مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال پنجم، شماره اول، پیاپی هفدهم، تابستان ۱۳۹۵ (۸۱-۷۱)

بیوفیلم باکتریایی و مکانیسم‌های مهار آن با تکیه بر خواص ضد بیوفیلمی ترکیبات گیاهی

عبدالمجید محمدزاده[۱*]، آرام شریفی[۲]
۱. استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
۲. دانشجوی دکترای باکتری‌شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٤/٥/٦ - تاریخ تصویب: ۱۳۹٥/٥/۲٤)

چکیده
بیوفیلم یک اجتماع میکروبی پیچیده است که درون ماتریکس پلی‌ساکاریدی و یا پروتئینی محصور شده است. بیوفیلم می‌تواند توسط میکروارگانیسم‌هایی مانند قارچ‌ها و باکتری‌ها ایجاد شود. هم باکتری‌های گرم مثبت و هم گرم منفی این توانایی را دارند. مقاومت باکتریایی ایجاد شده در فاز بیوفیلم به مواد ضدمیکروبی یک مسئله مهم جهانی است. بیوفیلم باکتریایی از جنبه‌های مختلفی مانند بیماری‌های وابسته به عفونت‌های مزمن انسانی، پلاک دندان، عفونت اجسام خارجی مانند کاتترها، بیماری‌های دامی و گیاهی و همچنین در واحدهای فرآوری مواد غذایی دارای اهمیت است. تخمین زده شده است که بیش از ۸۰ درصد موارد عفونت انسانی مربوط به تشکیل بیوفیلم توسط باکتری مهاجم است. مطالعه حاضر به معرفی بیوفیلم باکتریایی و اهمیت آن می‌پردازد. مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلم بحث می‌شود و در انتها مکانیسم‌های ضدبیوفیلمی شناخته شده بررسی می‌گردند. همچنین با توجه به اهمیت ترکیبات گیاهی در درمان عفونت‌های باکتریایی و توجه روزافزون محققان به آن‌ها، تعدادی از مطالعات اخیر در زمینه‌های مختلف کنترل بیوفیلم به وسیله ترکیبات گیاهی آورده شده است.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم باکتریایی، مکانیسم‌های ضدبیوفیلمی، ترکیبات گیاهی.

Bacterial biofilm and its inhibition mechanisms relying on anti-biofilm properties of plant compounds

Abdolmajid Mohammadzadeh[1*], Aram Sharifi[2]
1. Assistant Professor of Microbiology, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
2. Ph.D. Student of Bacteriology, Faculty of Paraveterinary Science, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
(Received: Jul. 28, 2015 - Accepted: Aug. 14, 2016)

Abstract
Biofilm is a complex community of microorganisms residing within a polysaccharide and/or protein matrix. Biofilm can be produced by microorganisms such as bacteria and fungi. Both gram positive and gram negative bacteria have this ability. Resistance of biofilm to antimicrobial agents is becoming a global issue. Bacterial biofilms are important in various aspects such as chronic human infections, dental plaque, infection of indwelling medical devices like catheters; animal and plant diseases and they are also a major problem in industries and food processing units. It is estimated that more than 80% of all microbial infections are caused by biofilms. The aim of this study was to describe biofilm and the importance of bacterial biofilms. We discoursed about resistance of bacteria in biofilm phase; and finally, the known anti-biofilm mechanisms have been discussed. Also, due to the importance of plant compounds for treatment of bacterial infections and as, there has been increased interest in controlling of bacterial infections by these substances, some recent studies in this field (plant compounds as anti-biofilm agents) have been expressed.

Keywords: Anti-biofilm mechanisms, bacterial biofilm, plant compounds.

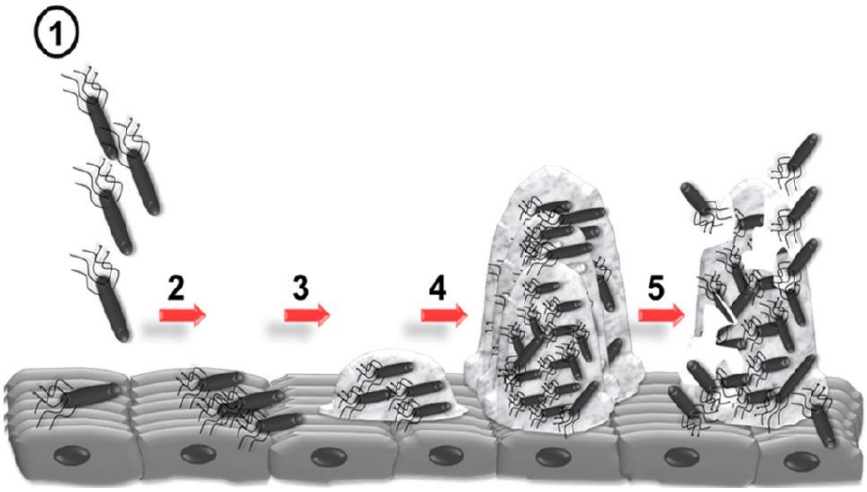
* نویسنده مسئول: E-mail: Mohammadzadeh4@gmail.com

مقدمه

بیوفیلم را می‌توان یک اجتماع باکتریایی نامید که در آن باکتری‌ها به یک سطح زنده یا غیرزنده اتصال داشته و در یک لایه خارج سلولی محصور شده‌اند (Donlan et al., 2002). 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 صورد می‌پذیرد. در این حالت وضعیت میکروارگانیسم از فرم پلانکتونی[1] به فرم ثابت تغییر می‌یابد. پس از اتصال اولیه، پروتئین‌های سطح میکروب متصل شونده به ماتریکس[2] به صورت اختصاصی اتصال باکتری را به سطح قوی‌تر می‌کنند. با تکثیر باکتری میکروکلنی[3] باکتریایی تشکیل می‌شود و به دنبال آن ساختار سه بعدی که همان بیوفیلم بالغ[4] است شکل می‌گیرد. این بیوفیلم بالغ پس از مدتی متلاشی شده اما سلول‌های باکتریایی آزاد شده می‌توانند در مکان(های) دیگر ایجاد عفونت و کانون جدید بیوفیلمی نمایند (Watnick *et al.*, 2000) (این مراحل در شکل ۱ قابل مشاهده است.) تشکیل بیوفیلم به وسیله تعاملات بین سلولی[5] (بین باکتریایی) به نام سیستم حد نصاب[6] 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 با واسطه مولکول‌های کوچکی به نام مولکول‌های خودالقاگر[7] 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[8] رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا می‌کنند. این تغییرات در سطح بیان ژنی، فاکتورهای تهاجمی[9] مختلفی از جمله بیوفیلم را در باکتری تحت تأثیر (القا یا سرکوب) قرار می‌دهد. تغییرات محیط پیرامون میکروارگانیسم باعث تبدیل شدن فرم پلانکتونی به فرم بیوفیلمی می‌شود. در گذر از فاز پلانکتونی به فاز بیوفیلمی بیان ژنی در سلول باکتریایی دست‌خوش تغییرات فراوانی می‌شود. مولکول‌های سطح سلول، مسیرهای متابولیسمی خاص و تولید فاکتورهای حدت به ماندگاری باکتری در شرایط بیوفیلم کمک می‌کنند (Klebensberger *et al.*, 2009). در فاز بیوفیلمی باکتری در یک ماتریکس خارج سلولی خودساز[10] محصور می‌شود. این ماتریکس ۹۰ درصد حجم توده بیوفیلم را تشکیل می‌دهد. ماتریکس از پلی‌مرهای خارج سلولی، پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات، پیلی[11]، فلاژله[12]، سایر فیبرهای چسبنده[13] و DNA خارج سلولی[14] تشکیل شده است. وظیفه این ماتریکس خارج سلولی، حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلم می‌باشد (Kostakioti *et al.*, 2013). مواد غذایی به دام افتاده درون ماتریکس تامین کننده نیاز غذایی باکتری‌ها در بیوفیلم می‌باشد. آب نیز به واسطه خاصیت هیدروفیلی پلی‌ساکارید ماتریکس، برای حفظ حیات باکتری‌ها تامین 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

1. Planktonic form
2. Microbial Surface Component Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs)
3. Microcolony
4. Mature biofilms
5. Cell–cell interactions
6. Quorum Sensing (QS)
7. Autoinducers molecules
8. Threshold
9. Virulence factors
10. Self-producedextracellular matrix
11. Pili
12. Flagellum
13. Fibrillar adhesions
14. Extracellular DNA (eDNA)

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 (Flemming *et al*., 2010).



شکل ۱. مراحل تشکیل بیوفیلم: در مرحله ۱ باکتری با سطح اتصال برگشت‌پذیر ایجاد می‌کند. این اتصال در مرحله ۲ قوی و برگشت‌ناپذیر می‌شود. در مرحله ۳ با تولید اگزوپلی‌ساکارید خارج سلولی میکروکلنی تشکیل می‌شود. در مرحله ۴ با رشد و تکثیر باکتری‌ها بیوفیلم باکتریایی بالغ می‌شود. در نهایت پس از گذشت مدتی با تخریب کپسول پلی‌ساکاریدی بیوفیلم متلاشی می‌شود.

باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند به دلیل مقاومت بالای آن‌ها می‌توانند عفونت‌ها مزمن[1] مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی[2] ایجاد کنند. بیوفیلم باکتریایی ایجادشده در این حالت به درمان توسط آنتی‌بیوتیک‌های معمول مقاوم می‌باشد. ایجاد بیوفیلم می‌تواند باعث چندین مشکل در زمینه پزشکی شود که از جمله آن‌ها، عفونت وسایل خارجی مانند کاتترها[3]، لوله‌های حلقی و لنزهای تماسی[4] و همچنین عفونت بافت‌های زنده مانند عفونت اندوکارد[5]، عفونت زخم[6] و عفونت اپی‌تلیوم ریه بخصوص در مبتلایان به سیستیک فیبروزیس[7] می‌باشد (Taj *et al*., 2012; Ramsey, 1996).

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*[8]، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، استرپتوکوکوس‌های گروه ویریدانس و باکتری‌های گرم منفی: *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*[9]، *پروتئوس میرابیلیس*[10] و *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد (Donlan, 2001).

1. Chronic infections
2. Tissue damage
3. Catheters
4. Contact lenses
5. Endocarditis
6. Wound infection
7. Cystic fibrosis
8. *Enterococcus faecalis*
9. *Klebsiella pneumonia*
10. *Proteus mirabilis*

مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلمی

عفونت‌های ایجادشده به وسیله بیوفیلم باکتری‌ها اغلب مقاوم به درمان هستند. گزارش شده است که مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلم ۱۰۰۰ بار بیشتر از حالت پلانکتونی یا رشد آزاد همان باکتری می‌باشد (Costerton *et al*., 1999). چندین مکانیسم در ایجاد این مقاومت نقش دارند. اولین مکانیسم مربوط به ماتریکس می‌باشد که یک سد فیزیکیوشیمیایی[1] در برابر نفوذ آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شود (Ciofu *et al*., 2012). دومین فرضیه در رابطه با مقاومت باکتریایی در مرحله بیوفیلمی، مربوط به سطح فعالیت متابولیکی باکتری است. به این صورت که در قسمت‌های عمقی بیوفیلم به دلیل کمبود مواد مغذی در دسترس، تکثیر و رشد باکتریایی متوقف می‌شود یا در سطح پایینی انجام می‌گیرد که این حالت باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود (Brown *et al*., 1988). غیر از مواد غذایی دسترسی باکتری‌ها در قسمت‌های زیرین بیوفیلم به اکسیژن کم می‌شود. این امر نیز منجر به کاهش رشد و تکثیر سلولی می‌شود. ایجاد حالت مقاومت ناشی از غیرفعال بودن باکتری در بیوفیلم، در مورد آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر سلول در حال رشد و تقسیم اثر می‌گذارند از اهمیت بیشتری برخوردار است. چون‌که این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها زمانی عمل می‌کنند که باکتری در فاز رشد و تقسیم باشد. بتالاکتام‌ها[2] مانند پنی‌سیلین[3] جزو این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (Walters *et al*., 2003).

سومین فرضیه ایجاد مقاومت باکتریایی در حالت بیوفیلم مربوط به تغییرات ژنتیکی در شرایط مختلف می‌باشد به این صورت که فرکانس موتاسیون[4] در فرم بیوفیلمی بسیار بیشتر از شکل پلانکتونی باکتری می‌باشد. گزارش شده است که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در حالت بیوفیلم ۱۰۵ مرتبه بیشتر از شکل پلانکتونی دچار موتاسیون می‌شود (Driffield *et al*., 2008). Ma & Bryers (2013) اخیراً گزارش کردند که باکتری حاوی پلاسمید (حامل ژن مقاومت به کلیندامایسین[5]) در فاز بیوفیلمی ۱۰ برابر بیشتر این پلاسمید را به بقیه باکتری‌ها منتقل می‌کند. در نهایت در حالت بیوفیلمی تعدادی از سلول‌های باکتریایی خود را با یک حالت فنوتیپی متمایز[6] از حالت پلانکتونی عادت می‌دهند این حالت با بیان ژن‌های مربوط به بیوفیلم و خاموش شدن ژن‌های حالت پلانکتونی همراه است. این تغییرات بیان ژنی یکی از عواملی است که باکتری را نسبت به مواد شیمیایی کشنده مقاوم می‌کند (Costerton *et al*., 1999).

معرفی ترکیبات ضدبیوفیلمی

این ترکیبات به دو گروه ۱- ترکیبات ضدبیوفیلمی غیرگیاهی و ۲- ترکیبات ضدبیوفیلمی گیاهی تقسیم‌بندی می‌شوند.

ترکیبات ضدبیوفیلمی غیر گیاهی

پوشش سطحی

از این گروه می‌توان به پوشش ضدمیکروبی[7] اشاره کرد. پوشاندن سطح با آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد بیوسید 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 ضدمیکروبی کارایی خود را از دست داده یا اثر آن‌ها بسیار کم می‌شود (Dror *et al*., 2009). راه‌کار دیگر جهت مهار تشکیل

1. Physicochemicalbarrier
2. β lactames
3. Penicilin
4. Mutation
5. Clindamycin
6. Distinct phenotypic form
7. Antimicrobial coatings

بیوفیلم ایجاد تغییرات فیزیکی بر روی سطح است. تشکیل بیوفیلم با اتصال اولیه باکتری به سطح انجام می‌گیرد. میزان آبگریزی[1] 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 (Jansen *et al*., 1995).

مهارکنندگان سیستم حد نصاب

مراحل تشکیل بیوفیلم تحت کنترل سیستم حد نصاب است. دراین 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[2] 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 *Bromated furanones* که اولین بار از جلبک قرمز *Delisea pulchra* به دست آمد. اما امروزه ساختارهای شبیه به آن به صورت صناعی سنتز می‌شود. این ماده از تشکیل بیوفیلم در استرپتوکوکوس‌های ویریدانس مانند *استرپتوکوکوس موتانس*[3] (که در تشکیل بیوفیلم و پلاک دندان اهمیت زیادی دارد) با مهار QS ممانعت می‌کند (He *et al*., 2012).

باکتریوفاژها[4]

استفاده از باکتریوفاژهای لیتیک می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و یا مکمل آن‌ها در درمان عفونت‌ها به‌کار برده شود. باکتریوفاژها برای انسان مضر نیستند و برای باکتری میزبان کاملاً اختصاصی هستند. فاژها قادر به حذف بیوفیلم در باکتری میزبان خود هستند. به‌عنوان مثال فاژ T4 می‌تواند درون بیوفیلم تشکیل شده باکتری *اشریشیا کلی* تکثیر یابد و با کشتن این باکتری ساختار فیزیکی بیوفیلم را تخریب کند (Meng *et al*., 2011). بسیاری از فاژها پلی‌مرازهایی تولید می‌کنند که پلی‌مر خارج سلولی بیوفیلم را تجزیه می‌کند. برای باکتری *کلبسیلا آئروژنز*[5] فاژ تجزیه‌کننده اگزوپلی‌ساکارید و کپسول شناسایی شده است (Sutherland *et al*., 2004). همچنین فاژ لیزین‌ها[6] یا اندولایزین‌ها[7] جزو مواد ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت محسوب می‌شوند که به خاصیت ضد بیوفیلمی فاژ کمک می‌کنند. از جمله اشکالات استفاده از فاژ به‌عنوان یک مکانیسم ضد بیوفیلمی این است که ذرات فاژی اختصاصی میزبان[8] هستند؛ بنابراین طیف اثر محدودی دارند. همچنین ممکن است در باکتری‌ها مقاومت فاژی ایجاد شود. یکی دیگر از معایب فاژ این است که بعضی از فاژها حامل ژن‌های مربوط به فاکتور تهاجم[9] هستند که امکان انتقال این ژن‌ها به باکتری درمان شده با فاژ وجود دارد (Donlan, 2009).

آنزیم‌ها[10]

از آنجایی که باکتری‌های بیوفیلم درون ماتریکس خارج سلولی محصور شده‌اند، تخریب ماتریکس بیوفیلم می‌تواند به عنوان روشی جهت تخریب بیوفیلم تشکیل شده، مورد استفاده قرار گیرد. گلیکوزیدازها[11]، پروتئازها[12] و دئوکسی‌ریبونوکلئازها[13]

1. Hydrophobicity
2. Quorum sensing inhibitors (QSIs)
3. *Streptococcus mutans*
4. Bacteriophages
5. *Klebsiella aerogenes*
6. Phage lysins
7. Endolysins
8. Host-specific
9. Virulence factors
10. Enzymes
11. Glucosidases
12. Protease
13. Deoxyribonuclease

از جمله این آنزیم‌ها هستند (Kaplan *et al*., 2010). Dispersin B یک آنزیم تجزیه‌کننده ماتریکس بیوفیلم می‌باشد. این ماده یک گلیکوزیداز بوده که از باکتری *اکتینوباسیلوس اکتینومیست-کومیتنس*[1] به دست می‌آید. این آنزیم ماده پلی‌ان-استیل‌گلوکزآمین[2] که در ساختار ماتریکس بیوفیلم اکثر باکتری‌ها حضور دارد را تجزیه می‌کند (Kaplan *et al*., 2003).

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توانایی تولید پلی‌ساکارید آلژینات[3] و همچنین آنزیم تجزیه‌کننده آلژینات را دارد. آلژینات جزء اصلی ساختار ماتریکس بیوفیلم این باکتری است. مطالعات نشان می‌دهد افزایش وجود آنزیم تجزیه‌کننده آلژینات باعث حساسیت بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. با افزودن آنزیم به محیط پیرامون باکتری و همچنین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم تجزیه‌کننده آلژینات می‌توان به این هدف دست یافت (Alipour *et al*., 2009).

سورفاکتانت‌ها[4]

پوشاندن سطح با بیوسورفاکتانت‌ها[5] 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 کمتری دارند و زیست‌تخریب‌پذیری[6] یا تجزیه بیشتری دارند (Banat *et al*., 2010). سورفاکتین[7] یک لیپوپپتید است که توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس*[8] تولید می‌شود. این ماده توانایی تغییر سطوح را دارد و تشکیل بیوفیلم باکتریایی را دچار اختلال می‌کند. همچنین گلیکولیپید مترشحه از باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به نام رامنولیپید[9] این خاصیت را داراست (Nitschke *et al*., 2010). 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 ۰/۱ درصد سورفاکتین باعث کاهش معنی‌دار چسبندگی باکتری *لیستریا منوسیتوژنز*[10] و *انتروباکتر ساکازاکی*[11] می‌شود (Nitschke *et al*., 2009).

نانوذرات[12]

تشکیل بیوفیلم را می‌توان با پوشاندن سطوح با نانوذرات مهار کرد این مهار بیوفیلم می‌تواند ناشی از مهار چسبندگی باکتری به سطح یا خاصیت ضدباکتریایی نانوذره یا هر دوی آن‌ها باشد (Lellouche *et al*., 2012). مطالعات نشان داده است که نانوذرات فلوراید منیزیم[13] به واسطه‌ی خاصیت ضدباکتریایی خود، قادر به مهار تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های مهم از جمله *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. کاتترهای پوشیده شده با این ماده به میزان زیادی به عفونت بیوفیلمی ایجاد شده توسط این پاتوژن‌ها مقاوم است (Musee, 2011). سطوح شیشه‌ای که به‌وسیله نانوذرات اکسید

1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
2. Poly-N-acetylglucosamine (PNAG)
3. Alginate
4. Surfactants
5. Biosurfactants
6. Biodegradation
7. Surfactin
8. *Bacillus subtilis*
9. Rhamnolipid
10. *Listeria monocytogenes*
11. *Enterobacter sakazakii*
12. Nanoparticles
13. Magnesium fluoride

روی پوشش داده شده‌اند با تولید فرآورده‌های فعال و سمی اکسیژن باعث مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شوند (Applerot, 2012). Gurunathan *et al.* (2014)، اثر نانوذرات نقره را روی بیوفیلم باکتریایی تعدادی از باکتری‌های پاتوژن بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره باعث مهار بیوفیلم باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا فلکسنری*[1]، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* می‌شود. همچنین نشان دادند که نانوذرات نقره باعث تشدید اثر کشندگی (اثر هم‌افزایی[2]) آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و وانکومایسین علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌شود (Sangiliyandi *et al.*, 2014).

مشتقات گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلمی[3]

تلاش محققان جهت معرفی ترکیبات با خاصیت ضد بیوفیلمی منجر به شناخت ترکیبات گیاهی شده است که به صورت طبیعی گیاهان برای محافظت از خود در برابر استقرار باکتریایی از آن‌ها استفاده می‌کنند. این ترکیبات که وزن مولکولی کمتر از ۵ کیلو دالتون دارند را اصطلاحاً "Parvome" می‌گویند. (Parv به معنای کوچک و ome به معنای گروه). از جمله این ترکیبات می‌توان آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فلاونوئید و کومارین‌ها، پپتیدها، گلیکوزیدها نوکلئوزیدها و پلی‌فنل‌ها را نام برد (Davies *et al.*, 2012). Coenye *et al.* (2012)، در یک مطالعه پنج گونه گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلمی را معرفی کردند. غلظت تحت MIC[4] گیاهان *Rhodiola crenulata*، *Epimedium brevicornum* و *Polygonum cuspidatum* توانایی مهار بیوفیلم باکتری *پروپیونی‌باکتریوم آکنس*[5] داشتند. ماده موثره‌ی این گیاهان که باعث ایجاد خاصیت ضد بیوفیلمی در آن‌ها شد به ترتیب resveratrol، icariin و salidroside بودند (Coenye *et al.*, 2012). ترکیبات گیاهی از راه‌های مختلفی می‌توانند بیوفیلم را مهار کنند؛ گیاهانی که عصاره آن‌ها برای باکتری‌ها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلم باکتریایی می‌شود. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلم تأثیر می‌گذارد. مزیت این ترکیبات این است که باکتری‌ها به آن‌ها مقاوم نمی‌شوند (Truchado *et al.*, 2009). به‌عنوان مثال برخی از ترکیبات گیاهی با سیستم حد نصاب که بیوفیلم باکتریایی را کنترل می‌کند، تداخل ایجاد می‌کنند. Ravichandiran *et al.* (2012)، از عصاره اتانولی گیاه *Meliadubia* به‌عنوان یک ترکیب ضد بیوفیلمی استفاده کردند و نشان دادند که این عصاره با تداخل و مهار سیستم حد نصاب در باکتری *اشریشیا کلی* باعث مهار بیوفیلم این باکتری می‌شود (Ravichandiran *et al.*, 2012). در یک مطالعه دیگر که روی خواص ضدبیوفیلمی گیاه *زیره سبز*[6] انجام شد مشخص گردید که میزان ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره این گیاه باعث مهار تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس*[7] و *سراشیا مارسسنس*[8] در غلظت پایین‌تر از مهارکنندگی رشد یا Sub-MIC می‌شود. نتیجه مطالعات مولکولی بیشتر نشان داد که این خاصیت مربوط به جزء Methyl eugenol گیاه *زیره سبز* است که در سیستم حد نصاب باکتری‌های مورد مطالعه تداخل ایجاد می‌کند و در حقیقت دارای

1. *Shigella flexneri*
2. Synergistic effect
3. Plant-derived antibiofilm compounds
4. Sub-MIC concentration
5. *Propionibacterium acnes*
6. *Cuminum cyminum*
7. *Proteus mirabilis*
8. *Serratia marcescens*

خاصیت مهارکنندگی سیستم حد نصاب[1] است (Issac Abraham *et al*., 2012). اولین مرحله برای استقرار و تشکیل بیوفیلم باکتریایی چسبیدن باکتری به سطح می‌باشد (Arciola *et al*., 2012). بنابراین هر ماده‌ای که در چسبیدن و تعامل باکتری با سطح اختلال ایجاد کند می‌تواند به صورت بالقوه به عنوان یک ترکیب ضدبیوفیلمی عمل کند. Sandasi *et al*. (2011)، اثر هشت عصاره گیاهی[2] را روی چسبیدن باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و قارچ *کاندیدیا آلبیکنز*[3] بررسی کردند. در این مطالعه مشخص شد که عصاره گیاهان *Echinacea angustifolia*، *Mentha piperita* و *Rosmarinus officinalis* باعث مهار (بیشتر از ۵۰ درصدی) چسبیدن باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به سطح می‌شوند (Sandasi *et al*., 2011). در یک مطالعه دیگر که روی بیوفیلم باکتری‌های گرم منفی انجام شد، تأثیر اسید اورسولیک[4] به دست آمده از عصاره‌های گیاهی روی بیوفیلم باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *ویبریو هاروه‌یی*[5] بررسی گردید. تأثیر این ماده روی بیوفیلم باکتری‌ها با روش میکروتیتر پلیت[6] تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که اسید اورسولیک گیاهی از یک طرف باعث مهار بیوفیلم باکتری‌های مذکور شده و از طرف دیگر برای آن‌ها سمی نمی‌باشد. نتایج ریزآرایه[7] DNA نشان داد که این ترکیب تأثیری روی سیستم حد نصاب نداشته و ژن‌های دخیل در شیمیوتاکسی[8] و حرکت باکتری *اشریشیا کلی* (*cheA*، *tap*، *tar* و *motAB*) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این ژن‌ها در چسبیدن باکتری که برای تشکیل بیوفیلم ضروری می‌باشد حائز اهمیت هستند (Ren *et al*., 2005).

یکی دیگر از راهکارهای مهار بیوفیلم و یا حذف آن، مهار پمپ‌های افلوکس[9] می‌باشد. باکتری‌ها جهت بیرون راندن مواد سمی و متابولیت‌های زائد از سیستم‌های پمپی مختلفی استفاده می‌کنند. پمپ‌های یک یا چند واحدی در دیواره سلولی باکتری‌ها این عمل را انجام می‌دهند. حضور و فعالیت این پمپ‌ها باعث ایجاد مقاومت به ترکیبات شیمیایی مانند آنتی‌بیوتیک‌ها و به وجود آمدن سویه‌های مقاوم به چند دارو[10] می‌شود. در فاز بیوفیلمی به دلیل محصور بودن باکتری‌ها در ماتریکس خارج سلولی مواد زائد حاصل از سوخت و ساز باکتری تجمع پیدا می‌کند. باکتری به منظور رهایی از این مواد زائد پمپ‌های افلوکس خود را به شدت فعال می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که مهار این پمپ‌ها می‌تواند باعث تخریب بیوفیلم تشکیل شده و افزایش حساسیت باکتری‌های بیوفیلم به آنتی‌بیوتیک‌ها شود (Kvist *et al*., 2008). آلکالوئید رزرپین[11] که اولین بار از گیاه *راولفیا سرپنتینا*[12] به دست آمد خاصیت مهارکنندگی افلوکس پمپی دارد. این خاصیت ابتدا علیه افلوکس پمپ Bmr در باکتری *باسیلوس ساتیلیس* شناسایی شد. پمپ Bmr مسئول پمپ کردن آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین به خارج از باکتری می‌باشد (Neyfakh *et al*., 1991). همچنین گزارش شده است که رزرپین باعث کاهش ۴ برابری MIC تتراسایکلین علیه دو جدایه کلینیکی باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاوم به متی‌سیلین می‌شود (Gibbons *et al*., 2000). پیپرین[13] یک آلکالوئید گیاهی مربوط به گیاهان خانواده *Piperaceae* از جمله *فلفل سیاه*[14]

1. Quorum sensing inhibitor (QSI)
2. Essential oils
3. *Candida albicans*
4. Ursolic acid
5. *Vibrio harveyi*
6. Microtiter plates Test (MpT)
7. Microarray
8. Chemotaxis
9. Efflux Pumps
10. Multiple drug resistance (MDR)
11. Reserpine
12. Rauwolfia vomitoria
13. Piperine
14. *Piper nigrum*

است. پیپرین عامل طعم و بوی *فلفل سیاه* است. Khan *et al.* (2006)، نشان دادند که این ترکیب گیاهی در غلظت ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر باعث کاهش دو برابری MIC باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* نسبت به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین[1] می‌شود. این کاهش MIC مربوط به افزایش غلظت آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین درون باکتری، در نتیجه‌ی خاصیت مهارکنندگی افلوکس پمپ‌ها می‌باشد (Khan *et al.*, 2006).

در نهایت پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری روی ترکیبات دقیق ساختار بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* انجام پذیرد تا بتوان به صورت دقیق این ساختار را مورد هدف دارویی قرار داد. همچنین استفاده از ترکیبات پروتئینی ساختار کپسول بیوفیلم این باکتری می‌تواند به عنوان واکسن جهت مهار ایجاد عفونت بیوفیلمی بکار برده شود. با توجه به تأثیر ترکیبات گیاهی روی بیوفیلم باکتری‌های مختلف از جمله *استافیلوکوکوس اورئوس* پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری جهت معرفی این ترکیبات گیاهی همراه با بررسی مکانیسم اثر آن‌ها انجام گیرد.

REFERENCES

Alipour, M.; Suntres, ZE.; Omri, A.; (2009). Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Antimicrobial and Chemotherapy; 64: 317-325.

Applerot, G.; (2012). ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. RSC Adv; 2: 2314-2321.

Arciola, CR.; Campoccia, D.; Speziale, P.; Montanaro, L.; Costerton, JW.; (2012). Biofilm formation in Staphylococcus implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials; 33; 5967-5982

Banat, IM.; Franzetti, A.; Gandolfi, I.; Bestetti, G.; Martinotti, MG.; Fracchia, L.; (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. Applied Microbiology and Biotechnology; 87: 427-444.

Brown, MRW.; Allison, DJ.; Gilbert, P.; (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect?. Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 22(6): 777-780.

Ciofu, O.; Mandsberg, LF.; Wang, H.; Hoiby, N.; (2012). Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. FEMS Immunology and Medical Microbiology; 65(2): 215-225.

Coenye, T.; Brackman, G.; Rigole, P.; (2012). Eradication of Propionibacterium acnes biofilms by plant extracts and putative identification of icariin, resveratrol and salidroside as active compounds. Phytomedicine; 19(5): 409-412.

Costerton, JW.; (1999). Introduction to biofilm. International Journal of Antimicrobial Agents; 11(3-4),217-221.

Costerton, JW.; Stewart, PS.; Greenberg. EP.; (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science; 284(5418): 1318-1322.

Davies. J.; Ryan, KS.; (2012). Introducing the parvome: bioactive compounds in the microbial world. ACS Chem Biol; 7: 252-259.

Donlan, RM.; (2001). Biofilms and device-associated infections. Emerg Infect Dis; 7: 277-281.

Donlan, RM.; (2009). Preventing biofilms of clinically relevant organisms using bacteriophage. Trends in Microbiology; 17: 66-72.

1. Ciprofloxacin

Donlan, RM.; Costerton, JW.; (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Review; 15: 167-193.

Dror, N.; Mandel, M.; Hazan, Z.; Lavie, G.; (2009). Advances in Microbial Biofilm Prevention on Indwelling Medical Devices with Emphasis on Usage of Acoustic Energy; 9: 2538-2554.

Flemming, HC.; Wingender, J.; (2010). The biofilm matrix. Nature Review Microbiology; 8: 623-633.

Gibbons, S.; Udo, EE.; (2000). The effect of reserpine, a modulator of multidrug efflux pumps, on the in vitro activity of tetracycline against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) possessing the tet(K) determinant. Phytother Res; 14: 139-40.

He, Z.; Wang, Q.; Hu, Y.; Liang, J.; Jiang, Y.; Ma, R.; Tang, Z.; Huang, Z.; (2012). Use of the quorum sensing inhibitor furanone C-30 to interfere with biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its *luxS* mutant strain. International Journal of Antimicrobial Agents; 40: 30-35.

Issac Abraham, SVP.; Palani, A.; Khadar, SM.; Shunmugiah, KP.; Arumugam, VR.; (2012). Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. Food Research International; 45: 85-92.

Jansen, B.; Kohnen, W.; (1995). Prevention of biofilm formation by polymer modification. J Ind Microbiol; 15: 391-396.

Kaplan, JB.; (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. Journal of Dental Research; 89: 205-218.

Kaplan, JB.; Ragunath, C.; Ramasubbu, N.; Fine. DH.; (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β-hexosaminidase activity. Journal of Bacteriology; 185: 4692-4698.

Khan, IA.; Mirza, ZH.; Kumar, A.; Verma, V.; NabiQazi, G.; (2006). Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother; 50: 810-812.

Klebensberger, J.; Birkenmaier, A.; Geffers, R.; Kjelleberg, S.; Philipp, B.; (2009). SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. Environ Microbiology; 11: 3073-3086.

Kostakioti, M.; Hadjifrangiskou, M.; Hultgren, SJ.; (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring HarbPerspect Med; 3: 1-23.

Kvist, M.; Hancock, V.; Klemm, P.; (2008). Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. Applied and Environmental Microbiology; 74(23): 7376-7382.

Lellouche, J.; Friedman, A.; Gedanken, A.; Banin, E.; (2012). Antibacterial and antibiofilm properties of yttrium fluoride nanoparticles. International Journal of Nanomedicine; 7: 5611-5624.

Ma, H.; Bryers, JD.; (2013). Non-invasive determination of conjugative transfer of plasmids bearing antibiotic-resistance genes in biofilm-bound bacteria: effects of substrate loading and antibiotic selection. Applied Microbiology and Biotechnology; 97(1): 317-328.

Meng, X.; Shi, Y.; Ji, W.; Meng, X.; Zhang, J.; Wang, H.; Lu, C.; Sun, J.; Yan, Y.; (2011). Application of a bacteriophage lysin to disrupt biofilms formed by the animal pathogen *Streptococcus suis*. Applied and Environmental Microbiology: 8272-8279.

Musee, N.; (2011). The antibacterial

effects of engineered nanomaterials: implications for wastewater treatment plants. Journal of Environmental Monitoring; 13: 1164-1183.

Neyfakh, AA.; Bidnenko, VE.; Chen, LB.; (1991). Efflux-mediated multi-drug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system. ProcNatlAcadSci USA; 88: 4781-4785.

Nitschke, M.; Araújo, V.; Costa, SGVAO.; Pires, RC.; Zeraik, AE.; (2009). Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteriato solid surface. Letters in Applied Microbiology; 49: 241-247.

Nitschke, M.; Costa, SGVAO.; Contiero, J.; (2010). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. Applied Biochemistry and Biotechnology; 160: 2066-2074.

Ramsey, BW.; (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. The New England Journal of Medicine; 335(3): 179-188.

Ravichandiran, V1.; Shanmugam, K.; Anupama, K.; Thomas, S.; Princy, A.; (2012). Structure-based virtual screening for plant-derived SdiA-selective ligands as potential antivirulent agents against uropathogenic *Escherichia coli*. Eur J Med Chem; 48: 200-205.

Ren, D.; Zuo, R.; Gonza´lez Barrios, AF.; Bedzyk, LA.; Eldridge, GR.; Pasmore, ME.; Wood, TK.; (2005). Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. Appl Environ Microbiol; 71: 4022-4034.

Sandasi, M.; Leonard, CM.; Van Vuuren, SF.; Viljoen, AM.; (2011). Peppermint (*Mentha piperita*) inhibits microbial biofilms in vitro. South African Journal of Botany; 77: 80-85.

Sangiliyandi, G.; Jae, WH.; Deug-Nam, K.; Jin-Hoi, K.; (2014). Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Nanoscale Research Letters; 9(373): 1- 17.

Sutherland, IW.; Hughes, KA.; Skillman, LC.; Tait, K.; (2004). The interaction of phage and biofilms. FEMS Microbiology Letters; 232: 1-6.

Taj, Y.; Essa, F.; Aziz, F.; Kazmi, SU.; (2012). Study on biofilm-forming properties of clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. Journal of Infection in Developing Countries; 6(5): 403-409.

Truchado, P.; Lopez-Galvez, F.; Gil, MI.; Tomas-Barberan, FA.; Allende, A.; (2009). Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. Food Chemistry; 115: 1337-1344.

Walters, MC.; Roe, F.; Bugnicourt, A.; Franklin. MJ.; (2003). Stewart. PS.; Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 47(1): 317-323.

Watnick, P.; Kolter, R.; (2000). Biofilm, city of microbes. Journal of Bacteriology; 182: 2675-2679.