



## از بین بردن ساختار بیوفیلیم باکتریها با استفاده از فازها

محمود یلمه<sup>۱</sup>، محمد باقر حبیبی نجفی<sup>۲</sup>، مژگان یزدی<sup>۱</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

### چکیده:

به اجتماع سلول های میکروبی که محکم به سطحی اتصال پیدا می کنند و با یک ماتریکس اگزو پلی ساکاریدی که دارای منشاء میکروبی است بیوفیلیم می گویند. بیوفیلیم ممکن است از یک نوع گونه باکتریایی یا مخلوطی از چند گونه باکتریایی باشد. از بین بردن بیوفیلیم ها هم از جنبه صنعتی و هم سلامتی اهمیت دارد. هدف از این تحقیق بررسی کارایی باکتریوفازها و فعالیت آنزیمی آنها به عنوان یک روش نابودی بیوفیلیم می باشد. علاوه بر این، اختصاصی بودن بالای فازها منجر شده است که از آنها به عنوان یک ابزار مفید در حذف انتخابی یک گونه پاتوژنی قوی در بیوفیلیم های حاصل از چند گونه استفاده شود. بسیاری از فازها پلی ساکاریداز یا پلی ساکارید لیاذهای بسیار اختصاصی تولید می کنند که ماتریکس اگزو پلی ساکاریدی (EPS) حاصل از باکتری ها را تجزیه می کند. آنزیم های فازها بعد مرحله بلوغ بیوفیلیم، اثر تجزیه کننده ای روی EPS ندارد و به همین دلیل استفاده از فازها قبل از این مرحله اهمیت دارد. دما و غلظت مواد تغذیه ای حساسیت به فاز را تحت تاثیر قرار نمی دهد. در حذف باکتری ها از سطوح ترکیب دو فاز یا یک فاز در ترکیب با ترکیبات آمونومی ۴ ظرفیتی و یا مواد ضد عفونی کننده اثر سینرژیستی مشاهده می شود.

**کلمات کلیدی:** بیوفیلیم، فاز، اگزو پلی ساکاریدی، سینرژیست



#### مقدمه :

بیوفیلیم ها اجتماعاتی از باکتری ها، جانوران و گیاهان میکروسکوپی می باشند که به یک سطح می چسبند و یک لایه ژله ای می سازند. این لایه افزون بر فراهم نمودن محیط مناسب برای زیستن، به بهتر چسبیدن و پایدار ماندن میکروب ها بر روی سطح ها کمک می کند و نقش محافظتی نیز دارد. در محیط های آبی، سلول های میکروبی به مواد جامد مانند مواد معدنی و فلزات موجود در محیط می چسبند و واکنش های معدنی شدن را آغاز می نمایند. سلول های تثبیت شده رشد می کنند و پلی مرهای خارج سلولی که بیشتر به شکل یک ماتریکس درهم از جنس فیبریل می باشند، را تولید می کنند.

میکروارگانسیم های درون بیوفیلیم، توانایی حفظ محیط سطحی و درونی بیوفیلیم در برابر عوامل گوناگون مانند pH، اکسیژن محلول و دیگر عوامل آلی و معدنی می باشند. چنین پیدا است که میکروارگانسیم ها درون بیوفیلیم مواد معدنی را تولید می کنند و واکنش های جانمایی این مواد را به گونه ای انجام می دهند که با فرضیات ترمودینامیکی بر پایه واکنش های شیمیایی قابل پیش گویی نمی باشد. بیشتر بیوفیلیم ها حاوی سلول های ارگانسیم ها و فرآورده های آن ها (پلیمر های خارج سلولی) هستند.

توسعه و گسترش بیوفیلیم ها بر روی هر نوع سطحی که میکروارگانسیم ها وجود دارند، امکان پذیر است. بیوفیلیم ها در همه ی محیط های آبی دیده می شوند. نقش اتصال باکتری ها در شرایط گوناگون بررسی شده است. تشکیل بیوفیلیم یک فرایند پویایی است و شامل مراحل متعددی می باشد. ساخت بیوفیلیم در هر سطحی که اندرون محیط باکتری باشد، انجام پذیر است.

انتقال مواد مغذی در فاز مایع بسیار سریع تر از باکتری ها در بیوفیلیم ها می باشد. این افزایش در میزان مواد غذایی، امکان ایجاد بیوفیلیم را افزایش می دهد و از سویی به محیط رقابتی نیز بستگی دارد که در تشکیل بیوفیلیم شرکت می کند.

#### ویژگی های بیوفیلیم :

بیوفیلیم ها و توده های میکروبی خاصیت های فیزیکوشیمیایی دارند که برای کارکرد آن ها در طبیعت، ارزش سرنوشت سازی دارند. این ویژه گی ها عبارتند از:

- پایدار بودن نسبت به اصطکاک
- پایداری مکانیکی بیوفیلیم ها و توده ها
- پایداری هیدرولیتیکی بیوفیلیم در غشاء های جدا کننده
- مقاومت به هدایت گرمایی در نوسان های دما
- مقاومت انتشاری ماتریکس بیوفیلیم در راکتورهای بیوفیلیمی
- گنجایش جذب سطحی، به ویژه سازوکار بیوفیلیم ها در جذب سطحی بیولوژیکی
- خاصیت پیوند با ملکول های آب
- معماری ماتریکس و پیچیدگی ساختار پلی ساکاریدها و آنزیم های خارج سلولی.

یکی از ترکیب های مهم که در ایجاد خواص فیزیکی و فیزیکی شیمیایی بیوفیلیم ها نقش مهمی دارد، ماتریکس اگزوپلی ساکاریدی می باشد.

#### انواع اتصال :

دو نوع اصلی از سلول ها بر اساس نوع اتصالشان به سطح وجود دارد:

سسیل (sessile) : به سلول هایی که غیرمتحرک و ثابت هستند و درون بیوفیلیم قرار دارند گویند.

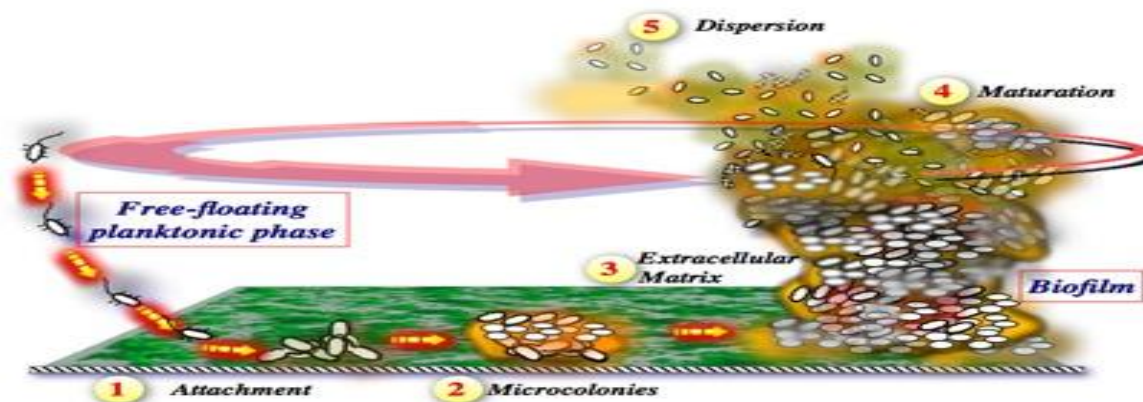
سلول های پلانکتونی (planktonic) : سلول هایی که ازادانه در فاز ابکی شناور هستند و به بیوفیلیم متصل نیستند.



سلول های ثابت شده روی سطح رشد و تولید مثل می کنند و همزمان به سایر سلول ها و همچنین سطح متصل می شوند این سلول ها پلی مرهای خارج سلولی (extracellular polymers) نیز تولید می کنند که از سلول ها به منظور تولید ماتریکسی از فیبرها (matrix of fibers) به بیرون ترشح می شوند.

#### مراحل تشکیل بیوفیلم :

به دلیل اهمیت بیوفیلم در بیو تکنولوژی ، تیمار آب های زائد ، عفونت های باکتریایی و آلودگی های صنعتی ، درک فاکتور هایی که بر چسبیدن و تشکیل بیوفیلم و میکروکلنی موثر است، برای کنترل و استفاده از چنین فرایندهایی ضروری است.



شکل ۱- مراحل تشکیل بیوفیلم

پدیده تشکیل کلنی بر روی سطح را می توان به صورت ۶ مرحله متوالی در نظر گرفت:

۱. وقایعی که ارکانیسم را به نزدیک سطح می آورد
۲. اتصال برگشت پذیر سلول های پلانکتونیک به سطح
۳. اتصال نا برگشت پذیر به سطح و تشکیل میکروکلنی
۴. چسبیدن (Attachment)
۵. رشد و تقسیم ارکانیسم چسبنده به سطح و تشکیل میکروکلنی و بیوفیلم و تشکیل پلیمر خارج سلولی EPS

فاز تفرق، این مرحله ، در صورتیکه عمل چسبیدن با تشکیل کلنی بر روی سطوح تازه و دست نخورده همراه شود در نظر گرفته می شود (بلوغ بیوفیلم). امروزه روشن شده است که آگزوپلی ساکارید بیرونی ، نقش بسزایی در کلونیزه شدن انواع میکروارگانیسمها در سطح های گوناگون دارد. گمان می رود که در بیوفیلم ساخته شده از گونه های گوناگون باکتری ها، آگزوپلی ساکارید برآمده از یک گونه منجر به افزایش مقاومت سایر گونه ها و یا تقویت استقرار آن ها در بیوفیلم می شود. همچنین بیوفیلم بدست آمده در واکنش های دوسویه ی پلیمرهای مختلف ترشح شده در داخل یک بیوفیلم، بسیار استوارتر خواهد بود.

#### ازهم گسستن بیوفیلم ها :

با افزایش سن یک بیوفیلم، باکتری های چسبیده برای تنازع بقاء و ایجاد کلونی های تازه باید از بیوفیلم جدا و رها شوند. بدین روی سلول های دختر به تنهایی و یا توده ای از بیوفیلم جدا می شوند (۴). در فرم توده ای، عمل جدا شدن به صورت دوره ای رخ می دهد و در هر زمان تکه ی بزرگی از سلول های باکتری ها از بیوفیلم خارج می شوند. علت این پدیده ممکن است؛ تغییر سرعت جریان مواد شیمیایی موجود در مایع و یا تغییر خواص باکتری های موجود در بیوفیلم باشد. باکتری های رها شده می توانند به نقطه تازه ای منتقل شده و فرآیند تشکیل بیوفیلم را آغاز کنند.

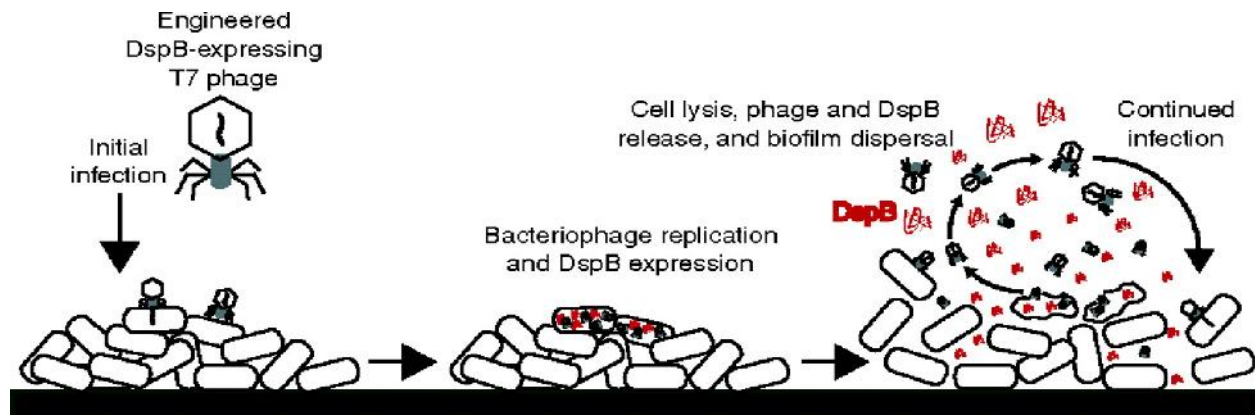
#### کنترل و ازمیان بردن بیوفیلم :



بهترین روش کنترل بیوفیلم پیشگیری از گسترش آن هاست. اقدام های بهداشتی و پاکسازی موثرترین راه است. در این باره، ترکیبی از روش های شیمیایی و فیزیکی که بتواند از انباشت مانده های فرآورده های غذایی و سلول های باکتریها بر سطح دستگاه ها جلوگیری کند. کارساز خواهد بود هدف پاکسازی، شکستن پیوندهای EPS در لایه سطحی می باشد. پاکسازی از طریق عوامل پاک کننده شیمیایی و اغلب همراه با بکارگیری نیروی فیزیکی (اغتشاش آبی) می باشد که استفاده از درجه حرارت بالا، نیاز به نیروی فیزیکی را کاهش می دهد. پاک کننده های شیمیایی با کاهش کشش سطحی، امولسیفیه کردن چربی ها و تجزیه چربی ها و پروتئین ها، پس مانده غذایی را به حالت تعلیق درآورده و در خود حل می کنند. از راه های مختلف می توان با بیوفیلم ها مقابله کرد مثل پاک کننده ها و مواد ضد عفونی کننده، سکواسترانت ها، اوزن، آب فوق داغ (۱۲۰ درجه سانتیگراد) و آب الکترولیز شده خنثی.

### باکتریوفاژها و بیوفیلم :

امروزه محققان به روش جدیدی که در آن از باکتریوفاژها برای از بین بردن بیوفیلم ها استفاده می شود، دست یافتند. باکتریوفاژها که ویروس هایی هستند که میزبان آنها باکتری ها می باشند. باکتریوفاژها می توانند به کمک اندامک های سلول باکتری پروتئین ها و دیگر مواد مورد نیاز برای رشد خود را تولید کنند. از جمله متابولیت هایی که باکتریوفاژها توسط سلول باکتری تولید می کنند آنزیم ها می باشد. آنزیم های تولیدی اغلب از نوع لیاز هستند و ماکرومولکول ها به مواد ریزی که قابل جذب سلول هستند تجزیه می کنند. پروتئازها و آنزیم های تجزیه کننده پلی ساکاریدها از جمله آنزیم های مهم تولیدی توسط باکتریوفاژها هستند. با توجه به اینکه ساختمان ماتریکس بیوفیلم ها عمدتاً از پروتئین و پلی ساکارید ساخته شده است می توان بوسیله آنزیم های ساخته شده توسط باکتریوفاژ، ماتریکس بیوفیلم ها را تجزیه کرده و سلول ها را در معرض محیط قرار داد. در این حالت که سلول ها در محیط آزاد هستند آن مقاومت قبلی را نسبت به تغییرات محیط ندارند و براحتی از بین می روند.



شکل ۲- مکانیسم از بین رفتن ساختار بیوفیلم بوسیله باکتریوفاژ

تحقیقات انجام شده نشان داده که استفاده از باکتریوفاژ E۷۹ برای از بین بردن بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا، و یا باکتریوفاژ T۴ جهت از بین بردن بیوفیلم اشریشیاکلی مناسب بود. استفاده فاژها در مراحل بعد از بلوغ بیوفیلم اثر چندانی بر بیوفیلم ندارد و استفاده از آنها در مراحل ابتدایی اهمیت دارد. باکتریوفاژ تنها در از بین بردن ماتریکس بیوفیلم ها می توانند نقش داشته باشند و برای از بین بردن سلول ها، استفاده از مواد ضد عفونی کننده در کنار باکتریوفاژها اهمیت پیدا می کند.

### نتیجه گیری:

باکتریوفاژها توسط آنزیم هایی که به کمک باکتری ها تولید می کنند می توانند ماتریکس بیوفیلم ها را تجزیه کنند البته اغلب فاژها تنها می توانند قبل از مرحله بلوغ موثر باشند. بهترین راه از بین بردن سلول های تشکیل دهنده ی بیوفیلم استفاده باکتریوفاژها در کنار مواد ضد عفونی کننده است.



منابع:

- ۱) Sivakumar, P.M., Prabhawathi, V., Doble, M. ۲۰۱۰. ۲-Methoxy-۲,۴-dichloro chalcone as an antimicrofoulant against marine bacterial biofilm. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* ۸۱ (۲۰۱۰) ۴۳۹-۴۴۶.
- ۲) Thein, Z.M., Samaranayake, Y.H., Samaranayake, L.P. ۲۰۰۷. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *archives of oral biology* ۵۲ (۲۰۰۷) ۷۶۱-۷۶۷.
- ۳) **Hentzer, M., Riedel, K., Rasmussen, T.B., Heydorn, A., Andersen, J.B.** . Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound. *Microbiology* ( ), , - .
- ۴) Kim, J., park, H.J., Lee, J.H., Hahn, J.S. ۲۰۰۹. Differential effect of chlorine on the oxidative stress generation in dormant and active cells within colony biofilm. *water research* ۴۳ (۲۰۰۹) ۵۲۵۲-۵۲۵۹.
- ۵) Huth, K.C., Quirling, M., Maier, S., Kamereck, K., AlKhayer, M. ۲۰۰۹. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *International Endodontic Journal* ۴۲, ۳-۱۳, ۲۰۰۹.
- ۶) Váchová, L., Stovicek, V., Hlavacek, O., Chernyavskiy, O., Stepanek, L. ۲۰۱۱. Flo11p, drug efflux pumps, and the extracellular matrix cooperate to form biofilm yeast colonies. **THE JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Vol. No**  
: - .