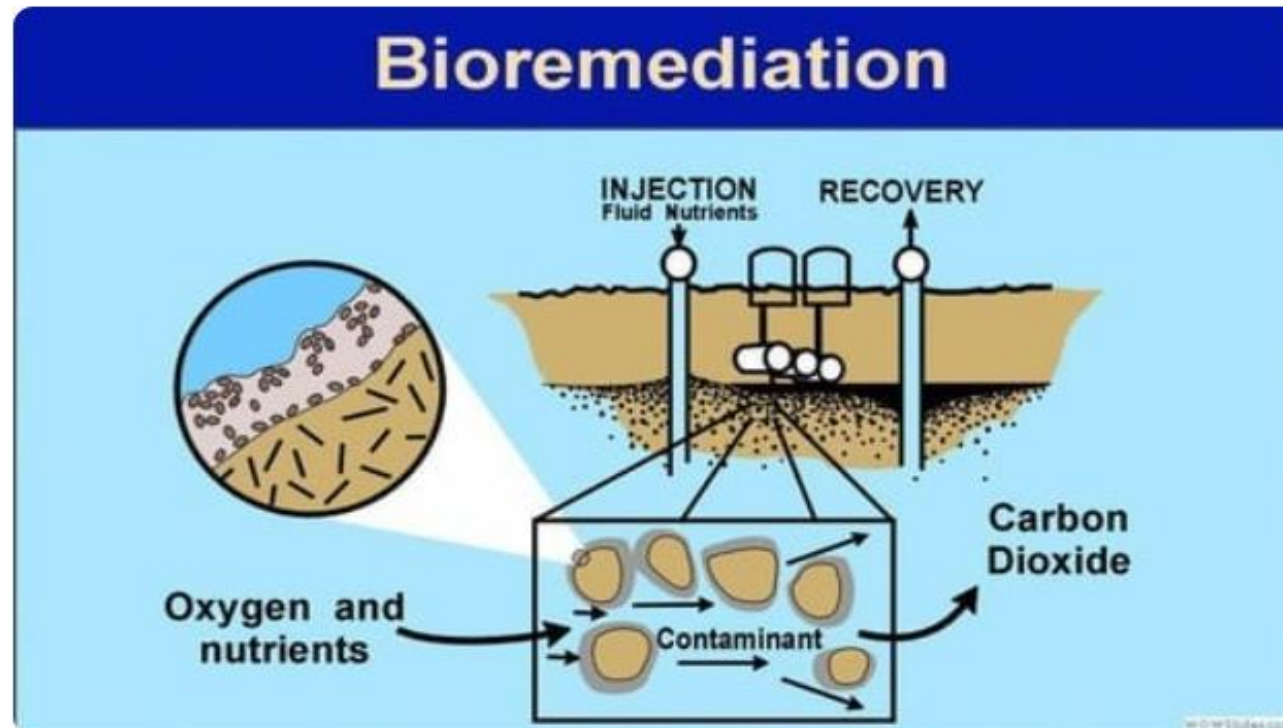
بیوفیلرها را همچنین با عفونت‌های اندوکاردیت، پنومونیا در افراد مبتلا به سیستیک فیبروزیس و سایر عفونت‌های خطرناک مرتبط دانسته‌اند. علت این‌که امروزه تشکیل بیوفیلرها به یک نگرانی تبدیل شده است، این است که باکتری‌های موجود در این ساختارها مقاومت شدیدی به آنتی‌بیوتیک‌ها و سایر مواد ضد عفونی‌کننده نشان می‌دهند و به سختی می‌توان آن‌ها را کنترل کرد. در حقیقت در مقایسه با باکتری منفرد، بیوفیلرها تا ۱۵۰۰ برابر به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاومند که درمان عفونت‌های ناشی از آنان را به یک چالش اساسی تبدیل می‌کند.

بنا بر پژوهشی که در سال ۲۰۱۴ در ژورنال Cold Spring Harbor Perspectives منتشر شد، بیوفیلرهای قارچی نیز می‌توانند با رشد روی ایمپلنت‌ها سبب عفونت شوند. برای مثال، گونه‌های مخمری از جنس **کاندیدا** می‌توانند روی ایمپلنت‌های سینه، ضربان‌سازها و دریچه‌های قلب مصنوعی رشد کنند. کاندیدا همچنین می‌تواند روی بافت‌های بدن انسان رشد کرده و به مشکلاتی نظیر **واژینیتیس** (التهاب واژن) یا **کاندیدیازیس اوروفاریژیال** (یا رشد مخمری در دهان یا گلو) بیانجامد. با این حال، باید در نظر داشت که این بیوفیلرها ویژگی مقاومت دارویی را ندارند.

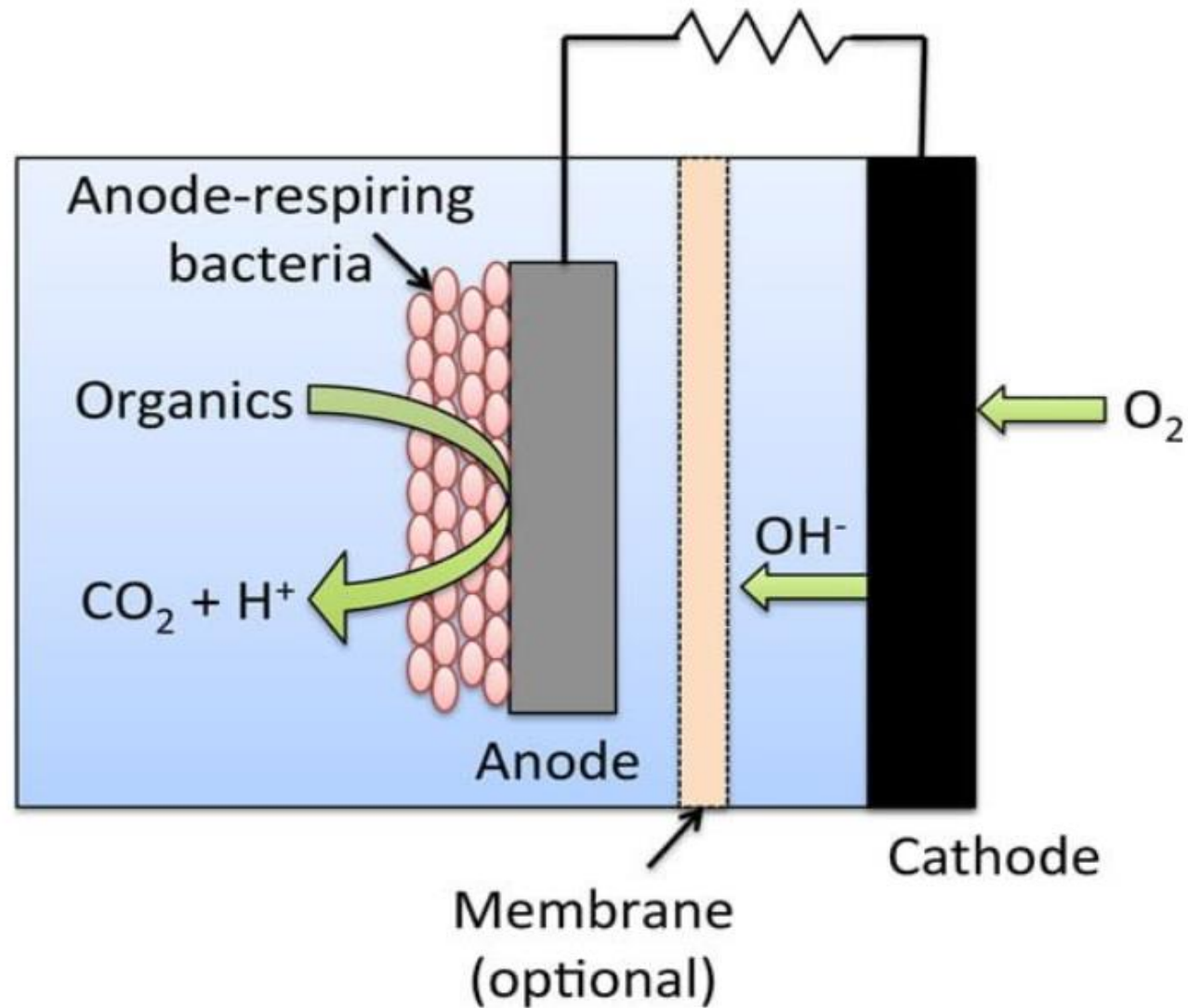
↑ To top

## زیست پالایی (Bioremediation)

در برخی موارد، بیوفیلیم‌ها می‌توانند مفید باشد. در حالت کلی، **زیست‌پالایی** به معنای استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای دستیابی به یک محصول خاص، نظیر آنزیم‌ها، یا برای تولید ترکیبات درمانی است. امروزه می‌توان از بیوفیلیم‌ها برای **تصفیه‌ی آب از فلزات سنگین** آلوده‌کننده نظیر کروم، مواد منفجره نظیر TNT و یا مواد رادیواکتیو مانند اورانیوم استفاده کرد. این میکروب‌ها قادر به تخریب یا تغییر آن‌ها، به نحوی که دیگر نتوانند سمیت ایجاد کنند، می‌باشند. یکی از مثال‌های موجود در این زمینه، **نیتروفیکاسیون** است؛ به معنای تبدیل آنیون موجود در آب به نیتريت و نیترات از طریق اکسیداسیون. بنابر پژوهشی که در ژورنال Water Research در سال ۲۰۱۳ منتشر شده است، این عمل می‌تواند توسط باکتری‌های اتوتروف انجام شود که به عنوان بیوفیلیم روی سطوح پلاستیکی رشد می‌کنند. تنها رشد بیوفیلیم‌ها در سطحی با اندازه‌ی چند سانتی‌متر می‌تواند مقادیر زیادی از آب را پاک‌سازی کند.



در سلول‌های سوختی میکروبیال، از باکتری برای تبدیل پسماندهای ارگانیک به الکتریسیته استفاده می‌کنند. میکروب‌های مورد استفاده روی سطح الکترود می‌نشینند و الکترون‌ها را منتقل می‌کنند که در نهایت سبب تولید جریان برق می‌شود. در مقاله‌ای که در سال ۲۰۱۱ منتشر شد، مشخص شد که برخی باکتری‌ها می‌توانند از مواد زائد، جریان برق را تولید کنند که روشی ارزان و تمیز بدین منظور است.



## کشت بیوفیلمی جلبک‌ها

در سال‌های اخیر، دانشمندان دانشگاه واشنگتن توانسته‌اند راهی را پیدا کنند که جلبک‌های دریایی را به جای چند هفته، در چند روز و با بازدهی بیشتر کشت دهند. در واقع هدف محققان این است که جلبک‌های دریایی را به علت پتانسیل بالای زیستی آن، در محیط آزمایشگاهی کارآمدتر و سریعتر کشت دهند.

دانشمندان به تازگی راکتورهای بیوفیلمی را برای رشد جلبک توسعه داده‌ولی این راکتورها به دلیل تغییرات گسترده PH و دما و کمبود منابع گاز دی‌اکسیدکربن، بازدهی مناسبی ندارند.

تیمی از دانشکده مهندسی شیمی و بیومهندسی در دانشگاه واشنگتن موفق به ابداع راکتوری بیوفیلمی جدیدی شده‌اند که قادر است گازها را بازیافت کرده و میزان کمتری آب و نور نسبت به راکتورهای مرسوم مصرف کند.

جلبک تولید شده میزان قابل توجهی چربی دارد که برای تولید سوخت‌های زیستی بسیار مناسب هستند و میزان این چربی‌ها از چربی‌های تولید شده به‌وسیله راکتورهای مرسوم بسیار بیشتر است. به دلیل وجود قشای جداشدنی، این سیستم برای کشت مناسب‌تر از سایر سیستم‌ها می‌باشد.

این سیستم بی‌نظیر به جلبک اجازه می‌دهد که همزمان و مثل فرایند یک گیاه، هم عمل فتوسنتز را انجام داده و هم این که کربن لازم خود را مصرف کرده و مثل یک گیاه تنفس نماید. خوراک تغذیه جلبک گلیسرول، محصول زیستی ارزان تولید شده از سوخت‌های زیستی، اوره و ماده شیمیایی ارزان دیگری که تأمین‌کننده نیتروژن لازم برای جلبک، می‌باشند. این سیستم طوری طراحی شده‌است که کربن دی‌اکسید و اکسیژن در آن بازیافت می‌شوند

مقاومت استافیلوکوکوس اورئوس در سراسر جهان نسبت به انواع آنتی‌بیوتیک‌های رایج رو به افزایش است و به‌عنوان خطری جدی در جهت افزایش مقاومت به عوامل آنتی‌باکتریال مطرح است.

در کنار بروز مقاومت، این باکتری توانایی تولید عوامل بیماری‌زای مختلفی مانند توکسین‌ها، آنتی‌ژن‌های سطحی، آنزیم‌های خارج سلولی و برخی عوامل وابسته و متصل به کپسول پلی ساکاریدی به نام بیوفیلیم را دارا است (۷، ۸). بیوفیلیم شامل مجموعه‌ای از میکروارگانیسم‌هایی است که در سطح و ماتریکس جسم غیر زنده و یا موجود زنده به هم متصل و سبب ایجاد سطح ژله‌ای می‌شوند (۹). این لایه، افزون‌بر اینکه محیطی مناسب برای باکتری فراهم می‌کند، شرایط ایده‌آلی برای رشد و تکثیر با آن در محیط‌های ناپایدار به وجود می‌آورد. از مهم‌ترین ویژگی‌های بیوفیلیم می‌توان به نمونه‌هایی اشاره کرد. مانند: کمک به بقای باکتری در شرایط سخت محیطی؛ نقش در بیماری‌زایی و ایجاد بیماری‌های مزمن؛ و اثرگذاری آن در ایجاد و تقویت مقاومت دارویی از راه نفوذناپذیری آنتی‌بیوتیک در ماتریکس پلیمری (۱۰).

فرایند چسبیدن و تولید بیوفیلم در این باکتری شامل دو مرحله است: ۱. اتصال اولیه (INITIAL ADHERENCE): سلول‌ها به یک سطح (به وسیلهٔ فاکتورهای اتصال دیوارهٔ سلول) متصل می‌شود؛ ۲. تجمع و تراکم (ACCUMULATION): تکثیر سلول‌ها و ایجاد یک ساختار بالغ است که از تعداد زیادی لایه‌های مختلف سلولی تشکیل شده است و توسط اتصالات داخل سلولی پلی ساکاریدی (PIA) به یکدیگر متصل می‌شوند



▶ باکتری‌ها می‌توانند به‌صورت بیوفیلم در سطح سوندها و سوندهای ادراری رشد کنند و مقاومت فوق‌العاده‌ای نسبت به عوامل ضد میکروبی از خود نشان دهند.

▶ استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس به‌عنوان مهم‌ترین گونه استافیلوکوکوس در تولید بیوفیلم به‌خصوص در دستگاه ادراری شناخته می‌شد، اما در حال حاضر، استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس و استافیلوکوکوس اورئوس اغلب به‌عنوان مهم‌ترین عوامل ایجاد بیوفیلم در بیماران دارای عفونت ادراری حائز اهمیت هستند.

▶ بیوفیلم‌های باکتریایی در بیمارانی که از ابزارهای خارجی استفاده می‌کنند یک فرآیند دومارحله‌ای است که مشتمل بر اتصال به سطوح، رشد، تکثیر و گسترش باکتری‌ها به‌شکل چند لایه است. تشکیل بیوفیلم منجر به ایجاد عفونت‌های عودشونده می‌شود که نسبت به درمان‌های ضد میکروبی مقاومت نشان می‌دهد و باعث افزایش هزینه‌های ناشی از درمان می‌شود.

▶ تولید بیوفیلم ناشی از فعالیت اپرون *icaADBC* است که مسئول سنتز بخش عمده‌ای از ماتریکس آگزوپلی‌ساکاریدی، پلی‌ساکارید چسبنده بین سلولی و عامل گردهم‌آمدن سلول‌های باکتریایی در بیوفیلم است. علاوه‌براین، تولید اتولایزین و پروتئین سطحی نیز در تشکیل بیوفیلم حائز اهمیت است.

# بررسی تولید بیوفیلم:

الف: به روش کیفی: جهت تعیین سویه‌های استافیلوکوکوس اپیدرمایدیس مولد بیوفیلم، سویه‌ها بر روی محیط ژلوز قرمز کنگو دارای ۴۰ گرم در لیتر سوکروز کشت داده شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند و سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار داده شدند.

کلنی‌های سیاه‌رنگ به‌عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم و کلنی‌های قرمز تیره به‌عنوان سویه‌های مولد بیوفیلم ضعیف و سویه‌های قرمز روشن تا صورتی به‌عنوان سویه‌های فاقد قدرت تولید بیوفیلم شناسایی شدند.

# به روش کمی میکروپلیت:

این روش مبتنی بر سنجش میزان بیوفیلم تولیدی در محیط آبگوشت تریپتیکاز سویه دارای ۰/۲۵ درصد سوکروز و در میکروپلیت‌های ۹۶ خانه با استفاده از اسپکتروفتومتر است.

این روش کمی بوده که براساس میزان چسبندگی کلنی‌های باکتریایی به سطوح پلی استیرن ته چاهک‌ها و رنگ‌آمیزی با کریستال ویوله و قرائت جذب نوری ۵۷۰ نانومتر آن‌ها با استفاده از دستگاه خوانشگر الیزا است.

سویه‌هایی که جذب نوری آن‌ها زیر ۰/۳۵ بود غیرچسبنده، سویه‌هایی که جذب نوری آن‌ها بین ۰/۳۵ تا ۰/۴۵ بود چسبنده ضعیف و سویه‌هایی که جذب نوری آن‌ها بالاتر از ۰/۴۵ بود به‌عنوان چسبنده قوی در نظر گرفته شدند.

## سنجش تشکیل بیوفیلم:

جهت بررسی توانائی جدایه های اشرشیا کلی در تولید بیوفیلم، آزمون تشکیل بیوفیلم در محیط آزمایشگاه طبق روش زیر انجام گردید. جدایه ها پس از کشت TSB یک شبانه روزی در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، انکوبه شدند. سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله ها تهیه گردید و تمام چاهک ها در یک پلیت ۹۶ خانه ای با ۲۰۰ میکرو لیتر از محیط پر گردیدند. سپس به هر یک از چاهک ها ۲۰۰ میکرو لیتر از استوک آنتی بیوتیکی هر یک از دو آنتی بیوتیک در حداکثر غلظت (پنی سیلین ۳۲ ml/g و سیپرو فلوکساسین ۶۴ ml/g) اضافه شد و رقت سازی به صورت سریالی انجام گردید. سطح پلیت ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. بعد از تخلیه محتویات چاهک ها، سه بار شستشو با PBS انجام شد.

پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. تمام خانه‌ها ۱۰۰ میکرو لیتر کریستال ویوله ۲٪ اضافه و پس از ۲۰ دقیقه پیت‌ها در زیر شیر آب شستشو تا رنگ اضافی از چاهک‌ها خارج شود. سپس اسید استیک ۳۳٪ حدود ۱۵۰ میکرو لیتر به پلیت‌ها جهت آزاد شدن رنگ اضافه شد و جذب نوری (OD) هر یک از خانه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الایزا ریدر خوانش شد. همچنین از آنتی‌بیوتیک بدون سوسپانسیون و کنترل مثبت (ATCC-25923) به‌عنوان کنترل منفی و مثبت به ترتیب استفاده شد. توانایی تشکیل جذب نوری در ۴ ساعت ثبت شد. در انتها میزان کاهش بیوفیلم ناشی از

## در انتها میزان کاهش بیوفیلیم ناشی از


آنتی بیوتیک‌ها را می‌توان از طریق جذب نوری چاهک تیمار شده، شاهد، کنترل طبق فرمول زیر به دست آورد.

$$\text{درصد کاهش} = [(C-B)-(T-B)] \times 100$$

C = میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل

B = میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد

T = میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده



گسترده‌گی اثر بیوفیلیم‌ها از مواد بی‌جان تا ایجاد بیماری‌های مختلف در انسان و حیوانات، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌های رایج و معمول مورد استفاده در عفونت‌های ساده، توانایی بالقوه هر کدام از سلول‌های درون بیوفیلیم به ایجاد ساختار سه بعدی بیوفیلیم جدید و وجود ساختارها و سلول‌های تخصص‌یافته نظیر پرسیستر سبب شده‌است که بیوفیلیم یکی از چالش‌های دنیای زیست‌شناسی و پزشکی در دهه‌های اخیر شناخته شده و راه‌های درمانی متعددی برای آن در نظر گرفته شود. امید است با پیشرفت روزافزون علم زیست‌شناسی و پزشکی، علاوه بر کشف راه‌های مطمئن‌تر جهت درمان بیماری‌های ناشی از این باکتری‌های پاتوژن، استفاده‌های بیوتکنولوژیکی مفیدی نیز از آنها صورت گیرد.



THANK YOU :)