

## باکتریوفاژ کاندیدای جدید برای جلوگیری و حذف بیوفیلم



رضا عزیزیان<sup>1,2</sup>، فرید عزیزی جلیلیان<sup>3\*</sup>، حسن عسکری<sup>1,2</sup>، احمد ناصر<sup>1,2</sup>، ساجده کریمی<sup>2</sup>، نورخدا صادقی فرد<sup>2</sup>  
سید داود موسوی نسب<sup>4</sup>، نایبعلی احمدی<sup>5</sup>

- 1) کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- 2) مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- 3) مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام
- 4) گروه ویروس شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس تهران
- 5) مرکز تحقیقات پروتئومیکس، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی تهران

### تاریخ پذیرش:

### تاریخ دریافت:

### چکیده

**مقدمه:** سودوموناس آئروژینوزا، میکروارگانیزی است که در شرایط مرطوب زنده می ماند و عامل خطرناکی بویژه در فضای بیمارستانی می باشد. مصرف بیش از حد آنتی بیوتیک ها باعث بروز سویه های مقاوم به درمان چند دارویی سودوموناس آئروژینوزا گردیده است. سودوموناس آئروژینوزا می تواند به سطوح متنوعی متصل شده و تشکیل بیوفیلم بدهد. بیوفیلم به عنوان شکلی از جمعیت باکتریایی نسبت به بسیاری داروها و مواد شیمیایی مقاوم بوده و قادر به ایجاد بیماریهای خطرناک و مقاوم به درمان می شود. در چندین دهه گذشته باکتریوفاژها (فاژها) به عنوان راه حل جدیدی برای درمان بیوفیلم مطرح گردیده اند. در این مطالعه فاژهای سودوموناس آئروژینوزا جهت جلوگیری و حذف بیوفیلم مورد بررسی قرار گرفته اند.

**مواد و روش ها:** پس از جداسازی فاژها و تهیه رقت های سریالی تشکیل بیوفیلم به روش میکروپلیت مورد بررسی قرار گرفت. همچنین اثر فاژهای جدا شده بر روی بیوفیلم باکتری های *E.coli*، *Pseudomonas putida* و *Acinetobacter baumannii* نیز بررسی شد.

**یافته های پژوهش:** غلظت نوری برای بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در طول موج 492nm برابر 1/688 بود. سوسپانسیون فاژ خالص و رقت های 10-2 و 10-3 از سوسپانسیون فاژی، OD را به ترتیب به 1/587، 1/341 و 1/461 کاهش دادند. نتایج نشان می دهد که فاژها قادر به حذف و مهار بیوفیلم هستند. همچنین فاژها در رقت های خاصی بیشترین تاثیر را دارند.

**بحث و نتیجه گیری:** فاژها برای اتصال به رسپتور هدف باهم رقابت می کنند و در غلظت معینی بیشترین اثر دارند. نتایج این تحقیق نشان داد که فاژها قادر به از بین بردن باکتریای مختلف هستند و م توان آنها را به این منظور مورد استفاده قرار داد.

واژه های کلیدی: باکتریوفاژ، سودوموناس آئروژینوزا، بیوفیلم

\*نویسنده مسئول: مرکز تحقیقات میکروب شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایلام

## مقدمه

سودوموناس آئروژینوزا میکروارگانیسمی است که توانایی زنده ماندن در محیط های مرطوب را دارا بوده و قادر به ایجاد مشکلات شدیدی در بیمارستان می باشد. این باکتری بعنوان فراوان ترین باکتری گرم منفی جدا شده از خون، عفونت زخم، پنومونی، سپسیس، عفونت دستگاه ادراری - تناسلی و عفونت داخل شکمی مطرح می باشد [1]. این باکتری همچنین قادر به ایجاد مشکلات جدی در افراد مبتلا به سیستمیک فیبروزیس با ایمنی سرکوب شده، افراد با سوختگی شدید، سرطانی ها و ایدزی ها می باشد [2]. یکی از دغدغه های درمان این باکتری، حساسیت پائین آن به آنتی بیوتیک ها می باشد، که این فرآیند را به پمپ های افلاکس (کد شونده توسط کروموزومی) و نفوذپذیری دیواره سلولی باکتری و مکانیسم های دیگر نسبت می دهند [3]. استفاده بیش از حد آنتی بیوتیک ها به پیدایش باکتری ها مقاوم چند دارویی منجر گردیده است که باعث مشکلات درمانی عفونت های حاصله از سودوموناس آئروژینوزا شده است [3, 4]. به علاوه سودوموناس آئروژینوزا قادر به اتصال به سطوح و تشکیل بیوفیلم می باشد [5]. بیوفیلم بعنوان یک استراتژی برای زنده ماندن باکتری مسئول ایجاد عفونت های مقاوم به آنتی بیوتیک از طریق وسائل پزشکی مطرح می باشد [6, 7]. باکتریوفاژها بعنوان روشی نوین برای مقابله با بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت [6, 8].

فاژ تراپی که در چندین دهه ساله گذشته مطرح گردیده است [9] برپایه استفاده از فاژهای لیتیک و مقابله با عفونت باکتریایی استوار می باشد. این روش درمانی دارای مزایای نسبت به آنتی بیوتیک درمانی می باشد که می توان اختصاصیت بالا برای میزبان

باکتریایی، عدم عوارض جانبی برای بیمار و پایداری وابسته به حضور میزبان باکتریایی اشاره نمود [6]. هدف از این مطالعه بررسی اثر فاژ بر روی دو فاز از مراحل تشکیل بیوفیلم می باشد: مرحله ی پلانکتونیک و مرحله ی بیوفیلمی.

## مواد و روش ها

در این مطالعه نمونه های فاضلاب از حوضچه بهداشتی دانشگاه علوم پزشکی ایلام تهیه شد. در ابتدا به 40 سی سی از فاضلاب تازه 2-3 قطره کلروفرم اضافه شد و سپس با دور 4000 rpm در 4 درجه سانتی گراد برای 15 دقیقه عمل سانتریفیوژ انجام شد و در انتها محلول بالایی با فیلتر 0.45 $\mu$  فیلتر گردید.

20 سی سی سوسپانسیون حاصل به طور هم حجم با LB برات، به همراه 1-2 سی سی سولفات منیزیم 10 درصد و 5 سی سی از سوسپانسیون باکتریایی برای 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد انکوبه شد. بعد از 24 ساعت، سانتریفیوژ و فیلتراسیون با همان شرایط انجام گردید. سپس با روش overlay (کشت دو لایه) باکتری با سوسپانسیون فاژی کشت گردید. در ادامه پلاک فاژی که حاوی تقریباً 106 p.f.u بود را با پیپت پاستور استریل برداشته در 5 سی سی LB برات حاوی یک سی سی باکتری با غلظت 0.5 $\mu$ f برای 4-6 ساعت در 37 درجه سانتیگراد با دور 100 rpm انکوبه گردید.

به سوسپانسیون حاصل چند قطره کلروفرم اضافه گردید و برای 5 دقیقه با دور 5000 rpm در 4 درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و سپس با فیلتر 0.45 $\mu$  فیلتر گردید. سوسپانسیون حاصله شامل فاژ سودوموناس بوده که در مراحل بعدی مورد استفاده قرار گرفت [10].



عکس شماره 1-1: پلاک های فازی

مهار تشکیل بیوفیلم: *Acinetobacter baumannii* تهیه شد. بعد از تهیه بیوفیلم در روز دوم، سوسپانسیون فازی خالص و رقت های 10-1 تا 10-3 به چاهک های حاوی بیوفیلم اضافه شدند. در روز سوم، OD با دستگاه ELISA reader خوانده شد.

#### نتایج:

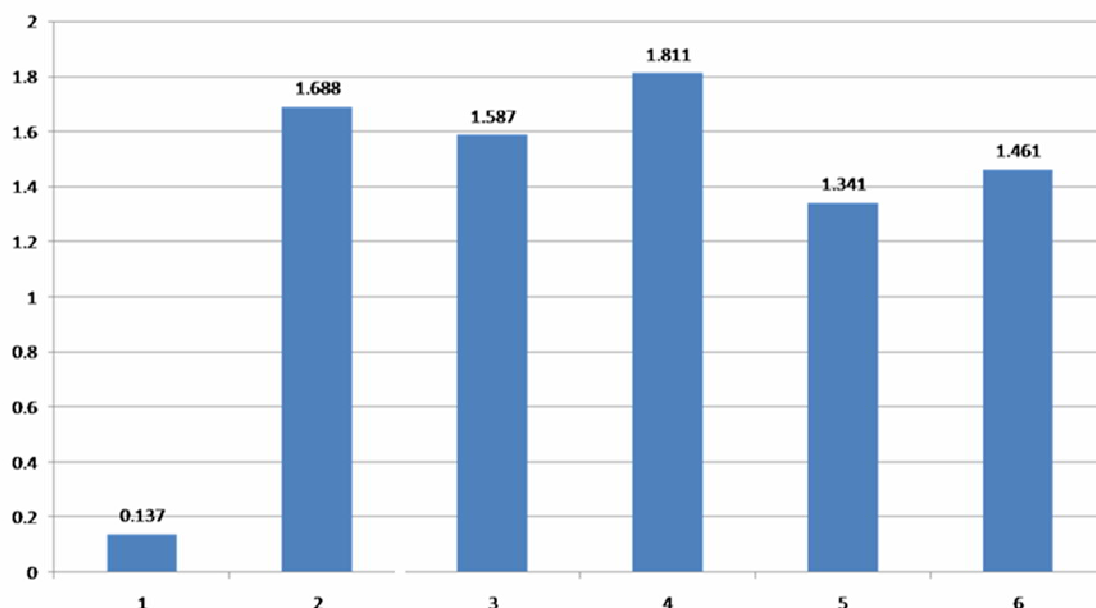
مهار تشکیل بیوفیلم: غلظت نوری (OD) بیوفیلم سودوموناس آئروژینوزا در طول موج 492nm برابر 1/688 بود. فاژ خالص، OD را تا به 1/587 کاهش داد، در حالیکه در رقت 10-1 نه تنها کاهش رویه نشد، بلکه افزایش اندکی نیز رخ داد. (شکل 1-1) رقت های 10-2 و 10-3 به ترتیب OD را به 1/341 و 1/461 کاهش دادند. که بیشترین اثر مهاری متعلق به رقت 10-2 بود.

#### مهار تشکیل بیوفیلم:

برای این مرحله رقت های سریالی از سوسپانسیون فازی (10-1 تا 10-3) تهیه شد. حجم یکسانی از باکتری با سوسپانسیون خالص و رقت های تهیه شده فازی، برای 24 ساعت در 37 درجه سانتی گراد به روش میکرو پلیت در پلیت 96 خانه ی الایزا انکوبه شد. بعد از 24 ساعت شستشو و فیکساسیون با اسید استیک و متانول انجام گرفت و رنگ آمیزی با کریستال ویوله صورت گرفت. غلظت نوری (OD) در طول موج 420nm با دستگاه خوانش الیزا (ELISA reader) ثبت گردید.

#### حذف بیوفیلم:

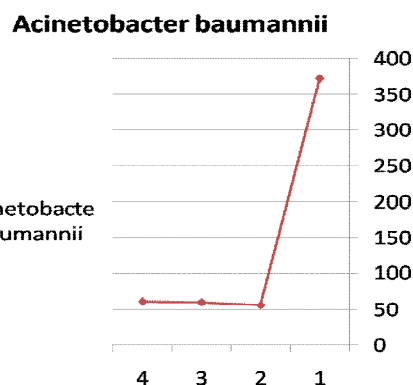
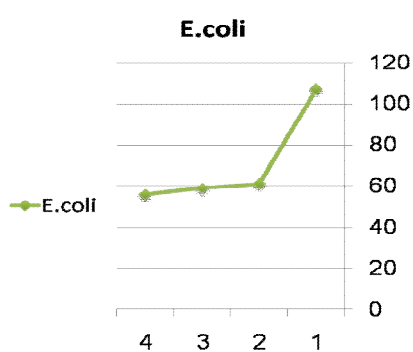
در این مرحله فازهای سودوموناس آئروژینوزا به منظور حذف بیوفیلم مورد استفاده قرار گرفت. بیوفیلم مطابق مطالعه در گذشته [11] با استفاده از گونه های *Pseudomonas putida*, *E.coli*,



شکل 1-1: غلظت نوری (OD) 1. محیط Blank 2. بیوفيلم 3. فاز خالص 4. رقت  $10^{-1}$  5.  $10^{-2}$  6.  $10^{-3}$

کاهش OD به 0/078، 0/062 و 0/067 شدند (شکل 1-2). تاثیر رقت های فازی بر روی E.coli و آسیتوباکتر بومانی بصورت شکل آورده شده است (شکل 1-2).

حذف بیوفيلم: فازهای جدا شده از باکتری سودوموناس آتروژینوزا جهت حذف بیوفيلم استفاده شدند. بیوفيلم سودوموناس پوتیدا دارای غلظت نوری در طول موج 492 nm بود. رقت های استفاده شده فازی  $10^{-1}$ ،  $10^{-2}$  و  $10^{-3}$  به ترتیب باعث



شکل 1-2: غلظت نوری (OD) ; 1. بیوفيلم 2. رقت  $10^{-1}$  3. رقت  $10^{-2}$  4. رقت  $10^{-3}$

## بحث و نتیجه گیری

فاژها مشخصا قادر به کاهش جمعیت باکتریایی در فرم پلانکتونیک و بیوفیلم هستند بنابراین از آن ها می توان به عنوان ابزاری برای جلوگیری و حذف بیوفیلم استفاده کرد [12]. نتایج این مطالعه بیانگر آن است که فاژهای سودوموناس آئروژینوزا قادر به کاهش OD بیوفیلم باکتری های E.coli، سودوموناس آئروژینوزا و آسیتتوباکتر بومانی می باشند.

این پدیده را می توان به عملکرد پروتئولیتیک پروتئین های فاژی نسبت داد که قادر به حذف آگروپلی ساکارید (EPS) بیوفیلم هستند و بر خلاف خود فاژها اختصاصی عمل نمی کنند. همچنین نتایج این تحقیق نشان داد که فاژها در رقت های خاصی دارای بهترین عملکرد هستند که دلیل این امر می تواند تمایل

اتصال متفاوت فاژها در رقت های مختلف برای رسپتور خود می باشد. در رقت های پائین سرعت رشد باکتری باعث می شود نسبت تعداد باکتری به فاژ در واحد زمان بیشتر گردد و فاژها قادر به حذف تمامی باکتری ها نخواهند بود. اما در خصوص غلظت های بالای فاژی به نوعی می توان گفت که رقابت فاژها برای اتصال به باکتری باعث ناکارآمدی فاژها می گردد [13, 14].

## سپاسگزاری

نویسندگان بدین وسیله از پروفسور Andrew M. Kropinski در آزمایشگاه بیماریهای مشترک انسان و حیوان منتقله از راه غذا کانادا و دکتر Marine Henry از بخش میکروب شناسی انستیتو پاستور فرانسه تشکر و قدردانی به عمل می آید.

## References

- 1-Mah TF, PittsB, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'TooleGA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature* 2003;426:306-10.
- 2-Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs* 2007;67: 351-68.
- 3-Lambert PA. Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *J R Soc Med* 2002;95: 22-6.
- 4-Cunha BA. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. *Semin Respir Infect* 2002; 17.
- 5-Stewart PS, William Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.
- 6-Azaredo J, Sutherland IW. The use of phages for the Removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 2008;9:261-6.
- 7-Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 2002;8:881-90.
- 8-[8] O'Toole G, Kaplan H, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:49-79.
- 9-Joerger RD. Alternatives to antibiotics: bacteriocins, antimicrobial peptides and bacteriophages. *Poult Sci* 2003;82:640-7.
- 10-Martha RJ, Clokie AMK. Bacteriophages methods and protocols. *Isol Charact Inter* 2009;1:11-14.
- 11-Christensen WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 1985;22:996-1006.
- 12-Matsuzaki S, Rashel M, Sakurai S, Ujihara T, Kuroda M, Ikeuchi M, et al. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infectious diseases. *J Infect Chemother* 2005;11:211-9.
- 13-Petar Knezevic ea. A colorimetric microtiter plate method for assessment of phage effect on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *J Microbiol Meth* 2008;74:114-8.
- 14-Bradley DE. Basic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* pilus-dependent bacteriophage with a long noncontractile tail. *J Virol* 1973:1139-48.

## Bacteriophage as a Novel Approach to Inhibit and Remove Biofilms

Azizian R<sup>1,2</sup>, Azizi Jalilian F<sup>3</sup>, Askari H<sup>1,2</sup>, Naser A<sup>1,2</sup>, Karimi S<sup>2</sup>,  
Sadeghi FardN<sup>2</sup>, Mousavi NasabS.D<sup>4</sup>; Ahmadi N.A<sup>5</sup>

(Received:            Accepted: )

### Abstract

**Introduction:** Pseudomonas aeruginosa (P. aeruginosa) is a ubiquitous organism which has emerged as a major threat in the hospital setting. Overuse of antibiotics has also significantly increased the emergence of multi-drug resistant bacteria. P. aeruginosa has an innate ability to adhere to the surfaces and form virulent biofilms. Bacteriophages may be as potential agents for resolving of the problem. In this study, P.aeruginosaphage was explored to prevent and remove the biofilms.

**Material and Method:** After isolation of the phages and preparation of serial dilution, the biofilm formation by using of the microplate method was examined. Furthermore, the effects of isolated phages on the biofilms of Pseudomonas putida, Acinetobacter baumannii and Escherichia coli were also assessed.

**Findings:** P.aeruginosa biofilm had OD=1.688 at wave length 492 nanometer. Pure phage suspension and the serial diluted 10-2 and 10-3 of the suspension had ODs 1.587, 1.341 and 1.461, respectively. Isolated phage dramatically declined the ODs of the biofilms of all bacteria strains.

**Discussion & Conclusion:** Phages have various affinities to attach to hosts; thereby it is supposed that the phages compete for their receptors. Also, it is assumed that phages have most efficiency in optimum concentration to remove biofilm or inhibit the growth of bacteria. Our findings demonstrated phages have significant effect on various bacteria and they could be used to remove different bacterial strains.

**Key word:** Bacteriophage; Pseudomonas aeruginosa; Biofilm

1. Student Research Committee, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

2. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

3. Clinical Microbiology Research Center, Ilam University of Medical Sciences, Ilam, Iran

4. Dept of Virology, Faculty of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

5. Proteomics Research Center, Faculty of Paramedical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\*(corresponding author)