

## ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم در اشیریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی ساختار آن

نغمه موری بختیاری<sup>۱\*</sup>، محمد خسروی<sup>۲</sup>

۱- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

۲- استادیار، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۴/۱۰

### چکیده

شکل پایداری از رشد باکتری‌ها در محیط، اجتماعی محصور شده با ماتریکس است که تحت عنوان بیوفیلم شناخته شده است. این ساختار باکتری‌ها به دلیل محافظت باکتری‌ها در مقابل سیستم ایمنی، کاهش کارایی آنتی‌بیوتیک‌ها و انتشار باکتری آزاد به مناطق دیگری از بدن، با مزمن شدن و عدم پاسخ به درمان در عفونت‌ها همراه می‌باشد. هدف از مطالعه حاضر بررسی توانایی تولید بیوفیلم در سه سویه‌ی استاندارد اشیریشیا کولی و یک سویه‌ی استاندارد از استافیلوکوکوس اورئوس در محیط‌های مغذی متفاوت و مقایسه ساختار آن‌ها می‌باشد. برای این مطالعه، سویه‌های اشیریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس در چهار محیط کشت مغذی (آبگوشت مغز- قلب حاوی ۱ درصد سوکرروز، لوریا- برتانی، آبگوشت سویای تریپسینه حاوی ۳/۵ درصد گلوکز و آب پیتونه) جهت بررسی فنوتیپی تولید بیوفیلم به روش میکروتیتر پلیت کیستال و یوله ارائه شده توسط stepanovic و همکاران، کشت داده شدند. سپس دو سویه از اشیریشیا کولی (۱ و ۳) با توانایی تولید بیوفیلم به صورت قوی و متوسط، برای استخراج کربوهیدرات و پروتئین و مقایسه آن‌ها از طریق SDS-PAGE و رنگ آمیزی پریودیک اسید شیف و متیلن بلو، انتخاب شدند. بر اساس نتایج محیط آبگوشت مغز- قلب حاوی ۱ درصد سوکرروز برای هر دو سویه انتخاب شد. با مقایسه پروفایل پروتئینی این دو سویه تفاوت‌هایی در باندهای سنگین‌تر از ۶۸ کیلودالتون بین دو سویه مشاهده شد اما پروفایل کربوهیدراتی و گلیکوپروتئینی آن‌ها مشابه بود. نهایتاً، با مشاهده تفاوت در اجزای پروتئینی دو سویه مورد مطالعه، تشخیص و بررسی ساختاری این اجزای پروتئینی متفاوت، می‌تواند در ایجاد راه کارهای مؤثر در ریشه‌کنی عفونت‌های مزمن، مفید واقع گردد.

**کلمات کلیدی:** بیوفیلم، میکروتیتر پلیت کیستال و یوله، استافیلوکوکوس اورئوس، اشیریشیا کولی

\*نویسنده مسئول: نغمه موری بختیاری

آدرس: اهواز، دانشگاه شهید چمران، دانشکده دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، بخش میکروبیولوژی

موبایل: ۰۹۱۶۷۸۹۸۸۰۷

فاکس: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷

پست الکترونیکی: n.moori@scu.ac.ir

مقدمه

بیوفیلیم‌ها به‌عنوان اجتماع سازمان یافته‌ای از باکتری‌ها هستند که به سطوح چسبیده و در حقیقت پلی‌مرهای خارج سلولی مشتمل بر آگزوپلی‌ساکاریدها، اسیدهای نوکلئیک و پروتئین‌ها می‌باشند (۲). تولید فزاینده‌ی این مواد در زمانی کوتاه، باعث افزایش سایز تجمعی باکتری‌ها و در نهایت جلوگیری از کشتار باکتری‌ها توسط نوتروفیل‌ها می‌گردد (۲۱)، همچنین تولید بیوفیلیم به عنوان یک مکانیسم کلیدی ممانعت از فعالیت آنتی‌بیوتیک‌های مصرفی در درمان عفونت‌های کلینیکی می‌باشد (۴). با ممانعت از ایمنی‌ذاتی و اختصاصی میزبان و همچنین ایجاد مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک، تولید بیوفیلیم ممکن است با عود عفونت بر اثر تداخل با ایمنی میزبان و روند درمانی همراه باشد. این شرایط موضعی باعث ماندگاری باکتری در بدن برای ماه‌ها یا سال‌ها با شیوع متناوب بروز حاد بیماری می‌گردد (۱۳). تولید بیوفیلیم می‌تواند توجیه مناسبی جهت منفی شدن نتایج کشت برخی نمونه‌های کلینیکی، علی‌رغم حضور عفونت باشد (۲۴). فراوانی بروز چنین بیماری‌های عفونی در مرکز کنترل و پیشگیری بیماری‌ها (CDC) بررسی می‌گردد، بر اساس نتایج حاصل از بررسی آن‌ها در سال ۲۰۰۶، ۶۵ درصد عوامل باکتریایی جداسازی شده از عفونت‌های انسانی قادر به تولید بیوفیلیم هستند (۱۳). از دیگر نقش‌های در نظر گرفته شده برای این ساختار، می‌توان به نقش مهم محافظتی آن به‌عنوان یک سد در برابر نفوذ مولکول‌های سمی مانند مواد ضد میکروبی و رادیکال‌های هیدروکسیل و آنیون‌های سوپراکسید به باکتری اشاره داشت. ماتریکس بیوفیلیم همچنین می‌تواند با نگهداری بیشتر آنزیم‌ها، مواد غذایی و یا مولکول‌های مؤثر در انتقال پیام در اطراف

باکتری، شرایط مناسب‌تری برای باکتری در این ساختار فراهم کند (۱۵، ۲۷، ۲۲). اخیراً اطلاعات متعددی مرتبط با فاکتورهای مؤثر در تولید بیوفیلیم در برخی از باکتری‌ها و نقش آن‌ها در بیماری‌زایی باکتری و تنظیم بیان ژن این فاکتورها ارائه شده‌است، از جمله در خصوص *استافیلوکوکوس اورئوس* که عنوان شده‌است در این باکتری، تولید بیوفیلیم با تأثیر بر بیان برخی ژن‌ها و تحت تأثیر قرار دادن شرایط متابولیکی باکتری صورت می‌پذیرد (۱۰). بررسی آزمایشگاهی تولید بیوفیلیم توسط باکتری‌ها می‌تواند با انتخاب محیط کشت خاص، تحت تأثیر قرار گیرد، شرایطی که باکتری در طی رشد با آن مواجه است تولید بیوفیلیم را تا حد زیادی ترغیب و حتی باعث ایجاد بیوفیلیم با ساختاری غیرمعمول می‌گردد (۷). با توجه به نقش با اهمیت عوامل محیطی از جمله محیط کشت، دما، زمان و... در ترغیب و یا ممانعت از تولید بیوفیلیم در باکتری‌ها، هدف از این مطالعه ارزیابی مقایسه‌ای توانایی تولید بیوفیلیم سویه‌های استاندارد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اشریشیا کولی* در چهار محیط کشت مغذی پیتون واتر (PW)، آبگوشت سویای تریپسینه (TSB) حاوی ۳/۵٪ گلوکز، محیط لوریا- برتانی (LB) بدون نمک و آبگوشت مغز- قلب (BHI) حاوی ۱ درصد سوکروز، و بررسی تفاوت ساختاری بیوفیلیم تولیدی در جدایه‌ها با روش SDS-PAGE، می‌باشد.

مواد و روش کار

جدایه‌های باکتریایی

در این مطالعه از دو سویه استاندارد *اشریشیا کولی* سروتایپ O157:H7 با شماره‌ی ۴۳۸۹۴ (*اشریشیا کولی* ۱) و *اشریشیا کولی* سروتایپ O157:H7 (تأییدشده با واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) در

۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ابتدا سوسپانسیون باکتریایی هر حفره تخلیه و سپس با ۳۰۰ میکرولیتر از سرم فیزیولوژی استریل شستشو داده شد. پس از سه بار شستشو، جهت تثبیت بیوفیلم تولید شده در هر حفره توسط باکتری، ۲۰۰ میکرولیتر از متانول خالص در هر حفره ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. پس از این زمان، پلیت تخلیه و در دمای محیط قرار داده شد تا خشک شود. جهت رنگ‌آمیزی بیوفیلم تولیدی، ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال‌ویوله ۲ درصد در هر حفره ریخته و به مدت ۵ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس رنگ تخلیه و سه بار شستشو با آب مقطر انجام شد. پس از خشک شدن پلیت در دمای محیط، جهت آزادسازی بیوفیلم از دیواره‌ی حفره‌ها، ۲۰۰ میکرولیتر محلول الکل - استون (۸۰٪ اتانول - ۲۰٪ استون) در هر حفره ریخته و پس از ۱۵ دقیقه، میزان جذب نوری حفره‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر با دستگاه الیزا ریدر (بیوتک، آمریکا) قرائت گردید. در نهایت میانگین جذب نوری سه حفره مربوط به هر جدایه (ODs) در یک محیط کشت، محاسبه و با میانگین جذب نوری سه حفره کنترل (ODnc) همان محیط مقایسه و میزان تولید بیوفیلم با درجات ضعیف، متوسط و قوی و یا عدم تولید مشخص گردید. جدول ۱ چگونگی محاسبه میزان تولید بیوفیلم اشاره شده است (۲۳).

### بررسی ساختاری بیوفیلم

در این بخش از مطالعه، بر اساس نتایج حاصله از مرحله قبل، مناسب‌ترین محیط جهت ترغیب تولید بیوفیلم برای دوسویه‌ای که قادر به تولید بیوفیلم به صورت قوی و متوسط بودند، کشت شبانه‌ای از دو سویه انتخاب شده، در محیط مربوط به هریک تهیه

دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز (شریشیا کولی ۲) و همچنین یک سویه استاندارد از شریشیا کولی با شماره ۲۵۹۲۲ (شریشیا کولی ۳) و یک سویه استاندارد از استافیلوکوکوس اورئوس با شماره ۲۵۹۲۳ که از مرکز ذخایر ژنتیک ایران تهیه شده بودند، استفاده گردید.

### بررسی توانایی تولید بیوفیلم در سویه‌ها

در این مطالعه جهت بررسی تولید بیوفیلم از روش میکروتیتر پلیت کریستال‌ویوله ارائه شده توسط stepanovic و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییر استفاده گردید. در این تحقیق جهت بررسی مقایسه‌ای اثر ترغیبی نوع محیط کشت، از چهار محیط کشت مغذی شامل: آبگوشت تریپسینه سویا حاوی ۳/۵٪ گلوکز (TSB)، آب پپتونه (PW)، آبگوشت لوریا-برتانی (LB) فاقد نمک و آبگوشت مغز و قلب (BHI) حاوی ۱٪ سوکروز که همگی ساخت شرکت مرک آلمان بودند، استفاده گردید. ابتدا هر جدایه در یک میلی‌لیتر از هر چهار محیط به صورت جداگانه کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک شب گرمخانه‌گذاری شد. پس از این مدت، ۱۰ میکرولیتر از کشت تهیه شده از هر جدایه در هر محیط با ۹۹۰ میکرولیتر از محیط تازه همان محیط به صورت کشت ۱ درصد تهیه شد و تا رسیدن به کدورتی برابر نیم مک‌فارلند در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از مشاهده کدورت مناسب از هر جدایه در هر یک از محیط‌های مورد بررسی، ۲۰۰ میکرولیتر از هر لوله برداشته و در سه حفره از پلیت الیزای ۹۶ خانه (مکسول، چین) ریخته شد (برای هر جدایه در هر محیط با سه تکرار انجام شد). ۲۰۰ میکرولیتر از هر چهار محیط کشت استریل، در سه تکرار به‌عنوان کنترل منفی در کنار سایر جدایه‌ها استفاده شد. پس از

نمونه‌ها در کیسه دیالیز با حد 10 000 MWCO و در آب دوبار تقطیر و به مدت ۴۸ ساعت انجام شد (۵،۱۴).

#### اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات و پروتئین

اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات نمونه‌ها با روش فنل- اسید سولفوریک و پروتئین با روش برادفورد انجام شد. در اندازه‌گیری میزان کربوهیدرات ۲۵ میکرولیتر از نمونه به ۷۵ میکرولیتر از اسیدسولفوریک خالص مخلوط شد و بلافاصله ۱۵ میکرولیتر فنل ۵ درصد به آن اضافه شد و پس ۲۰ دقیقه قرار دادن در دمای ۸۰ درجه سانتیگراد حمام آب گرم، جذب نوری در طول موج ۴۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد (۱۱) برای تهیه منحنی استاندارد جهت محاسبه مقدار کربوهیدرات، از گلوکز استفاده شد. جهت تهیه معرف برادفورد ۱۰ میلی‌گرم کوماسی بریلیانت بلو در ۵ میلی‌لیتر لیترا تانول ۹۵ درصد حل شد و ۱۰ میلی‌لیتر اسید ارتوفسفربیک ۸۵ درصد به آن اضافه شد حجم با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و با کاغذ واتمن صاف شد. جهت اندازه‌گیری میزان پروتئین ۲۰ میکرولیتر از نمونه به محلول حاوی ۱۴۰ میکرولیتر از آب دوبار تقطیر و ۴۰ میکرولیتر از محلول استاندارد برادفورد اضافه شد و جذب نوری در طول موج ۶۰۰ با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. از آلبومین سرم گاو در تهیه نمودار استاندارد استفاده شد (۲۶).

#### بررسی ساختار بیوفیلیم با Urea SDS-PAGE و SDS-PAGE

جهت مقایسه الگوی پروتئینی دو سویه ۱ و ۳ الکتروفورز با روش Laemli و همکاران (۱۹۷۰) با استفاده از ژل تراکم کننده ۴ درصد و جداکننده ۱۰

شد. سپس کشت ۱۰ درصدی از هر سویه در حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر تهیه و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. پس از این زمان، باکتری‌های کشت داده شده با استفاده از سانتریفیوژ، رسوب داده شده و رسوب حاصله جهت استفاده در مراحل بعدی کار ذخیره گردید.

#### جداسازی پلی‌ساکارید

جداسازی پلی‌ساکارید دیواره سلولی دو سویه انتخابی از مرحله قبل، با روش اتیلن دی‌آمید ترا استیک اسید (EDTA) و به اختصار به شرح ذیل انجام شد. سه بار شست و شوی نمونه‌های حاوی باکتری با سانتریفیوژ در سرعت ۴۰۰۰ g به مدت ۱۵ دقیقه در ۰/۱۵ NaCl مولار انجام شد. جداسازی دیواره پلی‌ساکاریدی با مجاور نمودن باکتری‌ها با بافر فوق به اضافه EDTA ۰/۰۵ مولار به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. پس از سانتریفیوژ در شرایط مشابه قبل، نمونه رسوب نموده در کف لوله‌ها به عنوان نمونه پروتئینی، جهت بررسی در مرحله بعد مورد استفاده قرار گرفت. مایع رویی حاوی پلی‌ساکارید در گرادیان سوکروز کوشین خالص‌سازی شد. در این روش محلول ۶ درصد سوکروز در محلول ۰/۱۵ NaCl مولار تهیه شد و به میزان ۰/۰۶ مولار تریتون-۱۱۴ و ۰/۰۱ مولار تریس (pH= ۶) به بافر اضافه شد و ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ g قسمت رویی جداسازی و به باقی‌مانده آن به میزان ۹ برابر حجم، استون سرد اضافه و ۲۴ ساعت در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده شد؛ سپس پروتئین‌های نمونه با سانتریفیوژ رسوب داده شدند و قسمت رویی به عنوان محلول حاوی کربوهیدرات خالص برداشت شد. دیالیز نمودن

نتایج حاصل از تولید بیوفیلم توسط سویه‌های اشریشیا کولی و استافیلوکوکوس اورئوس در محیط کشت‌های مختلف در جدول ۲ آورده شده است.

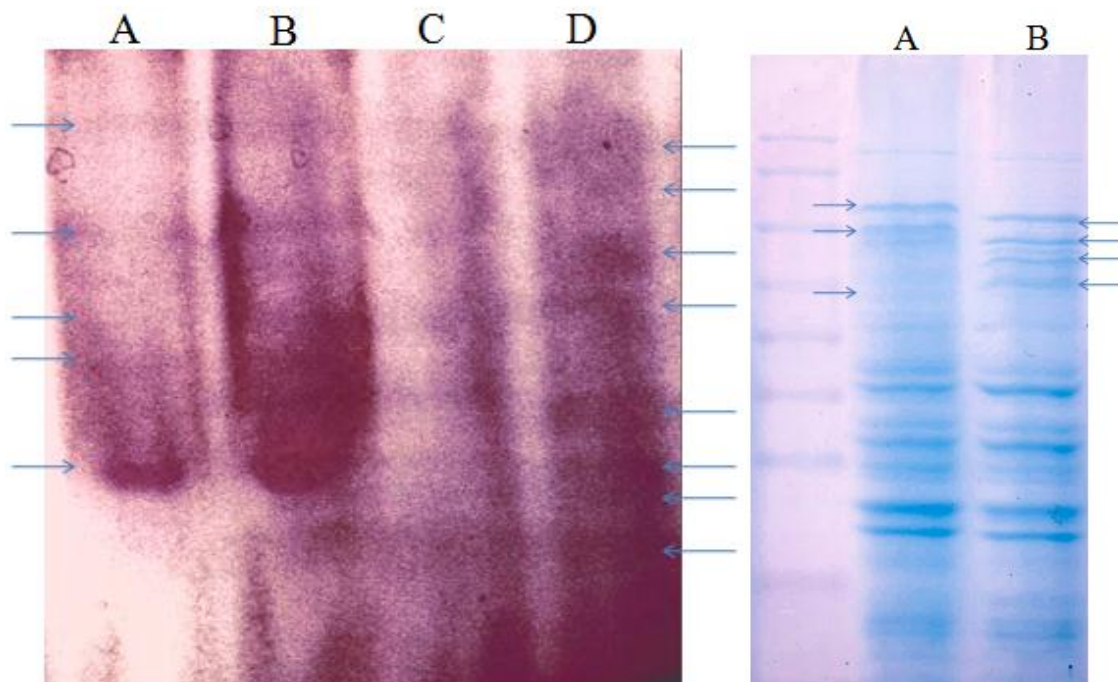
با توجه به نتایج، مناسب‌ترین محیط کشت جهت تولید بیوفیلم توسط اشریشیا کولی ۱، محیط BHI حاوی ۱ درصد سوکروز و TSB حاوی ۳/۵ درصد گلوکز و برای اشریشیا کولی ۳، محیط BHI حاوی ۱ درصد سوکروز و برای استافیلوکوکوس اورئوس، TSB حاوی ۳/۵ درصد گلوکز در نظر گرفته شد و اشریشیا کولی ۲ قادر به تولید بیوفیلم در هیچ‌یک از محیط‌های مورد مطالعه نبود. در ادامه این مطالعه، جهت بررسی ساختاری بیوفیلم ایجاد شده در این مطالعه از دو سویه ۱ و ۳ استفاده گردید زیرا هر دو گرم منفی و قادر به تولید بیوفیلم در دو سطح متفاوت (متوسط و قوی) بودند و بر اساس نتایج حاصل از مقایسه محیط کشت‌ها، جهت بررسی ساختاری بیوفیلم ایجاد شده توسط هر دو سویه از محیط BHI حاوی ۱ درصد سوکروز استفاده گردید.

با بررسی و مقایسه‌ی ساختار پروتئینی دو سویه، تفاوت عمده باکتری ۱ با ۳ در سه باند پروتئینی با وزن ملکولی ۱۱۰، ۹۵، ۶۸ کیلو دالتون می‌باشد؛ در سویه ۳ نیز چهار باند با وزن ملکولی ۱۰۰، ۹۰، ۸۰ و ۷۰ کیلو دالتون در مقایسه با سویه ۱ متفاوت می‌باشند. در مقایسه ساختار کربوهیدراتی و گلیکوپپتیدی، تفاوتی در الگوی دو باکتری مشاهده نشد (تصویر ۱).

درصد و به صورت معمول انجام شد (۸)؛ آزمون Urea SDS-PAGE مشابه با این روش و مطابق با Purkayastha و Dyson (۱۹۶۵) جهت مقایسه پروفایل پلی‌ساکاریدی انجام شد، در این روش به هر دو ژل جداسازی کننده و تراکم کننده اوره به میزان ۸ مولار اضافه و الکتروفورز در ولتاژ ۹۰ صورت گرفت. رنگ آمیزی ساختارهای پروتئین با استفاده از کوماسی بلو و رنگ‌بری با ترکیب متانول-اسیداستیک در ادامه انجام شد. رنگ‌آمیزی ترکیبات پلی‌ساکاریدی با روش Periodic acid schiff و به شرح ذیل انجام شد: بعد از شستشو با آب مقطر و یک ساعت ثابت نمودن ژل در محلول ۷ درصد اسید استیک گلاسیال، ژل به مدت یک ساعت در محلول ۰/۳ درصد از پریودیک اسید منتقل شد. در ادامه سه مرحله شست و شوی ژل با آب دوبار تقطیر و ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی با محلول رنگ فوشین بازی انجام شد. رنگ بری در محلول ۰/۱ درصد تیوسولفات سدیم در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد (۱۴).

### نتایج

جهت بررسی توانایی تولید بیوفیلم هر جدایه در هر یک از محیط کشت‌های مورد استفاده، میانگین جذب نوری سه حفره مربوط به هر جدایه در آن محیط محاسبه و با میانگین جذب نوری سه حفره کنترل از همان محیط (کشت نشده) مقایسه گردید. بر اساس جدول ۱ با مقایسه این دو عدد، توانایی تولید بیوفیلم توسط هر جدایه در هر محیط کشت مشخص شد.



تصویر ۱: (الف) رنگ آمیزی PAS جهت مقایسه الگوی گلیکوپپتیدی و پلی ساکاریدی دو باکتری اشیریشیا کولی سویه ۱ (به ترتیب A و C) و سویه ۳ (به ترتیب B و D). باندهای موجود در هر دو سویه با نشانگر مشخص شده‌اند. (ب) مقایسه الگوی پروتئین‌های ساختاری دو باکتری سویه ۱ (A) و سویه ۳ (B). تفاوت‌های شاخص با نشانگر مشخص شده‌اند. وزن ملکولی باندهای پروتئینی مارکر به ترتیب ۱۷۵؛ ۱۳۰؛ ۹۵؛ ۷۰؛ ۶۲؛ ۵۱؛ ۴۲؛ ۲۹؛ ۲۲؛ ۱۴؛ ۱۰ و ۵ کیلو دالتون می‌باشد.

جدول ۱: محاسبه میزان توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌ها در مقایسه با کنترل

نقطه برش مشخص شده	درجات تولید بیوفیلم
$OD_s < OD_{nc}$	عدم تولید
$OD_{nc} < OD_s < 2OD_{nc}$	ضعیف
$2OD_{nc} < OD_s < 4OD_{nc}$	متوسط
$4OD_{nc} < OD_s$	قوی

جدول ۲: مقایسه توانایی تولید بیوفیلم هر یک از سویه‌ها در چهار محیط کشت مورد مطالعه

محیط کشت سویه	TSB	LB	BHI	PW
اشیریشیا کولی ۱	متوسط	عدم تولید	متوسط	ضعیف
اشیریشیا کولی ۲	عدم تولید	عدم تولید	عدم تولید	عدم تولید
اشیریشیا کولی ۳	متوسط	ضعیف	قوی	ضعیف
استافیلوکوکوس اورنوس	قوی	متوسط	متوسط	ضعیف

سازنده در برابر سیستم ایمنی و آنتی‌بیوتیک‌ها در بدن و در برابر مواد گندزدا در سطوح زنده و غیرزنده، از اهمیت غیر قابل انکاری برخوردار است. تا کنون مطالعات متعددی در خصوص بررسی اجزای سازنده این ساختار و همچنین عوامل محیطی و ژنومی دخیل

## بحث

اگرچه ماتریکس پلی ساکاریدی می‌تواند نشانی از ایجاد بیوفیلم در باکتری‌ها باشد اما نقش آن به درستی مشخص نشده است. بررسی ساختار بیوفیلم در باکتری‌ها به دلیل نقش حفاظتی آن برای باکتری-

موجب استحکام ساختار بیوفیلم می‌شود. (۳) در اغلب باکتری‌های گرم منفی، لیپوپلی ساکارید (LPS) به‌عنوان یکی از عوامل مرتبط با غشای خارجی، که در اتصال آن به سطوح زنده و غیر زنده نقش دارد، مطرح می‌باشد (۱۲،۹)، و زیکول‌های غشای خارجی (Outer membrane vesicles) که عمدتاً در انتهای فاز لگاریتمی رشد، توسط باکتری‌های گرم منفی در محیط آزاد می‌گردند نیز در ساختار بیوفیلم و کشت پلانکتونیک وجود دارند (۱۹) این وزیکول‌ها که دارای قطری بین ۲۵۰-۲۰ نانومتر می‌باشند حاوی ترکیباتی از غشای خارجی مانند لیپوپلی ساکاریدها، پروتئین‌های غشای خارجی و فسفولیپیدها و همچنین پروتئین‌های پری‌پلاسمیک و پپتیدوگلیکان می‌باشند (۱۶).

#### نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر تفاوت در الگوی اجزای پروتئینی دو سویه مشاهده شد در صورتی که از نظر ساختار گلیکوپروتئینی و کربوهیدراتی تفاوت آشکاری بین آن‌ها وجود نداشت، با توجه به نقش متفاوت این دو ترکیب در اتصال اولیه و ثانویه باکتری و همچنین نحوه و میزان تحریک سیستم ایمنی، شناسایی این ساختار و بررسی تفاوت‌ها و تشابهات این ساختار در باکتری‌های یک جنس یا گونه قطعاً در پیشگیری از عفونت‌های مزمن با جلوگیری از سنتز آن‌ها مفید فایده خواهد بود.

#### سپاسگزاری

با تشکر از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت تأمین هزینه این طرح در قالب پژوهانه.

#### References

- 1- Adams, J.L., McLean, R.J. (1999). Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli*

در سنتز آن، علاوه بر شکل خارجی آن، به جهت ایجاد راه‌کار مناسب در مبارزه با عوامل باکتریایی سازنده، صورت گرفته است. در این مطالعه با استفاده از چهار نوع محیط کشت، BHI حاوی ۳ درصد سوکروز تأثیر بیشتری در ترغیب تولید بیوفیلم در جدایه‌های مورد بررسی داشته است. در مطالعات متعددی به بررسی نقش محیط‌های مغذی در ترغیب و مهار تولید بیوفیلم در باکتری‌های مختلف پرداخته شده است (۱۸، ۱۷). از مطالعات صورت گرفته در خصوص ژن‌های مؤثر در ترغیب و یا جلوگیری از سنتز این ساختار در باکتری‌ها می‌توان به تحقیق انجام شده توسط Jackson و همکاران (۲۰۰۱) که به بررسی نقش ترغیبی و مهاری فاکتور *CsrA* در *شریشیا کولی* پرداخته‌اند و همچنین به مطالعه Adams و McLean (۱۹۹۹) و همچنین Vidal و همکاران (۱۹۹۸) که به بررسی نقش ژن‌های *rpoS* و *ompR* در تشکیل این ساختار، در باکتری پرداخته‌اند اشاره داشت (۲۵، ۱، ۶). با مشخص شدن مراحل تشکیل این ساختار، بررسی ژن‌های دخیل در اتصال اولیه و همچنین اتصال محکم باکتری‌ها به سطوح مانند *csgA* (ژن سازنده تحت واحد A فیمبریه کورلی) و *fimA* (ژن سازنده تحت واحد A فیمبریه تیپ I) نیز مورد بررسی قرار گرفتند (۲۰). در خصوص ترکیبات سازنده این ساختار نیز مطالعاتی صورت گرفته است به گونه‌ای که به بیوفیلم، سپر بزرگ (bulky shields) گفته می‌شود که در حقیقت از مواد پلی‌مری خارج سلولی باکتری‌هاست (Extracellular polymeric substances) (۲). یکی از ترکیبات اصلی پلی‌مری خارج سلولی در *شریشیا کولی*، آگروپلی ساکاریدی به نام کولانیک اسید می‌باشد که همانند یک کپسول، باکتری را احاطه کرده و

- sulfuric acid method in microplate format. *Anal Biochemistry* 339: 69–72.
- 12- Nevola, J.J., Laux, D.C., Cohen, P.S. (1987). In vivo colonization of the mouse large intestine and in vitro penetration of intestinal mucus by an avirulent smooth strain of *Salmonella typhimurium* and its lipopolysaccharide-deficient mutant. *Infection and Immunity* 55: 2884–2890
  - 13- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., et al. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion Otolaryngology Head Neck Surgery* 12:185–90. (Grade B).
  - 14- Purkayastha, R.R., Dyson, R. Location of the Carbohydrate-Containing Fraction of  $\kappa$ -Casein After Gel Electrophoresis. *Journal of Dairy Science* 48: 1419-1422.
  - 15- Redfield, R.J. (2002). Is quorum sensing a side effect of diffusion sensing? *Trends Microbiology* 10:365–370. [PubMed]
  - 16 – Renelli, M., Matias, V., Lo, R.Y., Beveridge, T.J. (2004). DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology* 150: 2161–2169
  - 17- PRodrigues, L.B., Santos, L.R.D., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.P.D., et al. (2010). Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 1082-1085
  - 18- Samet, M., Ghaemi, E., Jahanpur, S.H., Jamali, I. (2013). Evaluation of biofilm-forming capabilities of urinary *Escherichia coli* isolates in microtiter plate using two different culture media. *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 1: 244-247.
  - 19- Schooling, S.R., Beveridge, T.J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of Bacteriology* 188: 5945–5957.
  - 20- Silva, V.o., Espeschit, I.F., Moreira, M.A.S. (2013). Clonal relationship of *Escherichia coli* biofilm producer isolates obtained from mastitic milk. *Canadian Journal of Microbiology* 59(5): 291-293.
  - 21- Simon, G.L., Miller, H.G., Borenstein, D.G. (1983). Synovial fluid inhibits killing of biofilms. *Applied Environmental Microbiology* 65:4285–4287
  - 2- Costerton, J.W., Stewart, P.S., Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318–22. (Grade A).
  - 3- Danese, P.N., Pratt, L.A., Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology* 182: 3593–3596.
  - 4- Dastgheyb S, Parvizi J, Shapiro IM, Hickok NJ, Otto M. Effect of Biofilms on Recalcitrance of Staphylococcal Joint Infection to Antibiotic Treatment. *The Journal of Infectious Diseases* 2015; 211:641–50
  - 5- Ernst, O., Zor, T. (2010). Linearization of the Bradford protein assay. *Journal of Visualized Experiments*; 38: 1918.
  - 6- Jackson, D.W., Suzuki, K., Oakford, L., Simecka, J.W., Hart, M.E., Romeo, T. (2002). Biofilm Formation and Dispersal under the Influence of the Global Regulator CsrA of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 290–301. DOI: 10.1128/JB.184.1.290–301.2002
  - 7- Joo, H.S., Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemical Biology* 19:1503–13.
  - 8- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
  - 9- Lindhout, T., Lau, P.C., Brewer, D., Lam, J.S. (2009) Truncation in the core oligosaccharide of lipopolysaccharide affects flagella-mediated motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 via modulation of cell surface attachment. *Microbiology* 155: 3449–3460.
  - 10- Macka, D., Beckerb, P., Chatterjee, I., Dobinskya, S., Knoblocha, J.K.M., Petersb, G., et al. (2004). Mechanisms of biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*: functional molecules, regulatory circuits, and adaptive responses. *International Journal of Medical Microbiology* 294:203–212.
  - 11- Masuko, T., Minami, A., Iwasaki, N., Majima, T., Nishimura, S., Lee, Y.C. (2005). Carbohydrate analysis by a phenol-



- of *Staphylococcus aureus* by neutrophils. *Infection and Immunity* 40:1004–10.
- 22- Starkey, M., Gray, A.K., Chang, S.I., Parsek, M. (2004). Microbial biofilms. Vol. 336. ASM Press; Washington DC. A sticky business: the extracellular polymeric substance matrix of bacterial biofilms; p. 478.
- 23- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V. (2007). microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for for assessment of biofilm production by staphylococci. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2007; 1 (5), 687– 690.
- 24- Swan, A., Amer, H., Dieppe, P. (2002). The value of synovial fluid assays in the diagnosis of joint disease: a literature survey. *Annals of the Rheumatic Diseases* 61:493–8.
- 25- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejueune, P. (1998). Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *Journal of Bacteriology* 180:2442–2449.
- 26- Walker, J.M. (2002). The protein protocols handbook. 2nd ed. New Jersey: Humana Press; 15-
- 27- Welch, R.A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., et al. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:17020–17024. [PMC free article] [PubMed]

## **Evaluation of biofilm-producing ability in *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* and its structural analysis**

**Moori Bakhtiari, N.<sup>1\*</sup>, Khosravi, M.<sup>2</sup>**

1. Microbiology department, Veterinary school of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

2. Immunology department, Veterinary school of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran

Received Date: 25 November 2016

Accepted Date: 1 July 2016

---

### **Abstract**

The predominant mode of growth of bacteria in the environment is, matrix-enclosed communities known as biofilms. This bacterial structure often complicate chronic and difficult-to-treat infections by protecting bacteria from the immune system, decreasing antibiotic efficacy, and dispersing planktonic cells to distant body sites. The purpose of the present study was to evaluate the biofilm producing ability of three standard strains of *Escherichia coli* and one standard strain of *Staphylococcus aureus* in different enrichment media and compared its structures. For this study, *Escherichia coli* and *staphylococcus aureus* strains were cultured in four enrichment media (Brain-heart infusion broth contain 1% sucrose, Luria-Bertani, Tripti soy broth contain 3.5% glucose and Pepton Water) for phenotypic evaluation of biofilm production based on micro titer plate crystal violet method presented by stepanovic et al. (2007). Then, two *Escherichia coli* strains (1, 3) with strong and moderate biofilm producing ability, were selected for carbohydrate and protein extraction and compared with SDS-PAGE by periodic acid shiff and methylene blue staining, respectively. Based on results, BHI contain 1% sucrose, was selected for two strains. Protein profile of two studied strains were differences in protein components higher than 68 Kd, but, had a same carbohydrate and glycoprotein profiles. Finally, by observing the difference in protein structure of studied strains, identification and structural survey on different protein components can be useful in order to applying effective strategies to eradication of chronic infections.

**Keywords: Biofilm, Micro titer plate crystal violet, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli***

---

\*Corresponding author: Moori Bakhtiari, N.

Address: Microbiology department, Veterinary school of Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran.

Tel: 0916789880

Email: n.moori@scu.ac.ir