

## مطالعه تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا با روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر و میکروسکوپ الکترونی نگاره

مژگان محمدی مهر<sup>۱</sup>، \* دکتر احیاء عبدی عالی<sup>۲</sup>

### خلاصه:

**سابقه و هدف:** با توجه به مشکل درمان عفونت های بیوفیلم باکتریائی و عدم تشخیص بیوفیلم با روشهای مرسوم تشخیصی، این تحقیق با هدف ارائه روش شناسائی و تولید بیوفیلم توسط باکتریها، با مطالعه *Pseudomonas aeruginosa* بعنوان یکی از مهمترین باکتریهای تولید کننده بیوفیلم صورت گرفته است.

**مواد و روشها:** تحقیق از نوع تحقیقات پایه ای بر روی ۴۲ نمونه بالینی با استفاده از روش پلیت میکروتیتر اصلاح شده و مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام پذیرفت.

**یافته ها:** با روش انجام شده تولید بیوفیلم توسط سویه مورد بررسی بخوبی معین گردید و سویه ۲۱۴، با بیشترین میزان تولید بیوفیلم و جذب نوری جهت مطالعه میکروسکوپ الکترونی انتخاب گردید.

**نتیجه گیری و توصیه ها:** به نظر میرسد روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر جهت استفاده تشخیصی در آزمایشگاههای تشخیصی راحت تر و مقرون به صرفه باشد با توجه به مشکلات درمانی بیوفیلم باکتریایی توصیه می شود قبل از تجویز آنتی بیوتیک تولید بیوفیلم توسط سویه مورد بررسی مطالعه گردد.

**کلمات کلیدی:** بیوفیلم، *Pseudomonas aeruginosa*، مقاومت آنتی بیوتیکی.

### مقدمه:

*P. aeruginosa* مسئول پنومونیه و سپتی سمی با میزان مرگ و میر ۳۰٪ است. (۵ و ۶) این باکتری به دلیل تولید بیوفیلم<sup>۱</sup> در مان آنتی بیوتیکی و دفاع سیستم ایمنی بدن مقاوم است (۷، ۱۰).

بیوفیلم باکتریایی، جامعه ای از باکتریهای چسبیده و رشد کننده بر سطوح جاندار یا بی جان محصور در یک ماتریکس پلی ساکاریدی می باشد (۷، ۸).

بیوفیلم باکتریها را می توان در نواحی مختلف بدن از جمله غشاهای مخاطی، دندان، ابزار پزشکی کاشتنی (سوند، پروتزا.. ) جستجو کرد. (۷)

تشخیص بیوفیلم ها به روش متداول کشت در آزمایشگاه میسر نمی باشد و از آنجایی که بیوفیلم ها مسئول ۶۰٪ از عفونت انسانی

*Pseudomonas aeruginosa* باکتری گرم منفی، متحرک، هوازی، میله ای شکل قادر به رشد در اغلب محیط های زنده عمدتاً آب و خاک است. این باکتری یکی از مهمترین عوامل بیماریزای فرصت طلب است و اغلب در عفونت های بیمارستانی یافت می شود. مسئول ۱۶٪ موارد پنومونیه بیمارستانی (۱)، ۱۲٪ عفونت های دستگاه ادراری اکتسابی بیمارستان (۲)، ۸٪ عفونت های زخم های جراحی (۳) و ۱۰٪ عفونت های خونی است. بیماران با نقص سیستم ایمنی و سرطان و بیماران سیستیک فیبروزیس (Cystic fibrosis) به طور ویژه ای به عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری حساس هستند و در بیماران سیستیک فیبروزیس تهدید کننده زندگی است. (۴) در این گروه بیماران

به آرامی جهت حذف اضافه رنگ با آب شیر شسته شد بعد از خشک شدن در مجاورت هوا، هر چاهک با ۱۶۰ μl اسید استیک گلاسیال ۷/۷٪ مجاور گردید و با طول موج (۵۷۰) نانومتر توسط READER ELISA جذب هر چاهک خوانده شد. (آزمایش ۳ بار تکرار گردید)

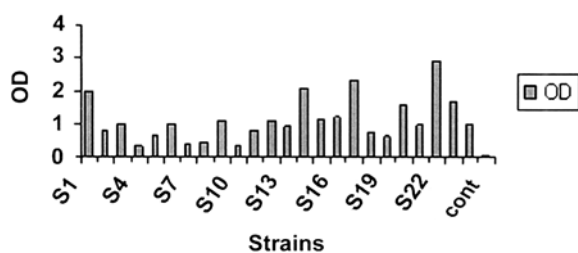
### مطالعه با میکروسکوپ الکترونی

در این مطالعه سویه ۲۱۴ با بیشترین میزان جذب در مرحله قبل انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت و تولید بیوفیلیم باکتری بر سطح صفحه تفلون و سوند با تغییراتی در روش ISHIDA تثبیت شده و با میکروسکوپ الکترونی نگاره مورد مطالعه قرار گرفت (۹).

ابتدا باکتری مورد نظر به محیط TSA (دارای ۵٪ گلوکز) تلقیح و به مدت ۱۶-۲۰ ساعت در ۳۷°C گرماگذاری و پس از انتقال به محیط TSB (۵٪ گلوکز) و مقایسه با ۰/۵ مک فارلند به غلظت ۱۰<sup>۶</sup> cfu/ml تنظیم و پس از افزودن صفحات تفلون (۱×۱×۰/۳) سانتیمتر و قطعات سوند به ابعاد ۱/۵ سانتیمتر تعدادی را به مدت یک روز و تعدادی را به مدت هفت روز گرماگذاری می شد. بعد از این زمان قطعات سوند و تفلون را با بافر فسفات سالین سه بار شسته و در گلو تار آلدئید ۲/۵٪ در بافر فسفات ۰/۱۵ مولار با pH=۷/۳ به مدت یک ساعت تثبیت و پس از شسته با بافر فسفات در محلول اسید تانیک ۱ W/V در بافر فسفات یک ساعت گرماگذاری و مجدد با بافر فسفات شسته و جهت آبگیری در رقت های ۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۲۰، ۱/۴۰، ۱/۸۰، ۱/۱۶۰ اتانول به مدت ۱۵-۳۰ دقیقه (سه بار) مجاورت و پس از خشک شدن در مجاورت هوا به فریزر ۷۰°C منتقل و بعد از ۲۴ ساعت با دستگاه فریزر Drier خشک شده و با طلا coat شده با میکروسکوپ الکترونی نگاره مطالعه گردید.

### یافته ها:

تولید بیوفیلیم در پلیت میکروتیتر ۹۶ سربیه ها در مقایسه با کنترل (شاهد منفی) نشان داد سویه ۲۱۴ با میزان جذب نوری ۲/۸۹ بیشترین میزان تولید بیوفیلیم را دارا می باشد. (نمودار ۱)



(نمودار ۱) S22 سویه ۲۱۴

هستند، (۸) شناسائی عفونت های بیوفیلیم حائز اهمیت می باشد. مطالعه بیوفیلیم به روشهای مختلفی انجام می گردد. اغلب از روش تست های لوله ای و پلیت میکروتیتر<sup>۱</sup> که در مقایسه با تست لوله ای دقت بالاتری دارد استفاده می گردد در این روش اتصال باکتریها به کف و دیواره چاهک و تولید بیوفیلیم با میزان رنگ پیوند شده و جذب نوری تعیین می گردد. در مطالعه میکروسکوپ الکترونی، اجتماع باکتریهای چسبیده به سطح که تولید میکروکلنی (Microcolony) و بدنال آن بیوفیلیم را می نمایند مشاهده می شود.

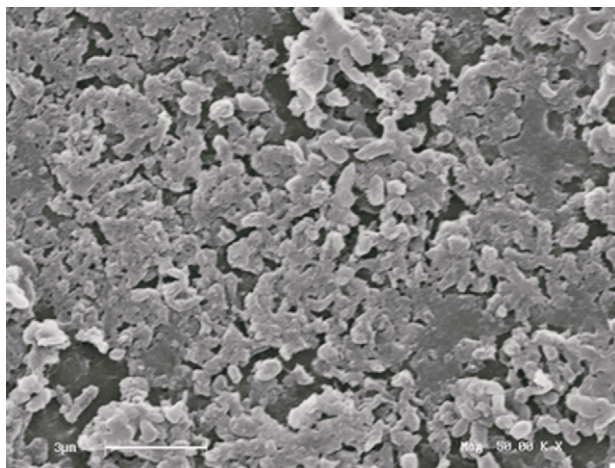
### مواد و روشها:

در این مطالعه که از نوع تحقیقات پایه است از ۴۲ سویه *P.aeruginosa* جمع آوری شده از بیمارستان استفاده شد. ابتدا آزمایشهای تشخیصی شامل رنگ آمیزی گرم، تست کاتالاز و اکسیداز، تست های بیوشیمیایی (*SIM*, *T.Suc.cetan*, *P.aer.MRVP*) بر روی نمونه ها انجام گردید و سویه هایی که کلنی مولد بر روی محیط TSA تولید کردند پس از تخلیص به محیط اسکیم تک (skim milk) منتقل و در ۲۰- درجه نگهداری شدند.

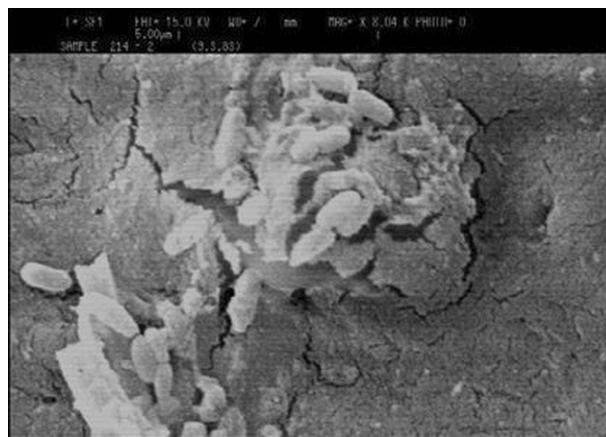
### مطالعه با پلیت میکروتیتر:

روش اصلاح شده پلیت میکروتیتر Stepanovic برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلیم توسط سویه ها مورد استفاده قرار گرفت. (۱۱) در این روش ۲۴ سویه، موکوتیدی جمع آوری شده از اسکیم میلک به محیط کلمبیا آگار منتقل، و یک شبانه روز در دمای ۳۷°C گرماگذاری شدند. سپس نمونه ها به محیط TSA تکمیل شده با ۰/۲٪ گلوکز منتقل و در شرایط هوازی در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری (incubation) شدند. سپس تک کلنی ها به محیط TSB تکمیل شده با ۰/۲٪ گلوکز منتقل و جذب نوری معادل ۰/۱٪ در طول موج ۶۵۰ تنظیم گردید و به میزان ۱۰۰ μl از هر نمونه به چاهک موازی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی افزوده شد و از محیط TSB تنها به عنوان شاهد منفی استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت گرماگذاری در ۳۷°C محتوی چاهک ها به آرامی اسپیره و با بافر (۰/۱ مولار بافر فسفات پتاسیم ایزوتونیک با سالین pH=۷/۵) شسته شده سپس ۱۵۰ متانول (Methanol) خالص به چاهک اضافه، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق جهت تثبیت سلولهای متصل به کف و جدار چاهک نگهداری شده اند و در مرحله بعد پس از اسپیره متانول، هر چاهک با ۲۰۰ μl کریستال ویوله W/V ۱٪ مدت ۲۰ دقیقه گرماگذاری و پلیت

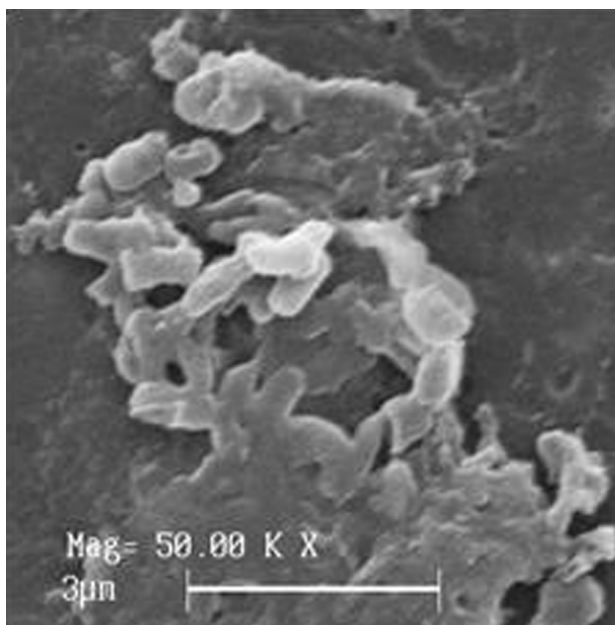
نتیجه مطالعه با میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان داد که ضخامت بیوفیلم تولید شده پس از ۷ روزگرمگذاری در مقایسه با بیوفیلم ۱ روزه بیشتر بوده علاوه بر آن میزان تشکیل بیوفیلم بر سطح سوند از صفحه تفلون بیشتر بود. (اشکال ۱-۵)



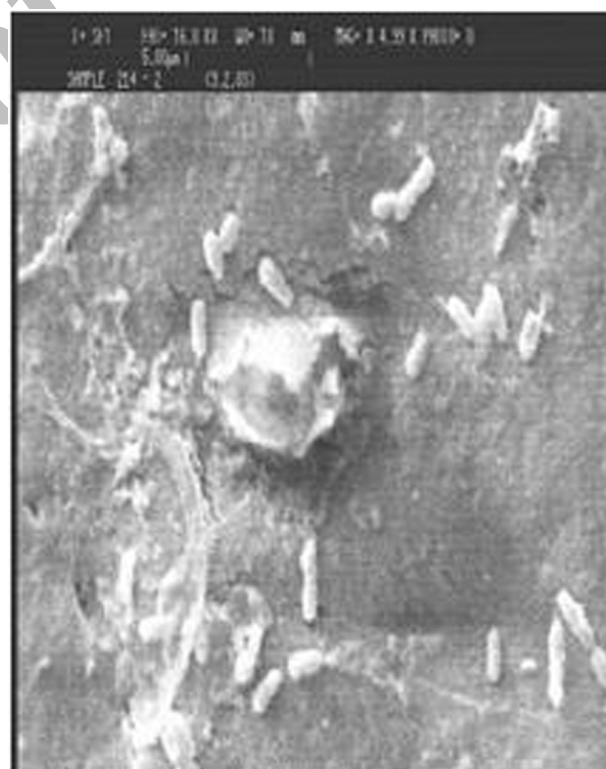
شکل ۳



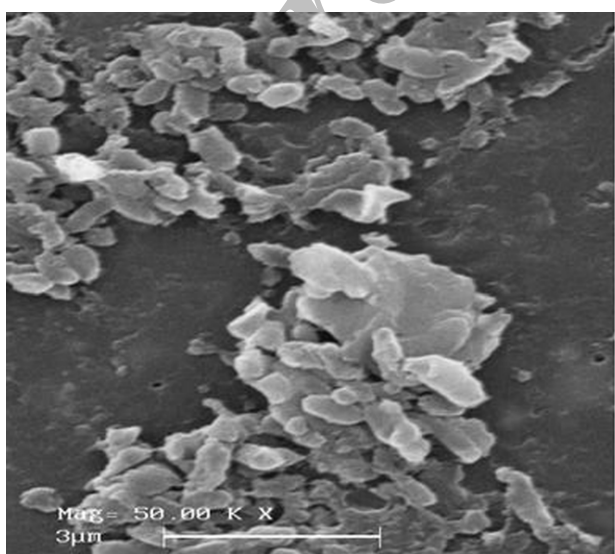
شکل ۱



شکل ۴



شکل ۲



شکل ۵

شکل ۱: بیوفیلم یک روزه بر سطح سوند  
 شکل ۲: بیوفیلم یک روزه بر سطح تفلون  
 شکل ۴: بیوفیلم هفت روزه بر سطح تفلون  
 شکل ۳ و ۵: بیوفیلم هفت روزه بر سطح سوند

**بحث و نتیجه گیری:**

در طبیعت میکروارگانیسم‌ها اغلب در ارتباط نزدیکی با سطوح جامد رشد می‌کنند که این سطوح ممکن است بافت‌های نرم زنده و یا سطوح غیر زنده، مواد غوطه‌ور و یا ذرات خاک باشد. (۱۳، ۱۲) ارتباط و پیوستگی با سطوح جامد منجر به تشکیل بیوفیلم میکروبی می‌گردد. تشکیل بیوفیلم منافع زیادی برای ارگانیسم متشکله دارد از جمله حفاظت آنها در برابر سیستم ایمنی میزبان، مقاومت در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها و ضد عفونی‌کننده‌ها، حفظ و نگهداری محیط فیزیکی شیمیایی مناسب برای رشد و بقا میکروارگانیسم (۱۴)؛ بنابراین این آنها قادرند در شرایط نامساعد محیطی مقاومت کرده و به حیات خود ادامه دهند. یکی از مهمترین پیشرفت‌ها در پزشکی مدرن استفاده از وسایل ساخته شده در پیوند دهی موقت و دائم است. امروزه در بیشتر درمان‌های پزشکی و جراحی از سوندها و لوله‌ها و ابزار پزشکی کاشتنی استفاده می‌گردد مهمترین مشکل استفاده از این وسایل ایجاد عفونت بیوفیلم میکروبی است. بیوفیلم‌ها در عفونت بافت آندوکاردیت، عفونت نازوفارنکس، عفونت دندان و لثه و عفونت با ابزار پزشکی کاشتنی مثل سوند و پروتزها یافت می‌شوند. بیمارانی که احتیاج به سوند گذاری طولانی مدت دارند به طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله سویه‌های مقاوم آنتی‌بیوتیک *P. aeruginosa* مولد بیوفیلم، انتروباکتر (*Enterobacter*)، پروتئوس (*Proteus*) مبتلا می‌گردند. Nickle و همکارانش (۱۵) تشکیل بیوفیلم سودوموناس آئروجینوزا را بر سطح سوند با مطالعه میکروسکوپ الکترونی نگاره نشان دادند.

با توجه به مقاومت آنتی‌بیوتیکی بیوفیلم باکتریها نسبت به حالت پلانکتونیک، این مسئله اهمیت بررسی و تشخیص بیوفیلم در عفونت ایجاد شده و لحاظ این مسئله را در درمان نشان می‌دهد. جهت سنجش تعداد و چگونگی توزیع باکتریهای چسبیده به سطح می‌توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده کرد.

در مطالعه با کمک میکروسکوپ الکترونی نگاره، امکان مشاهده باکتریهای چسبیده به طیف وسیعی از تکیه‌گاهها را مانند فلزات، بافتهای گیاهی و جانوری و سوند فراهم می‌گردد. بنابر این اغلب به طور وسیعی به کار می‌رود.

شمارش باکتریها و مشاهده مرفولوژی آنها، تعیین خصوصیات توپوگرافی سطح و مشاهده ارتباطات توزیعی بین باکتریها و تکیه‌گاه را امکان پذیر می‌سازد. از معایب این مطالعه کوچکی زمینه، زمان طولانی جهت آماده سازی نمونه و از بین رفتن پلیمرها و دنباله‌های فرایند آماده سازی است. (۱۹-۱۶)

در بررسی کیفی تشکیل بیوفیلم از روش‌های تست لوله ای و پلیت میکرو تیترا استفاده می‌گردد. در این تحقیق پلیت ۹۶ چاهکی پلی استرن استفاده شد که مزیت آن ایجاد سوبسترای استاندارد جهت اتصال باکتریها است. این روش وابسته به دانسیته نوری سلولهای باکتریایی چسبیده است و بنابر این در زمانی که تراکم باکتریایی روی سطح کم باشد غیر حساس است جهت اصلاح این عیب از اسید استیک در مرحله پایانی استفاده شد. (۱۱)

در این روش با افزودن اسید استیک گلاسیال قادر به اندازه گیری غیر مستقیم باکتریهای متصل شده به کف و دیواره چاهک می‌شویم. اسید استیک رنگ متصل به سلولهای چسبیده به کف چاهک را بخوبی رنگ متصل شده به سلولهای چسبیده به دیواره حل می‌کند و باعث دقت در تعیین میزان بیوفیلم ایجاد شده می‌گردد تست پلیت میکرو تیترا اصلاح شده یک سنجش کمی مناسب جهت بررسی تولید بیوفیلم است.

در توافق با نتایج Stepanovic و بررسیهای انجام شده توسط Susanne و همکارانش (۱۰، ۱۱) افزایش میزان تولید بیوفیلم و جذب نوری رابطه مستقیم دارد. و سویه ۲۱۴ که نسبت به دیگر سویه‌های بررسی شده کلنی‌های موکوئیدتر بر سطح پلیت تولید کرده بود بیوفیلم ضخیم تری ایجاد نمود. این مسئله در تائید رابطه کلنی موکوئید و ایجاد بیوفیلم بیشتر می‌باشد.

در مطالعه میکروسکوپ الکترونی هم نتایج بدست آمده با نتایج Ishida و همکارانش (۹) توافق دارد و ضخامت و ساختار بیوفیلم ۷ روزه از بیوفیلم ۱ روزه بیشتر و اجتماع میکروکلنی‌ها را به همراه دارد همچنین بیوفیلم تولید شده بر سطح سوند در مقایسه با تفلون ساختار ضخیم‌تر و بزرگتری را نشان داد که بیانگر مناسب بودن سطح سوند به عنوان سوبسترای مناسب جهت اتصال پایدار و تشکیل بیوفیلم است.



**REFERENCES:**

1. Wiblin RT. Nosocomial pneumonia. In: Wenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infection. 3rd ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p.807-819.
2. Pollack M. Pseudomonas aeruginosa. In: Mandell GL, infectious diseases 4<sup>th</sup> ed. New York: Churchill Livingstone; 1980-2003.
3. Kluytman J. Surgical infections including burns. In: Wenzel RP, editor. Prevention and control of nosocomial infections. 3<sup>rd</sup> ed. Baltimore; Williams and Wilkins; 1997. p.841-865.
4. Christian van Delden, Barbara H. Iglewski. Cell-to-Cell Signaling and Pseudomonas aeruginosa Infections. Emerging Infectious Disease 1998; 4(4): 551-560.
5. Fergie JE, Shema SJ, Lott L, Crawford R, Patrick CC. Pseudomonas aeruginosa bacteremia in immunocompromised children: analysis of factors associated with a poor outcome. Clin Infect Dis 1994; 18:390-394.
6. Bergen GA, Shelhamer JH. Pulmonary infiltrates in the cancer patient. Infect Dis Clin North Am 1996; 10:297-326.
7. Alexei, Brooun; Songhua, Liu; Kim, Leiw. A Dose-Response study of Antibiotic Resistance in Pseudomonas aeruginosa Biofilms. Antimicrobial Agent Chemotherapy 2000: 640-646.
8. Amyl; Spoering; Kim, Lewis. Biofilm and planktonic cells of pseudomonas aeruginosa have similar Resistance to Killing by Antimicrobials. journal of Bacteriology. 2001: 6746-6751.
9. Hiroko, Ishida; Yoshihisa ishida; Yuichikurosaka. In vitro and In vivo Activities of Levofloxacin against Biofilm producing pseudomonas aeruginosa. Antimicrobial Agent Chemotherapy. 1998; 92(7); 1641-1645.
10. Susanne, Haubler; Isabell, Ziegler; Alexander, Lottel. Highly adherent small-colony variants of pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis lung infection. journal of Medical Microbiology. 2003; 52; 295 -301.
11. Srdjan, Stepanovic; Dragana, Vukovic; Fuana, Dakic. A modified microtiter-playe test for quantification of staphylococcal biofilm formation. journal of Microbiological Method. 2000; 40; 175-179.
12. Costerton, j.w,k.j. cheng, G.G. Geesey. Bacterial biofilm in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 1987; 41; 435-464.
12. Dunn, I.j. Method for selecting and growing mixed culther in biofilm fluidized sand beds. methods in Enzymology. 1987; 135: 300-307.
13. Brown, M.R>W, P. Gilbert. sensivity of biofilms to antimicrobial agents. J.Appl. Bacteriol. 1998; 74: 87-97.
14. Nickle, J.C.A. Downey. J.W. Costerton. Ultrastructural Study of an infected foley catheter. The Can. J. surgery. 1985; 28: 50-51.
15. Christensen, G.D., L, Balda ssarri, W.A. simpson. Method for study microbial colonization of plastics. Method. Enzymol. 1995; 253: 477-500.
16. Fletcher, M. Method for studying adhesion and attachment to surface. Method. Microbial. 19990; 22: 251-281.
17. Surman, S.B. Compation of microscopic techniques for the enamination of biofilms. J.Microbiol. Method. 1996; 25: 57-70.
18. Yueluei, H., R. Friedman. labratory methods for studies of bacterial adhesion. J. Microbiol. Method. 1997; 30: 141-152.
19. Srdjan, Stepanovic; Dragana, Vukovic; Fuana, Dakic. A modified microtiter-playe test for quantification of staphylococcal biofilm formation. journal of Microbiological Method. 2000; 40; 175-179.

## Study of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* using modified microtitre plate and scanning electron microscope

\*Mojgan Mohammadi-Mehr<sup>1</sup>, Ahya Abdi Ali<sup>2</sup>

### Abstract :

**Background:** in this study, using a modified microtitre plate and scanning electron microscope, we investigated biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm productions are difficult to eradicate with antimicrobial treatment and up to 60% of all human infections are caused by biofilms. Bacterial biofilms may be found at various sites, including mucus membrane, teeth and indwelling medical devices. *Pseudomonas aeruginosa* is one of the most important opportunistic bacteria and producing biofilm. It has been reported that biofilm forming bacteria are more resistance to antibiotic treatment and immunologic attack.

**Materials and methods:** clinical isolates of *P.aeruginosa* were collected from hospital and identified by biochemical tests. A modified microtitre plate as described by Stepanovic was used to determine the biofilm formation capacity of *P.aeruginosa* and measured using ELISA reader. The bacteria biofilm on the Teflon sheets and catheter were fixed by modified method described by Ishida. They were observed with scanning electron microscope.

**Results :** the results demonstrated that *Pseudomonas aeruginosa* strain M214 denser biofilm formation compared with other strain, with OD=2.89 using modified microtitre plate test. Scanning electron micrograph of bacteria on the Teflon and catheter that had been incubated with *P.aeruginosa* M214 for 1 and 7 days were investigated. The results showed biofilm formation on catheter was denser than Teflon sheets. The bacteria incubated for 7 days on Teflon and catheter were covered with thick membranous and fibrous structure, unlike bacteria incubated for 1 day.

**Conclusion:** It seems modified microtitre plate is better and easier way to use in diagnostic laboratories regard to treatment difficulties, it strongly recommend to study the biofilm before antibiotic administration

**Keyword:** antibiotic resistance, biofilm, *Pseudomonas aeruginosa* .

1- (\*corresponding author) M.Sc of microbiology, faculty of medical, Army university of medical science.  
2- Assistant professor of biology, faculty of basic sciences, Alzahra university.