

Bacterial biofilm and its inhibition mechanisms relying on anti-biofilm properties of plant compoundsAbdolmajid Mohammadzadeh^{1*},
Aram Sharifi²

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)

بیوفیلم باکتریایی و مکانیسم‌های مهار آن با تکیه بر خواص ضد بیوفیلمی ترکیبات گیاهیعبدالمجید محمدزاده^{۱*}، آرام شریفی^۲

۱. استادیار میکروبیولوژی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

۲. دانشجوی دکتری باکتری‌شناسی، دانشکده پیرادامپزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۵/۶ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۵/۲۴)

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.

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 ضد میکروبی 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 ضد بیوفیلمی 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 ضد بیوفیلمی، ترکیبات گیاهی.

مقدمه

تراکم باکتریایی در یک محیط به یک حد خاصی می‌رسد غلظت این مولکول‌های انتقال دهنده به حد آستانه^۸ رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا می‌کنند. این تغییرات در سطح بیان ژنی، فاکتورهای تهاجمی^۹ 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 ژنی در سلول باکتریایی دست‌خوش تغییرات فراوانی می‌شود. مولکول‌های سطح سلول، مسیرهای متابولیسمی خاص و تولید فاکتورهای حدت به ماندگاری باکتری در شرایط بیوفیلیم کمک می‌کنند (Klebensberger *et al.*, 2009). در فاز بیوفیلیمی باکتری در یک ماتریکس خارج سلولی خودساز^{۱۰} محصور می‌شود. این ماتریکس ۹۰ درصد حجم توده بیوفیلیم را تشکیل می‌دهد. ماتریکس از پلی‌مرهای خارج سلولی، پروتئین‌های متصل شونده به کربوهیدرات، پیلی^{۱۱}، فلاژله^{۱۲}، سایر فیبرهای چسبنده^{۱۳} و DNA خارج سلولی^{۱۴} تشکیل شده است. وظیفه این ماتریکس خارج سلولی، حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلیم می‌باشد (Kostakioti *et al.*, 2013). مواد غذایی به دام افتاده درون ماتریکس تامین کننده نیاز غذایی باکتری‌ها در بیوفیلیم 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 بیوفیلیم ترشح می‌شود که این آنزیم‌ها روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی تأثیر می‌گذارند. ترکیبات

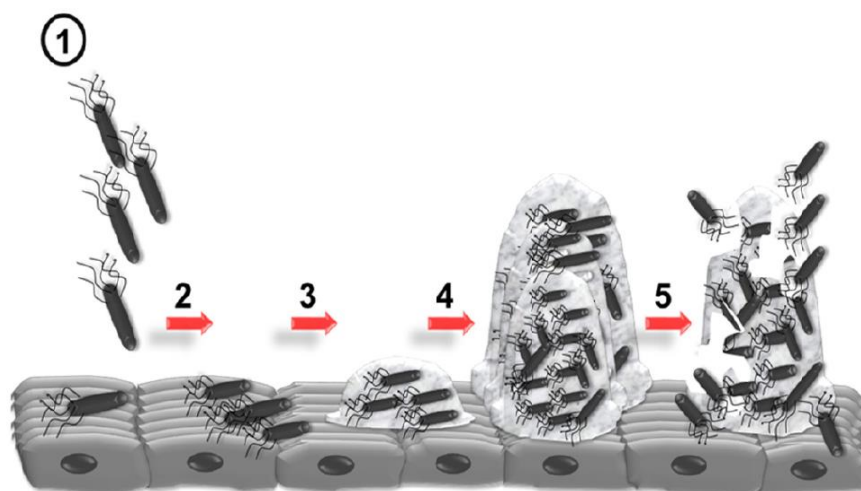
بیوفیلیم را می‌توان یک اجتماع باکتریایی نامید که در آن باکتری‌ها به یک سطح زنده یا غیرزنده اتصال داشته و در یک لایه خارج سلولی محصور شده‌اند (Donlan *et al.*, 2002). مراحل تشکیل بیوفیلیم در باکتری‌ها از یک مدل کلی پیروی می‌کند؛ به این صورت که در اولین مرحله اتصال و استقرار میکروارگانیسم با سطح زنده یا غیر زنده اتفاق می‌افتد. اتصال اولیه با سطح غیر اختصاصی بوده و توسط پیوندهای آب‌گریزی، واندروالسی و الکترواستاتیکی صورت می‌پذیرد. در این حالت وضعیت میکروارگانیسم از فرم پلانکتونی^۱ به فرم ثابت تغییر می‌یابد. پس از اتصال اولیه، پروتئین‌های سطح میکروب متصل شونده به ماتریکس^۲ به صورت اختصاصی اتصال باکتری را به سطح قوی‌تر می‌کنند. با تکثیر باکتری میکروکلنی^۳ باکتریایی تشکیل می‌شود و به دنبال آن ساختار سه بعدی که همان بیوفیلیم بالغ^۴ است شکل می‌گیرد. این بیوفیلیم بالغ پس از مدتی متلاشی شده اما سلول‌های باکتریایی آزاد شده می‌توانند در مکان(های) دیگر ایجاد عفونت و کانون جدید بیوفیلیمی نمایند (Watnick *et al.*, 2000) (این مراحل در شکل ۱ قابل مشاهده است). تشکیل بیوفیلیم به وسیله تعاملات بین سلولی^۵ (بین باکتریایی) به نام سیستم حد نصاب^۶ 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^۷ با هم ارتباط برقرار می‌کنند. زمانی که

8. Threshold
9. Virulence factors
10. Self-produced extracellular matrix
11. Pili
12. Flagellum
13. Fibrillar adhesions
14. Extracellular DNA (eDNA)

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

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).

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،



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.

سیستیک فیبروزیس^۷ 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*^۸، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، *استرپتوکوکوس‌های گروه ویریدانس* و باکتری‌های گرم منفی: *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه*^۹، *پروتئوس میرابیلیس*^{۱۰} و *سودوموناس آئروژینوزا* را نام برد (Donlan, 2001).

باکتری‌هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند به دلیل مقاومت بالای آن‌ها می‌توانند عفونت‌ها مزمن^۱ مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی^۲ 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^۳، لوله‌های حلقی و لنزهای تماسی^۴ و همچنین عفونت بافت‌های زنده مانند عفونت اندوکارد^۵، عفونت زخم^۶ و عفونت اپی‌تلیوم ریه بخصوص در مبتلایان به

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 بیوفیلیم باکتری‌ها اغلب مقاوم به درمان هستند. گزارش شده است که مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلیم 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^۱ 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 بیوفیلیم 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 بیوفیلیم به اکسیژن کم می‌شود. این امر نیز منجر به کاهش رشد و تکثیر سلولی می‌شود. ایجاد حالت مقاومت ناشی از غیرفعال بودن باکتری در بیوفیلیم، در مورد آنتی‌بیوتیک‌هایی که بر سلول در حال رشد و تقسیم اثر می‌گذارند از اهمیت بیشتری برخوردار است. چون که این نوع آنتی‌بیوتیک‌ها زمانی عمل می‌کنند که باکتری در فاز رشد و تقسیم باشد. بتالاکتام‌ها^۲ مانند پنی‌سیلین^۳ جزو این دسته از آنتی‌بیوتیک‌ها محسوب می‌شوند (Walters *et al.*, 2003).

سومین فرضیه ایجاد مقاومت باکتریایی در حالت بیوفیلیم مربوط به تغییرات ژنتیکی در شرایط مختلف می‌باشد به این صورت که فرکانس موتاسیون^۴ در فرم بیوفیلیمی بسیار بیشتر از شکل پلانکتونی باکتری

می‌باشد. گزارش شده است که باکتری سودوموناس آئروژینوزا در حالت بیوفیلیم ۱۰۵ مرتبه بیشتر از شکل پلانکتونی دچار موتاسیون می‌شود (Driffield *et al.*, 2008). Ma & Bryers (2013) اخیراً گزارش کردند که باکتری حاوی پلاسמיד (حامل ژن مقاومت به کلیندامایسین^۵) در فاز بیوفیلیمی ۱۰ برابر بیشتر این پلاسמיד را به بقیه باکتری‌ها منتقل می‌کند. در نهایت در حالت بیوفیلیمی تعدادی از سلول‌های باکتریایی خود را با یک حالت فنوتیپی متمایز^۶ از حالت پلانکتونی عادت می‌دهند این حالت با بیان ژن‌های مربوط به بیوفیلیم 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 ضدبیوفیلیمی

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

ترکیبات ضدبیوفیلیمی غیر گیاهی

پوشش سطحی

از این گروه می‌توان به پوشش ضد میکروبی^۷ اشاره کرد. پوشاندن سطح با آنتی‌بیوتیک‌ها، مواد بیوسید و ترکیبات یونی یکی از روش‌های مهار تشکیل بیوفیلیم می‌باشد. این روش با مهار اتصال باکتری با سطح و همچنین کشتن باکتری‌های متصل شده، از مراحل اولیه تشکیل بیوفیلیم 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 (Dror *et al.*, 2009). راه کار دیگر جهت مهار تشکیل

1. Physicochemical barrier

2. β lactames

3. Penicilin

4. Mutation

5. Clindamycin

6. Distinct phenotypic form

7. Antimicrobial coatings

انسان مضر نیستند و برای باکتری میزبان کاملاً اختصاصی هستند. فاژها قادر به حذف بیوفیلیم در باکتری میزبان خود هستند. به‌عنوان مثال فاژ T4 می‌تواند درون بیوفیلیم تشکیل شده باکتری *اشریشیا کلی* تکثیر یابد و با کشتن این باکتری ساختار فیزیکی بیوفیلیم را تخریب کند (Meng et al., 2011). بسیاری از فاژها پلی‌مرازهایی تولید می‌کنند که پلی‌مر خارج سلولی بیوفیلیم را تجزیه می‌کند. برای باکتری *کلبسیلا آئروژنز*^۵ فاژ تجزیه‌کننده اگزوپلی‌ساکارید و کپسول شناسایی شده است (Sutherland et al., 2004). همچنین فاژ لیزین‌ها^۶ یا اندولایزین‌ها^۷ جزو مواد ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت محسوب می‌شوند که به خاصیت ضد بیوفیلیمی فاژ کمک می‌کنند. از جمله اشکالات استفاده از فاژ به‌عنوان یک مکانیسم ضد بیوفیلیمی این است که ذرات فاژی اختصاصی میزبان^۸ 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^۹ هستند که امکان انتقال این ژن‌ها به باکتری درمان شده با فاژ وجود دارد (Donlan, 2009).

آنزیم‌ها^{۱۰}

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. گلیکوزیدازها^{۱۱}، پروتئازها^{۱۲} و دئوکسی‌ریبونوکلئازها^{۱۳}

بیوفیلیم ایجاد تغییرات فیزیکی بر روی سطح است. تشکیل بیوفیلیم با اتصال اولیه باکتری به سطح انجام می‌گیرد. میزان آبگریزی^۱ و بار الکتریکی سطح نقش مهمی در توانایی باکتری جهت تشکیل بیوفیلیم دارد بنابراین هر عاملی که باعث آبدوست کردن سطح شود تعامل باکتریایی با سطح و در نتیجه بیوفیلیم را کاهش می‌دهد (Jansen et al., 1995).

مهارکنندگان سیستم حد نصاب

مراحل تشکیل بیوفیلیم تحت کنترل سیستم حد نصاب است. در این سیستم باکتری‌ها برای تجمع خود و تشکیل بیوفیلیم به وسیله مواد شیمیایی مترشح از خودشان با هم ارتباط برقرار می‌کنند؛ هر تکنیک یا ماده‌ای که در این فرآیند اختلال ایجاد کند را مهارکننده سیستم حد نصاب^۲ می‌گویند. یکی از راه‌کارهای مهار تشکیل بیوفیلیم 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 بیوفیلیم در استرپتوکوکوس‌های ویریدانس مانند *استرپتوکوکوس موتانس*^۳ (که در تشکیل بیوفیلیم و پلاک دندان اهمیت زیادی دارد) با مهار QS ممانعت می‌کند (He et al., 2012).

باکتریوفاژها^۴

استفاده از باکتریوفاژهای لیتیک می‌تواند به‌عنوان یک روش جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها و یا مکمل آن‌ها در درمان عفونت‌ها به کار برده شود. باکتریوفاژها برای

5. *Klebsiella aerogenes*
6. Phage lysins
7. Endolysins
8. Host-specific
9. Virulence factors
10. Enzymes
11. Glucosidases
12. Protease
13. Deoxyribonuclease

1. Hydrophobicity
2. Quorum sensing inhibitors (QSIs)
3. *Streptococcus mutans*
4. Bacteriophages

زیست‌تخریب‌پذیری^۶ یا تجزیه بیشتری دارند (Banat et al., 2010). سورفاکتین^۷ یک لیپوپتید است که توسط باکتری *باسیلوس سابتیلیس*^۸ 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^۹ این خاصیت را داراست (Nitschke et al., 2010). جذب بیوسورفاکتانت‌ها روی سطوح می‌تواند میزان آگریزی 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*^{۱۰} و *انتروباکتر ساکازاکی*^{۱۱} می‌شود (Nitschke et al., 2009).

نانوذرات^{۱۲}

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^{۱۳} به واسطه‌ی خاصیت ضدباکتریایی خود، قادر به مهار تشکیل بیوفیلم پاتوژن‌های مهم از جمله *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌باشد. کاترهای 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

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 اکتینومیسیت-کومیتنس*^۱ به دست می‌آید. این آنزیم ماده پلی‌ان-استیل‌گلوکزآمین^۲ که در ساختار ماتریکس بیوفیلم اکثر باکتری‌ها حضور دارد را تجزیه می‌کند (Kaplan et al., 2003).

باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توانایی تولید پلی‌ساکارید آلزینات^۳ و همچنین آنزیم تجزیه‌کننده آلزینات را دارد. آلزینات جزء اصلی ساختار ماتریکس بیوفیلم این باکتری است. مطالعات نشان می‌دهد افزایش وجود آنزیم تجزیه‌کننده آلزینات باعث حساسیت بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی‌بیوتیک‌ها می‌شود. با افزودن آنزیم به محیط پیرامون باکتری و همچنین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم تجزیه‌کننده آلزینات می‌توان به این هدف دست یافت (Alipour et al., 2009).

سورفاکتانت‌ها^۴

پوشاندن سطح با بیوسورفاکتانت‌ها^۵ 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

6. Biodegradation

7. Surfactin

8. *Bacillus subtilis*

9. Rhamnolipid

10. *Listeria monocytogenes*

11. *Enterobacter sakazakii*

12. Nanoparticles

13. Magnesium fluoride

1. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

2. Poly-N-acetylglucosamine (PNAG)

3. Alginate

4. Surfactants

5. Biosurfactants

باکتری پروپیونی‌باکتریوم آکنس^۵ داشتند. ماده موثره‌ی این گیاهان که باعث ایجاد خاصیت ضد بیوفیلیمی در آن‌ها شد به ترتیب resveratrol، icariin و salidroside بودند (Coenye et al., 2012). ترکیبات گیاهی از راه‌های مختلفی می‌توانند بیوفیلیم را مهار کنند؛ گیاهانی که عصاره آن‌ها برای باکتری‌ها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلیم باکتریایی می‌شود. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلیم 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 بیوفیلیم باکتریایی را کنترل می‌کند، تداخل ایجاد می‌کنند. Ravichandiran et al. (2012)، از عصاره اتانولی گیاه *Meliadubia* به‌عنوان یک ترکیب ضد بیوفیلیمی استفاده کردند و نشان دادند که این عصاره با تداخل و مهار سیستم حد نصاب در باکتری *اشریشیا کلی* باعث مهار بیوفیلیم این باکتری می‌شود (Ravichandiran et al., 2012). در یک مطالعه دیگر که روی خواص ضدبیوفیلیمی گیاه زیره سبز^۶ انجام شد مشخص گردید که میزان ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از عصاره این گیاه باعث مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *پروتئوس میرابیلیس*^۷ و *سراسیا مارسنس*^۸ 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

روی پوشش داده شده‌اند با تولید فرآورده‌های فعال و سمی اکسیژن باعث مهار تشکیل بیوفیلیم باکتری‌های *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شوند (Applerot, 2012). Gurunathan et al. (2014)، اثر نانوذرات نقره را روی بیوفیلیم باکتریایی تعدادی از باکتری‌های پاتوژن بررسی کردند. نتایج نشان داد که نانوذرات نقره باعث مهار بیوفیلیم باکتری‌های *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگلا فلکسنری*^۱، *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استرپتوکوکوس پنومونیه* می‌شود. همچنین نشان دادند که نانوذرات نقره باعث تشدید اثر کشندگی (اثر هم‌افزایی^۲) آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین و وانکومایسین علیه باکتری‌های گرم منفی و گرم مثبت می‌شود (Sangiliyandi et al., 2014).

مشتمتات گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلیمی^۳

تلاش محققان جهت معرفی ترکیبات با خاصیت ضد بیوفیلیمی 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، تریپنوتیدها، فلاونوئید و کومارین‌ها، پیتیدها، گلیکوزیدها نوکلئوزیدها و پلی‌فنل‌ها را نام برد (Davies et al., 2012). Coenye et al. (2012)، در یک مطالعه پنج گونه گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلیمی را معرفی کردند. غلظت تحت MIC^۴ گیاهان *Rhodiola* و *Epimedium brevicornum, crenulata* و *Polygonum cuspidatum* توانایی مهار بیوفیلیم

5. *Propionibacterium acnes*

6. *Cuminum cyminum*

7. *Proteus mirabilis*

8. *Serratia marcescens*

1. *Shigella flexneri*

2. Synergistic effect

3. Plant-derived antibiofilm compounds

4. Sub-MIC concentration

تشکیل بیوفیلیم ضروری می‌باشد حائز اهمیت هستند (Ren et al., 2005).

یکی دیگر از راهکارهای مهار بیوفیلیم و یا حذف آن، مهار پمپ‌های افلوکس^۹ 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^{۱۰} می‌شود. در فاز بیوفیلیمی 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 بیوفیلیم تشکیل شده و افزایش حساسیت باکتری‌های بیوفیلیم به آنتی‌بیوتیک‌ها شود (Kvist et al., 2008). آکالوئید رزرپین^{۱۱} که اولین بار از گیاه *راولفیا سرپنتینا*^{۱۲} به دست آمد خاصیت مهارکنندگی افلوکس پمپی دارد. این خاصیت ابتدا علیه افلوکس پمپ Bmr در باکتری *باسیلوس سابتیلیس* 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 متی‌سلین می‌شود (Gibbons et al., 2000). پیرین^{۱۳} یک آکالوئید گیاهی مربوط به گیاهان خانواده *Piperaceae* از جمله *فلفل سیاه*^{۱۴}

خاصیت مهارکنندگی سیستم حد نصاب^۱ است (Issac Abraham et al., 2012). اولین مرحله برای استقرار و تشکیل بیوفیلیم 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 ضدبیوفیلیمی عمل کند. Sandasi et al. (2011)، اثر هشت عصاره گیاهی^۲ را روی چسبیدن باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* و قارچ *کاندیدیا آلبیکنز*^۳ بررسی کردند. در این مطالعه مشخص شد که عصاره گیاهان *Echinacea* و *Mentha piperita* 'angustifolia' باعث مهار (بیشتر از ۵۰ درصدی) چسبیدن باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* به سطح می‌شوند (Sandasi et al., 2011). در یک مطالعه دیگر که روی بیوفیلیم باکتری‌های گرم منفی انجام شد، تأثیر اسید اورسولیک^۴ به دست آمده از عصاره‌های گیاهی روی بیوفیلیم باکتری‌های *اشریشیا کلی*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *ویبریو هاروهی*^۵ بررسی گردید. تأثیر این ماده روی بیوفیلیم باکتری‌ها با روش میکروتیتر پلیت^۶ تعیین گردید. نتایج این مطالعه نشان داد که اسید اورسولیک گیاهی از یک طرف باعث مهار بیوفیلیم باکتری‌های مذکور شده و از طرف دیگر برای آن‌ها سمی نمی‌باشد. نتایج ریزآرایه^۷ DNA نشان داد که این ترکیب تأثیری روی سیستم حد نصاب نداشته و ژن‌های دخیل در شیمیوتاکسی^۸ و حرکت باکتری *اشریشیا کلی* (*motAB* و *tar tap cheA*) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. این ژن‌ها در چسبیدن باکتری که برای

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*

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.

است. پبیرین 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^۱ 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

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 bacterioto 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.; González 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.