Original Article

Investigation of the effect of biosurfactant of *Bacillus subtilis* against *Staphylococcus* strains biofilms

Soltan-Dallal MM[1], Didar Z[2*]

1- Department of Pathobiology, Faculty of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, I.R. Iran.
2- Department of Food Industry, Neyshabur Branch, Islamic Azad University, Neyshabur, I.R. Iran.

Received: 2019/01/10 | Accepted: 2019/04/24

Abstract:

Background: Biosurfactants are compounds that are produced by different microorganisms and have an emulsifying property. This study aimed to investigate extractive biosurfactant from *bacillus subtilis* (PTCC1720) against the biofilms of *Staphylococcus aureus* (PTCC 1112), *Staphylococcus saprophyticus* (PTCC 1440) and *Staphylococcus epidermidis* (PTCC 1435).

Materials and Methods: This study was conducted in vitro to examine the effect of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in prevention of biofilm formation and removal of biofilms produced by different staphylococcal species. First, *bacillus subtilis* was cultured in suitable culture media for producing biosurfactant. Then, extraction of produced biosurfactant was done and anti-biofilm properties were assessed by determination of optical density at 570 nm by ELISA reader equipment. Statistical analysis was performed by SPSS software version 16 and ANOVA. The means were compared at 95% confidence level by Duncan's method.

Results: According to the results, the biosurfactant produced by *bacillus subtilis* had emulsification index equal to 40% and oil replacement area was 1.8 ± 0.3 cm^{-2}. Produced biosurfactant by *bacillus subtilis* had a significant effect on preventing microbial formation with the highest effect on biofilm of *staphylococcus aureus* and *Staphylococcus saprophyticus*. Also, the results showed that the biofilm of *staphylococcus epidermidis* had the highest resistance in this respect.

Conclusion: According to this study, the antibiofilm activity of biosurfactant extracted from *Bacillus subtilis* against the biofilm of *staphylococcus aureus*, *epidermidis* and *saprophyticus* was shown. In addition, this type of biosurfactant can be effective in removing biofilms formed by staphylococcal strains.

Keywords: Biosurfactant, *Bacillus subtilis*, Biofilm, *Staphylococcus*

***Corresponding Author:**
Email: z_didar57@yahoo.com
Tel: 0098 514 262 1905
Fax: 0098 514 261 5472

Conflict of Interests: ***No***

Feyz, Journal of Kashan University of Medical Sciences, August, 2019; Vol. 23, No 3, Pages 261-268

Please cite this article as: Soltan-Dallal MM, Didar Z. Investigation of effect of biosurfactant of *Bacillus subtilis* against Staphylococcus strains biofilms. ***Feyz*** 2019; 23(3): 261-8.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

بررسی اثر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* بر بیوفیلم‌های باکتری‌های استافیلوکوکوس

محمّدمهدی سلطان دلال[۱]، زهره دیدار[۲*]

خلاصه:

سابقه و هدف: بیوسورفکتانت‌ها، ترکیباتی هستند که به‌وسیله میکروارگانیسم‌های مختلف تولید می‌شوند و دارای خاصیت امولوسیفایری هستند. هدف از این تحقیق، بررسی اثر بیوسورفکتانت استخراجی از *باسیلوس سوبتلیس* (PTCC1720) در برابر تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (PTCC 1440) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (PTCC 1435) بود.

مواد و روش‌ها: این مطالعه به صورت آزمایشگاهی انجام و در آن اثر بیوسورفکتانت تولیدی توسط *باسیلوس سوبتلیس* در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم و نیز خارج‌کردن بیوفیلم تولیدی توسط گونه‌های مختلف استافیلوکوکی بررسی شد. پس از کشت *باسیلوس سوبتلیس* و استخراج بیوسورفکتانت تولیدی، بررسی اثر ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و با تست ANOVA صورت گرفت. میانگین تیمارها در سطح اطمینان ۹۵ درصد توسط روش دانکن محاسبه شد.

نتایج: بر اساس نتایج، بیوسورفکتانت تولیدشده توسط *باسیلوس سوبتلیس* دارای اندیس امولوسیفیکاسیون حدود ۴۰ درصد و میزان فعالیت بیوسورفکتانت جداسازی‌شده توسط تکنیک پخش روغن، معادل با ۱/۸±۰/۳ سانتی‌متر مربع بود. همچنین بیوسورفکتانت تولیدی توسط *باسیلوس سوبتلیس* بیشترین اثر را در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* داشت. بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* نیز بیشترین مقاومت را نشان داد.

نتیجه‌گیری: مطابق این تحقیق، اثر ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت استخراجی از *باسیلوس سوبتلیس* بر روی بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اپیدرمیدیس* و *ساپروفیتیکوس* مشخص شد. به‌علاوه، این نوع بیوسورفکتانت می‌تواند در خارج‌کردن بیوفیلم تشکیل‌شده توسط گونه‌های استافیلوکوکی، مؤثر باشد.

واژگان کلیدی: بیوسورفکتانت، *باسیلوس سوبتلیس*، بیوفیلم، استافیلوکوکوس

دو ماه‌نامه علمی– پژوهشی فیض، دوره بیست و سوم، شماره ۳، مرداد و شهریور ۹۸، صفحات ۲۶۸-۲۶۱

مقدمه

ساختار شیمیایی سورفکتانت‌ها از دو بخش هیدروفیل و هیدروفوب تشکیل شده است که این ساختار با کاهش کشش سطحی در حدّ فاصل دو فاز دارای قطبیت مختلف، به حل‌شدن این دو فاز در یکدیگر و تشکیل امولوسیون کمک می‌کند. این ترکیبات در موارد مختلفی نظیر تولید امولوسیون‌ها، خاصیت کف‌کنندگی و پراکنده‌سازی کاربرد دارند [۱].

در حال حاضر، اکثر سورفکتانت‌ها به روش شیمیایی سنتز و تولید می‌شوند، ولی به‌دلیل تجزیه‌پذیری بیولوژیکی و قابلیت تجدید-پذیری، بیوسورفکتانت‌ها مورد توجه واقع شده‌اند. بیوسورفکتانت-ها، ترکیبات سورفکتانت تولیدی توسط میکروارگانیسم‌ها هستند که عمدتاً امکان تولید آن‌ها از منابع ارزان‌قیمت وجود دارد. به‌علاوه بیوسورفکتانت‌ها قادر به فعالیت در شرایط دما، شوری و pH مختلف هستند [۲]. ساختار اصلی بیوسورفکتانت‌ها عمدتاً از گلیکولیپید، لیپوپپتید فسفولیپید و لیپوپروتئین تشکیل شده‌اند. گونه-های مختلف میکروبی توانایی تولید بیوسورفکتانت را دارند. از جمله پنی‌سیلیوم [۳]، کورینه *باکتریوم آکواتیکوم* [۴]، *سودوموناس آئروژنوزا* [۵]، استرپتومایسس [۶]. بیوسورفکتانت‌ها دارای خصوصیات بیولوژیکی نظیر ضدّ باکتریایی [۷]، ضدّ کپکی، ضدّ ویروسی [۸] و ضدّ سرطانی [۹] هستند. بیوفیلم، توده‌ای تشکیل‌شده از کلنی‌های میکروبی متصل بر روی سطوح است. باکتری‌ها در شرایط تشکیل بیوفیلم، مقاومت بیشتری نسبت به ترکیبات ضدّعفونی‌کننده نشان می‌دهند که این مسأله سبب مشکلات ایمنی

۱. استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲. استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، نیشابور، ایران

* **نشانی نویسنده مسؤول:**
نیشابور، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد نیشابور

تلفن: ۰۵۱۴۲۶۲۱۹۰۵ **دورنویس:** ۰۵۱۴۲۶۱۵۴۷۲

پست الکترونیک: z_didar57@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۲۰ **تاریخ پذیرش نهایی:** ۱۳۹۸/۲/۴

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

در صنعت شده است. به‌خصوص این که بسیاری باکتری‌های بیماری‌زا توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند از جمله گونه‌های مختلف سالمونلا، اشرشیا کلی، لیستریا، یرسینیا و کمپیلوباکتر. یکی از روش‌های مقابله با بیوفیلم‌های میکروبی، استفاده از ترکیبات با خاصیت بیوسورفکتانتی است [۷]. اثرات ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی توسط میکروارگانیسم‌های مختلف بررسی شده‌اند. از جمله: اثر ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی توسط لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس در برابر بیوفیلم‌های *پروتئوس میرابیلیس*، *کاندیدا آلبیکانس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* [۱۰]، خاصیت ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت اسینتوباکتر در برابر بیوفیلم-های *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونی* و *استرپتوکوک پیوژنز* [۱۱]، خاصیت ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت تولیدی توسط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *پدیوکوکوس اسیدی‌لاکتیسی* در برابر بیوفیلم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* [۱۲]. پژوهش‌ها نشان داده است که *باسیلوس سوبتلیس* توانایی تشکیل بیوسورفکتانت با ساختار رامنولیپیدی را دارد [۱۳]. هدف از این تحقیق، بررسی اثر بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* (PTCC1720) در برابر تشکیل بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (PTCC 1440) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (PTCC 1435) می‌باشد. همچنین توانایی خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های مذکور مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

این مطالعه از نوع آزمایشگاهی بود.

– آماده‌سازی مایه تلقیح

سویه‌های میکروبی *استافیلوکوکوس اورئوس* (PTCC 1112)، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* (PTCC 1440) و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* (PTCC 1435) به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران خریداری شد و در شرایط استریل به محیط براث مناسب (تریپتوز سوی براث برای *استافیلوکوکوس اورئوس* و نوترینت براث برای *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس* اپیدرمیدیس) منتقل و در شرایط دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، گرم‌خانه‌گذاری شدند. جداسازی سلول‌های میکروبی توسط سانتریفوژ مدل ALC4232 ساخت کمپانی MedWOW کشور آلمان با دور ۴۰۰۰ rpm صورت گرفت. به‌منظور تعیین جمعیت میکروبی از روش مک فارلند استفاده شد [۱۴] و جمعیت نهایی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ باکتری در هر میلی‌لیتر از هر یک از سویه‌های باکتریایی به دست آمد [۱۵].

کشت اوّلیه باکتری *باسیلوس سوبتلیس*

باکتری *باسیلوس سوبتلیس* (PTCC1720) از کلکسیون میکروبی سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران به صورت لیوفیلیزه تهیه شد. جهت آماده‌سازی باکتری از محیط براث با فرمولاسیون ۱ درصد پپتن، ۱ درصد کلرید سدیم و ۳ درصد عصاره مخمر و با pH=۷ استفاده شد. باکتری به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد [۱۳].

تولید بیوسورفکتانت توسط *باسیلوس سوبتلیس*

محیط مناسب جهت تهیه بیوسورفکتانت شامل گلوکز (یک گرم در لیتر)، KH_2PO_4 (نیم گرم در لیتر)، K_2HPO_4 (یک گرم در لیتر)، KCl (یک‌دهم گرم در لیتر)، $MgSO_4$ (نیم گرم در لیتر)، $FeSO_4$ (هشت میلی‌گرم در لیتر)، $CaCl_2$ (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و اوره (شش میلی‌گرم در لیتر) همراه با یک میلی‌لیتر در لیتر محلول حاوی عناصر جزئی شامل ($ZnSO_4$ ۴/۴ میلی‌گرم در لیتر، $MnSO_4$ ۳/۳ میلی‌گرم در لیتر، $CuSO_4$ ۰/۱ میلی‌گرم در لیتر) و با pH= ۷ استفاده شد. محیط کشت با میزان ۳ درصد از مایه تلقیح تهیه شده در مرحله قبل، تلقیح شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد تحت هم‌زدن با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد [۱۳]، سپس جهت استخراج بیوسورفکتانت، محیط براث با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد تا سلول-های میکروبی جداسازی شوند [۱۶] و سپس خالص‌سازی بیوسورفکتانت صورت گرفت [۱۳].

تعیین میزان فعالیت بیوسورفکتانتی

تعیین میزان فعالیت بیوسورفکتانتی، توسط روش پخش روغن صورت گرفت. ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر در یک پلیت ریخته شد و مقدار ۱۰۰ میکرولیتر روغن خام سویا بر روی سطح آب اضافه شد و از بیوسورفکتانت جداسازی شده مقدار ۱۰ میکرولیتر به آن اضافه شد. میزان پخش روغن میکرومتر دیجیتال Guanglu 25-0 مدل 211-701 (ساخت کشور چین) اندازه‌گیری شد [۱۷].

تعیین میزان اندیس امولوسیفیکاسیون

جهت تعیین اندیس امولوسیفیکاسیون، ۱ میلی‌لیتر از کشت براث و ۱ میلی‌لیتر پارافین به‌مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد، میزان لایه امولوسیون شده بر حسب سانتی‌متر اندازه‌گیری [۱۸] و سپس با استفاده از فرمول ۱، اندیس محاسبه شد.

فرمول (۱) اندیس امولوسیفیکاسیون=$\frac{\text{ارتفاع لایه امولوسیفه شده}}{\text{ارتفاع کل مایع}}\times۱۰۰$

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

تعیین میزان ممانعت از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی توسط بیوسورفکتانت

مقادیر ۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* به چاهک‌های میکروپلیت حاوی ۱۰۰ میکرولیتر از براث حاوی باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* و *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* با جمعیت تقریبی $۱/۵\times۱۰^{۶}$ باکتری در هر میلی‌لیتر اضافه شد و سپس گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. چاهک‌های حاوی محیط کشت براث استریل به‌عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند. پس از مرحله گرم‌خانه‌گذاری، چاهک‌ها تخلیه شده و توسط ۲۰۰ میکرولیتر بافر فسفات حاوی نمک با pH=۷/۴ سه مرتبه شستشو شد. سپس به‌صورت معکوس قرار داده شد تا خشک شود. جهت تثبیت لایه بیوفیلم از اتانل ۹۵ درصد استفاده شد و رنگ‌آمیزی به‌مدت ۵ دقیقه توسط کریستال ویوله با غلظت یک‌درصد و به میزان ۱۰۰ میکرولیتر انجام شد. در آخرین مرحله شستشو توسط آب مقطر (سه مرتبه) و سپس خشک کردن میکروپلیت انجام شد. میزان دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر توسط الایزا ریدر مدل AWARNESS (ساخت آمریکا) سنجیده شد. چنان‌چه میزان دانسیته نوری اندازه‌گیری‌شده بیش از ۱ باشد، نشان‌دهنده تولید زیاد بیوفیلم است. مقادیر دانسیته نوری ۱-۰/۱ نشان‌دهنده تولید متوسط بیوفیلم و مقادیر دانسیته نوری کمتر از ۰/۱ نشان‌دهنده عدم تشکیل بیوفیلم است [۱۹].

بررسی اثر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* در خارج کردن و تخریب بیوفیلم میکروبی

ابتدا جمعیت مشخصی ($۱/۵\times۱۰^{۶}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) از هر یک از باکتری‌های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *اپیدرمیدیس* و *ساپروفیتیکوس*) به چاهک‌های میکروپلیت منتقل و گرم‌خانه‌گذاری شد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۲۴ ساعت). سپس غلظت‌های مختلفی از بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* شامل (۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به هر چاهک اضافه شد و مجدد گرم‌خانه‌گذاری شد (دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، ۱۵۰ دقیقه). پس از گرم‌خانه‌گذاری، چاهک‌ها تخلیه شده و مراحل شستشو، رنگ‌آمیزی و قرائت میزان دانسیته نوری در طول موج ۵۷۰ نانومتر صورت گرفت [۲۰].

بررسی میکروسکوپی بیوفیلم

جهت بررسی میکروسکوپی بیوفیلم‌های میکروبی، ابتدا هر یک از میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *اپیدرمیدیس* و *ساپروفیتیکوس*) بر روی لام شیشه‌ای منتقل شدند و گرم‌خانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت صورت گرفت. سپس نمونه‌ها در مواجهه با بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* قرار گرفتند (به‌جز نمونه‌های شاهد). پس از انجام مرحله رنگ‌آمیزی، از میکروسکوپ نوری مدل Olympus (ساخت ژاپن) با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ جهت بررسی بیوفیلم‌ها استفاده شد [۲۱].

آنالیز آماری

اثر غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* بر میزان تشکیل بیوفیلم و نیز میزان خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های مورد مطالعه به‌صورت میانگین و خطای استاندارد میانگین ثبت شد. محاسبات آماری توسط نرم‌افزار SPSS ویرایش ۱۶ و با تست ANOVA و مقایسه میانگین در سطح معنی‌داری ۹۵ درصد صورت گرفت.

نتایج

ویژگی‌های بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس*

بررسی انجام‌شده نشان داد که بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* دارای اندیس امولوسیفیکاسیون ۴۰ درصد و منطقه جایگزینی روغن برابر با ۰/۳±۱/۸ سانتی‌مترمربع بود.

اثر بیوسورفکتانت استخراجی باسیلوس سوبتلیس بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های استافیلوکوکوس بیماری‌زا

نتایج بررسی خاصیت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *ساپروفیتیکوس* و *اپیدرمیدیس* توسط بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* نشان داد که این نوع بیوسورفکتانت در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم مؤثر است و غلظت بیوسورفکتانت در اثر ضدّ اتصالی بیوفیلم‌های میکروبی اثرگذار است ($P\leq۰/۰۵$) (جدول شماره ۱).

اثر بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* در تخریب بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس*

بررسی اثر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* در خارج‌کردن بیوفیلم‌های تشکیل‌شده باکتری‌های مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*) نشان داد که دو فاکتور غلظت بیوسورفکتانت و نوع باکتری تشکیل‌دهنده بیوفیلم بر میزان کارایی بیوسورفکتانت در خارج‌کردن بیوفیلم مؤثر هستند (جدول شماره ۲). بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* بیشترین مقاومت

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

در برابر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* را نشان داد. اثر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* در خارج‌کردن بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* مشابه بود (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۱- اثر بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* در تشکیل بیوفیلم باکتری‌های گونه *استافیلوکوکوس*

تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس به تنهایی	۰/۲۵۴±۰/۰۳[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به تنهایی	۰/۱۳۸±۰/۰۱۹[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* به تنهایی	۰/۱۴۶±۰/۰۱۷[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۱±۰/۰۰۵[b]	عدم تشکیل بیوفیلم	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۱۲۱±۰/۰۰۲[b]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* همراه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۶۴±۰/۰۰۶[b]	عدم تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۰۴±۰/۰۰۵[c]	عدم تشکیل بیوفیلم	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۱۱۹±۰/۰۰۳[c]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* همراه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۶۲±۰/۰۰۳[b]	عدم تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۰۳±۰/۰۰۱[d]	عدم تشکیل بیوفیلم	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۹±۰/۰۰۲[d]	عدم تشکیل بیوفیلم	*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* همراه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۵۱±۰/۰۰۲[c]	عدم تشکیل بیوفیلم

میانگین‌ها با حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

جدول شماره ۲- اثر بیوسورفکتانت باسیلوس سوبتلیس در خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس*

تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم	تیمار	دانسیته نوری در ۵۷۰ نانومتر	کیفیت تشکیل بیوفیلم
استافیلوکوکوس اورئوس به تنهایی	۰/۲۵۴±۰/۰۳[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* به تنهایی	۰/۱۳۸±۰/۰۱۹[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط	*استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* به تنهایی	۰/۱۴۶±۰/۰۱۷[a]	تشکیل بیوفیلم متوسط
بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۲۲±۰/۰۰۳[b]	عدم تشکیل بیوفیلم	بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۱۲۸±۰/۰۲[b]	تشکیل بیوفیلم متوسط	بیوفیلم *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در مواجهه با ۱ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۱۹±۰/۰۰۸[b]	عدم تشکیل بیوفیلم
بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۱۶±۰/۰۰۵[c]	عدم تشکیل بیوفیلم	بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۱۱۷±۰/۰۱[c]	تشکیل بیوفیلم متوسط	بیوفیلم *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در مواجهه با ۲ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۱۵±۰/۰۰۶[c]	عدم تشکیل بیوفیلم
بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس* در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۰۹±۰/۰۰۱[d]	عدم تشکیل بیوفیلم	بیوفیلم *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۱۱±۰/۰۰۱[d]	تشکیل بیوفیلم متوسط	بیوفیلم *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در مواجهه با ۳ mg/ml بیوسورفکتانت	۰/۰۰۵±۰/۰۰۴[d]	عدم تشکیل بیوفیلم

میانگین‌ها با حروف مشابه، فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

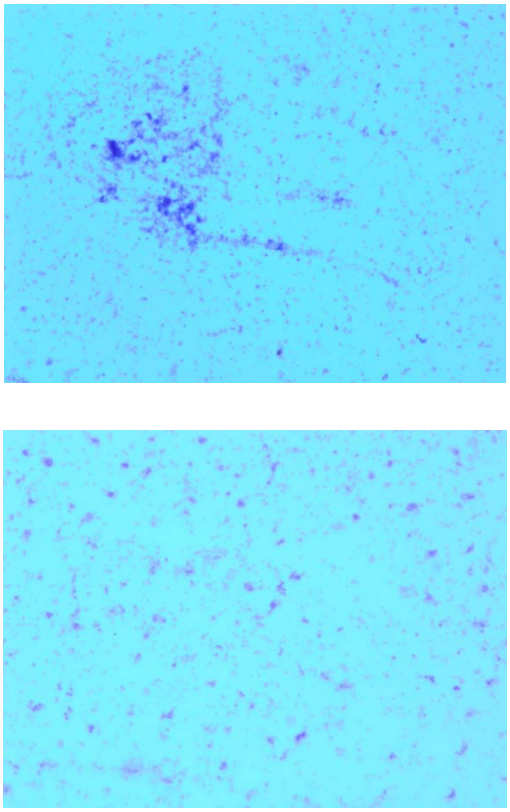
[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

بررسی تصاویر میکروسکوپی بیوفیلم‌های باکتری‌های مختلف در غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس*

تصاویر میکروسکوپی (شکل شماره ۱) بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* قبل و بعد از مواجهه با بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* را با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ نشان می‌دهد. مطابق این تصاویر، تشکیل بیوفیلم در هر دو حالت مشخص است. بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد در مورد دو باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در مواجهه با غلظت‌های ۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت، بیوفیلم باقی نمانده بود که نتایج جذب‌سنجی نیز مؤید این مطلب است.

a

b



شکل شماره ۱- تصاویر میکروسکوپی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰۰ از بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*. a: قبل از مواجهه با بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس*. b: بعد از مواجهه با ۳mg/ml بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس*

بحث

نتایج نشان داد که بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* دارای خاصیت بیوسورفکتانتی حدود ۴۰ درصد بود و منطقه جایگزینی روغن ایجادشده توسط این نوع بیوسورفکتانت برابر با ۱/۸±۰/۳ سانتی‌مترمربع بود. نتایج حاصل از قرائت دانسیته نوری توسط دستگاه الایزا در طول موج ۵۷۰ نانومتر، نشان داد که هر سه باکتری مورد مطالعه (*استافیلوکوکوس اوئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس*) توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند و مقادیر دانسیته جذب نوری اندازه‌گیری شده *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اپیدرمیدیس* و *ساپروفیتیکوس* به‌ترتیب ۰/۲۵۴، ۰/۱۳۸ و ۰/۱۴۶ بود (جدول شماره ۱). توانایی تشکیل بیوفیلم توسط *استافیلوکوکوس اورئوس* و *اپیدرمیدیس* در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است [۲۲]. غلظت‌های ۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت *باسیلوس سوبتلیس* منجر به کاهش میزان دانسیته نوری در مورد *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساپروفیتیکوس* به کمتر از ۰/۱ شده است که نشان‌دهنده عدم تشکیل بیوفیلم است (جدول شماره ۱) ولی در مورد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تنها در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت، میزان دانسیته نوری به کمتر از ۰/۱ رسیده است و در غلظت‌های کمتر از بیوسورفکتانت (۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، تشکیل بیوفیلم به میزان متوسط صورت گرفته است (جدول شماره ۱). اثر بیوسورفکتانت‌ها در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است. از جمله بیوسورفکتانت استخراجی از *لاکتوباسیلوس کازئی* اثر ضدّ بیوفیلمی در برابر گونه‌های مختلف

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

استافیلوکوکوس اورئوس به میزان ۸۶-۵۳ درصد نشان داده است [۹]. نتایج بررسی اثر تخریبی بیوسورفکتانت استخراجی *باسیلوس سوبتلیس* بر بیوفیلم تشکیل شده باکتری‌های گونه *استافیلوکوکوس* نشان داد غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت در میزان خارج شدن بیوفیلم‌های میکروبی تشکیل‌شده مؤثر است. نوع باکتری تشکیل‌دهنده بیوفیلم نیز در این خصوص اثرگذار است. مطابق جدول شماره ۲، بیوفیلم باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* در تمام غلظت‌های بیوسورفکتانت، مقاومت نشان داد و وجود بیوفیلم این‌گونه میکروبی به میزان متوسط تعیین شد که در تصاویر میکروسکوپی نیز وجود بیوفیلم این‌گونه باکتریایی پس از مواجهه با بیوسورفکتانت مشاهده شد (شکل شماره ۱). اما بیوفیلم‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* در مجاورت غلظت‌های مختلف بیوسورفکتانت، به‌طور کامل خارج شدند (جدول شماره ۲). اثر ضدّ بیوفیلمی بیوسورفکتانت‌های میکروبی در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است. از جمله بیوسورفکتانت استخراجی از *اسینتوباکتر ایندیکوس* M6 در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر سبب تخریب بیش از ۸۰ درصد از بیوفیلم تشکیل‌شده توسط *سودوموناس آئروژنوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* می‌شود [۱۱]. سان و همکاران نیز در گزارش خود به تخریب حدود ۷۵ درصد از بیوفیلم تشکیل-شده توسط *اشرشیاکلی* در غلظت ۱۲۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت اشاره نموده‌اند [۲۳].

نتیجه‌گیری

باکتری *باسیلوس سوبتلیس* توانایی تشکیل بیوسورفکتانت با قدرت بیوسورفکتانتی ۴۰ درصد را دارد. بیوسورفکتانت تولیدی توسط باکتری *باسیلوس سوبتلیس* در غلظت‌های ۳-۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر اثرات ضدّ بیوفیلمی بر بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس* دارد؛ ولی در مورد *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*، فقط غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از بیوسورفکتانت، مانع از تشکیل بیوفیلم شد. همچنین این ماده توانایی تخریب و خارج کردن بیوفیلم باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *ساپروفیتیکوس* را دارد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از طرح مصوب مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۳۹۷۵۹ می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم. از آزمایشگاه میکروبیولوژی و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد نیشابور نیز جهت فراهم نمودن امکانات انجام این تحقیق، تشکر و قدردانی می‌شود.

References:

[1] Banat IM, De Rienzo MAD. Microbial biofilms: biosurfactants as antibiofilm agents. ***Appl Microbiol Biotechnol*** 2014; 98(24): 9915-29.
[2] Kosaric N. Biosurfactants in industry. ***Pure Appl Chem*** 1993; 6: 1731-7.
[3] Sena HH, Sanches MA, Rocha DF, Segundo Filho WO, de Souza ÉS, de Souza JV. Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the Amazon forest. ***Int J Microbiol*** 2018; 2018.
[4] Martins P C, Martins V G. Biosurfactant production from industrial wastes with potential remove of insoluble paint. ***Int Biodeterior Biodegrad*** 2018; 127: 10-16.
[5] Tiwary M, Dubey A CK. Characterization of Biosurfactant Produced by a Novel Strain of *Pseudomonas aeruginosa*, Isolate ADMT1. ***J Surfact Deterg*** 2018; 21: 113-25.
[6] Santos APP, Silva MDS, Costa EVL, Rufino R D, Santos VA, Ramos CS, Sarubbo LA, Porto ALF. Production and characterization of a biosurfactant produced by *Streptomyces* sp. DPUA 1559 isolated from lichens of the Amazon region. ***Braz J Med Biol Res*** 2018; 51(2): 1-10.
[7] de Freitas Ferreira J, Alan Vieira E, Nitschke M. The antibacterial activity of rhamnolipid biosurfactant is pH dependent. ***Food Res Int*** 2018; https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.005.
[8] Santos VL, Nardi Drummond RM, Dias-Souza MV. Biosurfactants as Antimicrobial and Antibiofilm Agents. ***Curr Dev Biotechnol Bioeng*** 2017; http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-444-63660-7.00015-2.
[9] Merghni A, Dallel I, Noumi E, Kadmi Y, Hentati H, Tobji S, Mastouri M. Antioxidant and antiproliferative potential of biosurfactants isolated from *Lactobacillus casei* and their anti-biofilm effect in oral *Staphylococcus aureus* strains. ***Microb Pathog*** 2017; 104: 84-9.
[10] Abdalsadiq N, Hassan Z, Lani M. Antimicrobial, antiadhesion and anti-biofilm activity of biosurfactants isolated from *lactobacillus* spp. ***Life Sci Inf Publ*** 2018; 4(4): 280-92.
[11] Karlapudi A P, Venkateswarulu T C, Srirama K, Kota R K, Mikkili I, Kodali VP. Evaluation of anti-cancer, anti-microbial and anti-biofilm potential of biosurfactant extracted from an Acinetobacter M6 strain. ***J King Saud Univ Sci*** 2018.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]

[12] Yan X, Gu S, Cui X, Shi Y, Wen S, Chen H, Ge J. Antimicrobial, anti-adhesive and anti-biofilm potential of biosurfactants isolated from *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus plantarum* against *Staphylococcus aureus* CMCC26003. ***Microb Pathog*** 2019; 127: 12-20.
[13] Suresh Chander, CR, Lohitnath T, Mukesh Kumar DJ., Kalaichelvan, P. T. Production and characterization of biosurfactant from *bacillus subtilis MTCC441* and its evaluation to use as bioemulsifier for food bio – preservative. ***Adv Appl Sci Res*** 2012; 3(3): 1827-31.
[14] Mohammadi N, Mirhosseini M, Shirzad M, Dehghan Hamdan A, Yazdani N. Synthesizing Zno Nanoparticles by High-Energy Milling and Investigating Their Antimicrobial Effect. ***J Shahid Sadoughi Uni Med Sci*** 2015; 23(4): 2070-82. [*in Persian*]
[15] Moradian Eivari A K, Salehi M, Malek Jafarian M. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* on vancomycin–resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Imam Reza hospital patients of Mashhad. ***J Neyshabur Uni Med Sci*** 2015; 3(3): 39-45. [in Persian]
[16] Sriram MI, Kalishwaralal K, Deepak V, Gracerosepat R, Srisakthi K, Gurunathan S. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. ***Colloids Surf B. Biointerfaces*** 2011; 85(2): 174-81.
[17] Rodrigues LR, Teixeira JA, Mei HC. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. ***Colloids Surf B*** 2006; 49: 78-85.
[18] Bodour AA, Miller RM. Biosurfactant types, screening, methods, and applications. In: Bitton, G. (Ed.). Encyclopedia of Environmental Microbiology, first ed. John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, NJ; 2004. p. 750–70.
[19] Noumi E, Snoussi M, Merghni A, Nazzaro F, Quind G, Akdamar G, Mastouri M, Abdulbasset Al-Sieni A, Ceylan O. Phytochemical composition, anti-biofilm and anti-quorum sensing potential of fruit, stem and leaves of *Salvadora persica L.* methanolic extracts. ***Microb Pathog*** 2017; 109: 169-76.
[20] Todorov S D, de Paula O A L, Camargo A C, Lopes D A, Nero L A. Combined effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST8SH and vancomycin, propolis or EDTA for controlling biofilm development by *Listeria monocytogenes*. ***Rev Argent Microbiol*** 2018; 50(1): 48-55.
[21] Mohammadi Bazargani M, Rohloff J. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. ***Food Control*** 2016; 61: 156-64.
[22] Izano EA, Amarante M A, Kher WB, Kaplan J B. Differential Roles of Poly-N-Acetylglucosamine Surface Polysaccharide and Extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. ***Appl Environ Microbiol*** 2008; 74(2): 470-6.
[23] Sun W, Wang Y, Zhang W, Ying H, Wang P. Novel surfactant peptide for removal of biofilms. ***Colloids Surf B*** 2018; 172: 180–6.

[Downloaded from feyz.kaums.ac.ir on 2023-03-30]