

## Anti-biofilm effects of bacteriocin-like compounds produced by *Bacillus subtilis* SP1 isolated from Sablan honey

Maryam Khalili Samani<sup>1</sup>, Zahra Noormohammadi<sup>2</sup>, Mohammad Reza Fazeli<sup>3</sup>, Nasrin Samadi<sup>4</sup>

<sup>1</sup> PhD in Microbiology, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Professor of Genetics, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Professor of Microbiology, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Associate Professor of Pharmaceutics, Department of Drug and Food Control, Faculty of Pharmacy; and Pharmaceutical Quality Assurance Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

### Abstract

**Background:** Biofilms are communities of microorganisms which are difficult and complicated to treat with antimicrobial agents. Therefore, there is a need to use new compounds to treat these types of resistant microorganisms. This study was done with the aim of finding an effective compound for inhibition of biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, and *Staphylococcus aureus*.

**Materials and methods:** The effect of bacteriocin-like compounds produced by *B. subtilis* SP1 isolated from Sablan native honey on the biofilm of four bacterial strains including *E. coli*, *P. aeruginosa*, *St. mutans* and *S. aureus* was investigated by using 96-well microtiter plate and crystal violet staining.

**Results:** The percentage of anti-biofilm effect against *S. mutans* and *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* at 80 µg/ml of bacteriocin like compounds were about 80, 62, 50, and 15 percent, respectively. The antibiofilm effect was concentration dependent and reduced at lower concentrations of bacteriocin like compounds.

**Conclusion:** The highest percentage of anti-biofilm effect of bacteriocin like compounds was observed against *S. mutans* and the lowest percentage of inhibition was against *P. aeruginosa*.

**Keywords:** Biofilm, *Bacillus subtilis*, Bacteriocin.

**Cited as:** Khalili Samani M, Noormohammadi Z, Fazeli MR, Samadi N. Anti-biofilm effects of bacteriocin-like compounds produced by *Bacillus subtilis* SP1 isolated from Sablan hone. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2024; 34(3): 237-244.

**Correspondence to:** Nasrin Samadi

**Tel:** +98 2164122154

**E-mail:** samadin@tums.ac.ir

**ORCID ID:** 0000-0001-6036-6272

**Received:** 3 Dec 2023; **Accepted:** 13 Mar 2024

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی  
دوره ۳۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۳، صفحات ۲۳۷ تا ۲۴۴

## بررسی اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس SP1 جدا شده از عسل سبلان

مریم خلیلی سامانی<sup>۱</sup>، زهرا نورمحمدی<sup>۲</sup>، محمد رضا فاضلی<sup>۳</sup>، نسرین صمدی<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دکتری میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۲</sup> استاذ ژنتیک، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

<sup>۳</sup> استاذ میکروبیولوژی، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

<sup>۴</sup> دانشیار فارماسیوتیکس، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** فرایند درمان عفونت‌های ناشی از باکتری‌های مولد بیوفیلم سخت و پیچیده است و نیاز به استفاده از ترکیباتی جدید برای درمان این نوع عفونت‌ها وجود دارد. این پژوهش با هدف بررسی ترکیبی موثر برای مهار بیوفیلم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلا، استرپتوکوکوس موتانس و استافیلوکوکوس اورئوس انجام شد.

**روش بررسی:** در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس SP1 جدا شده از عسل سبلان جهت مهار بیوفیلم حاصل از باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا، اشرشیاکلا، استرپتوکوکوس موتانس و استافیلوکوکوس اورئوس با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه و رنگ آمیزی با کریستال ویوله بررسی شد.

**یافته‌ها:** درصد خاصیت ضد بیوفیلمی این ترکیبات در برابر *S. aureus*، *E. coli* و *P. aeruginosa* در غلظت  $80 \mu\text{g/ml}$  به ترتیب معادل ۸۰، ۶۲، ۵۰ و ۱۵ بود. این درصد برای *S. mutans* در غلظت  $0.009 \mu\text{g/ml}$  به ۲٪ و برای *S. aureus* در غلظت  $0.156 \mu\text{g/ml}$  به ۵٪ رسید. برای *E. coli* و *P. aeruginosa* در همین غلظت به ترتیب به ۲٪ و ۱٪ کاهش یافت.

**نتیجه‌گیری:** بیشترین درصد خاصیت ضد بیوفیلمی در برابر *S. mutans* و کمترین درصد در برابر *P. aeruginosa* مشاهده شد.

**واژگان کلیدی:** بیوفیلم، باسیلوس سوبتیلیس، باکتریوسین.

### مقدمه

عامل ایجاد کننده بیماری‌های مزمن و یا آزاد کننده مواد مضر و سموم باشند (۱). از جمله عفونت‌های به وجود آمده توسط بیوفیلم‌ها می‌توان به عفونت‌های واژن، دستگاه ادراری، گوش میانی و پلاک دندان اشاره کرد (۲).

تشکیل بیوفیلم در چند مرحله صورت می‌گیرد: ۱- اتصال اولیه که در عرض چند ثانیه و توسط نیروهای واندروالس صورت می‌گیرد و برگشت پذیر است. پیلی و ملکول‌های چسبنده در این اتصال نقش دارند. ۲- مرحله اتصال غیر قابل برگشت که حرکت سلول‌ها کم شده و تجمع باکتری‌ها و تولید آگزوپلی ساکارید خارجی رخ می‌دهد. ۳- افزایش ضخامت ساختار بیوفیلم تا ۱۰ میلی متر توام با اتصال و تجمع باکتری‌ها (در این مرحله تشکیل بیوفیلم کامل شده است). ۴- در آخرین

بیوفیلم‌ها ساختارهای پیچیده‌ای هستند که توسط میکروارگانیسم‌های مختلف بر روی انواع سطوح از جمله بافتهای زنده، دستگاه‌های پزشکی، لوله کشی‌های آب آشامیدنی و... قابلیت تشکیل دارند. لازم به ذکر است که میکروارگانیسم‌های تشکیل دهنده بیوفیلم متنوع و شامل انواع بیماری‌زا و غیر بیماری‌زا هستند. عوامل بیماری‌زا می‌توانند

آدرس نویسنده مسئول: تهران، گروه کنترل دارو و غذا، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات تضمین کیفیت دارو، دانشگاه علوم پزشکی تهران، نسرین صمدی (email: samadin@tums.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0001-6036-6272

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۹/۱۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۲/۲۲

مرحله تولید سلول‌های دختر و جدا شدن آنها از ساختار بیوفیلیم رخ می‌دهد (مرحله حرکت موقت).

میکرو ارگانسیم‌های موجود در بیوفیلیم به سطوح چسبیده و در بین آنها تقسیم کار صورت می‌گیرد و قابلیت متابولیکی جامعه سلولی در سطح مطلوبی افزایش می‌یابد. در ادامه می‌توان گفت کلونیزاسیون راحت‌تر صورت می‌گیرد و این ساختار در برابر جریان خون و ادرار و... پابرجا باقی مانده و باکتری‌های بیوفیلیم از دسترس سیستم ایمنی بیمار، مانند فاگوسیتوز در امان می‌مانند و به دنبال آن افزایش ویرولانسی رخ می‌دهد (۳). ساختار بیوفیلیم، باکتری را در برابر تنش‌های محیطی حفاظت می‌کند، به گونه‌ای که سبب می‌گردد تا ترکیبات ضد میکروبی متداول، تأثیر معنی‌داری بر روی آنها نداشته باشند (۴). اصولاً باکتری‌ها با تشکیل بیوفیلیم می‌توانند در برابر عوامل ضد میکروبی سیستم ایمنی میزبان مقاومت کنند و شرایط فیزیکی و شیمیایی مناسب برای رشد خود را ایجاد کنند و این امر مقاومت بیوفیلیم‌ها را در شرایط نامساعد را افزایش می‌دهد. در ضمن روابط همیاری بین باکتری‌ها و بیوفیلیم در مقاومت آنها در مقابل شرایط نامساعد مؤثر است (۲).

اشرشیا کلی شایع‌ترین و مهم‌ترین جنس در خانواده انتروباکتریاسه است که در پزشکی اهمیت دارد. این باکتری قابلیت تشکیل بیوفیلیم را دارد. باکتری بی‌هوازی اختیاری و بخشی از فلور روده در انسان و حیوانات خونگرم است. برخی از سویه‌های این باکتری سبب ایجاد بیماری‌هایی مانند پنومونی، گاستروانتریت، عفونت‌های ادراری تناسلی و سپتی سمی می‌شوند (۵).

سودوموناس آئروژینوزا، باسیل گرم منفی و هوازی اجباری است و به راحتی بر روی انواع مختلفی از محیط‌های کشت رشد می‌کند. برخی از سویه‌های این باکتری خون را همولیز می‌کنند. سودوموناس آئروژینوزا کلنی‌هایی صاف و گرد همراه با فلورسانس سبز ایجاد می‌کنند. این باکتری به شکل گسترده‌ای در طبیعت پراکنده شده و به طور معمول در محیط‌های مرطوب بیمارستانی یافت می‌شود. بیوفیلیم‌های ایجاد شده توسط اشرشیاکلاهی و سودوموناس آئروژینوزا مشکلات شدیدی در بیماران مبتلا به سیستمیک فیبروزیس ایجاد می‌کنند (۶).

استافیلوکوکوس اورئوس یکی از عوامل اصلی مولد عفونت‌های بیمارستانی، به خصوص بیماری‌هایی از قبیل پنومونی و عفونت جریان خون بوده و هم چنین به عنوان یک عامل ایجاد کننده عفونت‌های اکتسابی جامعه مطرح است (۵). یکی از عوامل موثر در بیماری‌زایی این باکتری تشکیل بیوفیلیم است. محققین نشان داده‌اند که مرحله اول در عفونت‌زایی

استافیلوکوکوس اورئوس اتصال این باکتری به سطوحی از قبیل ابزارهای پزشکی، بافت‌های میزبان و غیره است که به ترکیبی از عوامل خارج سلولی مانند توانایی اتصال و تشکیل بیوفیلیم نسبت داده می‌شود (۷).

استرپتوکوک موتانس دسته‌ای از استرپتوکوک‌ها هستند که در رده باکتریهای اسیدوژنیک قرار می‌گیرند (۲). حضور آنها در محیط دهان به وجود دندان‌ها وابسته است، به طوری که بعد از درآمدن دندان‌های پیشین و همراه با رویش دندان‌های مولر از دهان شیرخواران قابل جداسازی است. بنابراین تثبیت اولیه آن طی ۴-۱ سال اولیه زندگی رخ می‌دهد که منشا آن نیز معمولاً بزاق مادر است (۸).

بیوفیلیم‌ها با عوامل ضد باکتریایی مثل ضد عفونی کننده‌ها، حرارت و خشک کردن از بین نمی‌روند و بر روی سطح باقی می‌مانند، و به خصوص در بیمارستان‌ها سبب آلودگی و انتقال بیماری‌های عفونی می‌گردند و به طور فیزیکی از باکتری‌ها در برابر سیستم ایمنی میزبان و آنتی بیوتیک‌ها محافظت می‌کنند؛ این پدیده یکی از علل عود بیماری‌های عفونی می‌باشد (۹). با توجه به اهمیت بیوفیلیم، پژوهش جهت یافتن یک روش ساده و موثر برای کنترل آنها می‌تواند بسیار مفید و کاربردی باشد. یکی از مواد بیولوژیک دارای خاصیت ضد بیوفیلیمی، باکتریوسین‌ها و ترکیبات شبه باکتریوسینی هستند (۱۰). این عوامل ضد میکروبی طبیعی توسط باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی سنتز می‌شوند. این ماکرو ملکول‌های پروتئینی یا پپتیدی خارج سلولی توسط گونه‌های مختلف باکتری تولید می‌شوند و تأثیرات کشندگی روی باکتری‌های مشابه یا نزدیک دارند. این ترکیبات در مقابل حرارت، pH پایین، حلال‌های آلی ضعیف، سرما، نمک‌ها و آنزیم‌ها مقاوم هستند. باکتریوسین‌ها بر خلاف آنتی بیوتیک‌ها متابولیت اولیه هستند و mRNA رونویسی شده از ژن آنها در ریبوزوم‌های باکتری به پروتئین ترجمه می‌شود (۱۱). این مواد بر خلاف آنتی بیوتیک‌ها که اغلب وسیع الطیف هستند، طیف اثر محدودی دارند. باکتریوسین‌ها با ایجاد منفذ و گاهی ایجاد اختلال در سنتز دیواره سلولی رشد باکتری‌های هدف را مهار می‌کنند، اما آنتی بیوتیک‌ها بر روی عملکرد غشا، دیواره سلولی، ارگانل‌های درون سلولی و یا ژنوم باکتریایی اثر می‌کنند (۱۲). باکتری‌های تولید کننده باکتریوسین‌ها به طور معمول در محیط زندگی ما و بدن موجودات زنده وجود دارند و این مواد را تولید می‌کنند که سمیتی برای بدن انسان ندارند، اما آنتی بیوتیک‌ها تنها برای درمان و یا پیش‌گیری از بیماری‌ها استفاده می‌شوند و می‌توانند موجب سمیت شوند (۱۳).

در این مطالعه، اثر مهارى ترکیبات شبه باکتریوسینی مشتق شده از باکتری باسیلوس سوبتیلیس ایزوله شده از عسل بومی منطقه سیلان ایران بر روی بیوفیلیم باکتری‌های سودوموناس آئروژینوزا و اشرشیاکلای و استرپتوکوکوس موتانس و استافیلوکوکوس اورئوس بررسی شد.

## مواد و روشها

### تولید ترکیبات شبه باکتریوسین

برای تولید این ترکیبات از باکتری باسیلوس سوبتیلیس SPI که از عسل بومی سیلان ایزوله شده است، استفاده شد. این باکتری در پایگاه NCBI با کد MN055979 ثبت شده است. ترکیبات شبه باکتریوسینی تولید شده توسط این باکتری، مقاوم به دما و سوپرناتانت آن دارای pH خنثی است. این باکتری که به صورت ذخیره در دمای ۷۰- درجه سانتی‌گراد در گروه کنترل دارو و غذای دانشکده دارو سازی دانشگاه علوم پزشکی تهران نگهداری می‌شود، بر روی پلیت BHI (Brain heart infusion agar) آگار کشت داده شد. در مرحله بعد این کشت ۲۴ ساعته به ۵۰ میلی لیتر محیط کشت BHI Broth منتقل شد. بعد از ۱۹ ساعت، یک میلی لیتر از این محیط مایع که دارای جذب نوری معادل ۱/۵- در طول موج ۶۰۰ نانومتر بود، به ۱۰۰ میلی لیتر محیط BHI برات منتقل و در آنکوباتور شیکر دار به مدت ۲۳ ساعت قرار داده شد. محیط کشت حاوی باکتری تولید کننده باکتریوسین، بعد از ۲۳ ساعت با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. مایع رویی (سوپرناتانت) جدا شد و جهت جلوگیری از هرگونه آلودگی احتمالی با استفاده از فیلتر میلی پور ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. در مرحله بعد به علت اینکه pH سوپرناتانت در محدوده خنثی بود، نیازی به تنظیم pH در این محدوده نبود (۱۴).

### خنثی کردن سوپرناتانت با آنزیم کاتالاز

با توجه به اینکه این باکتری کاتالاز مثبت است، جهت اطمینان از عدم حضور پراکسید هیدروژن، مایع رویی تحت تیمار با آنزیم کاتالاز قرار گرفت. بدین ترتیب که ۱ mg/ml از آنزیم به حجم مشخص از مایع رویی حاوی ترکیبات شبه باکتریوسینی افزوده شد و بعد از ۵ ساعت نگهداری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اثر ضد میکروبی پراکسید هیدروژن خنثی شد (۱۵).

### حضور ترکیبات شبه باکتریوسین

برای بررسی ارتباط اثر ضد میکروبی مایع رویی جدا شده به حضور ترکیبات شبه باکتریوسین، باید ماهیت پپتیدی این عوامل ضد میکروبی اثبات شود. برای نیل به این هدف اثر آنزیم‌های

پروتئولیتیک شامل پروتئیناز K، تریپسین و ویپسین بر فعالیت ضد میکروبی مایع رویی جدا شده بررسی شد.

محلول آنزیم های پروتئیناز K و تریپسین در بافر فسفات ۰/۱۴ مولار (pH 7) و آنزیم پپسین در اسید هیدروکلریک ۰/۰۲۵ مولار (pH 2) تهیه شد. محلول آنزیم‌های تهیه شده به مایع رویی جدا شده از باکتری‌ها به صورت جداگانه افزوده شد، در نهایت غلظت آنزیم معادل ۱ میلی گرم در میلی لیتر بود. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس جهت غیر فعال سازی آنزیم‌ها ۳ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفتند. اثر ضد میکروبی آنها با استفاده از روش AWDA (Agar well diffusion assay) با استفاده از محیط مولر هینتون آگار و در مقابل باکتری *Kocuria rhizophila* ATCC 9341 تعیین شد. بافر فسفات و اسید هیدروکلریک به عنوان شاهد در این روش به کار رفتند (۱۶).

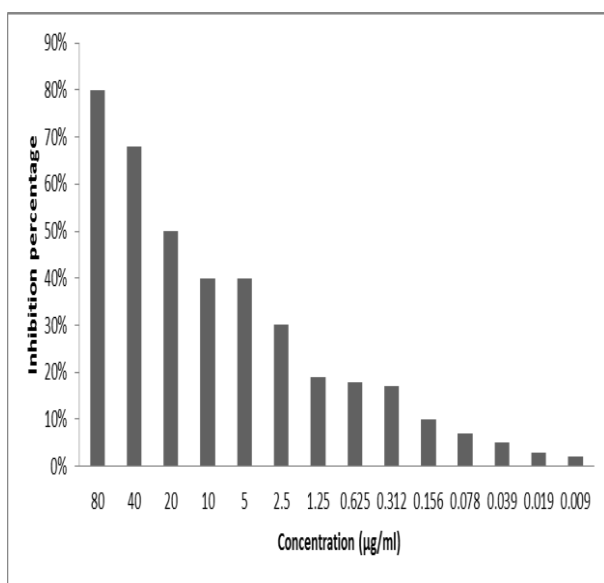
### تعیین غلظت

از روش براد فورد برای تعیین غلظت ترکیبات شبه باکتریوسین با استفاده از اسپکتروفتومتر استفاده شد. آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان استاندارد استفاده شد. محلول ذخیره BSA با حل کردن ۱ میلی گرم BSA در ۱ میلی لیتر آب مقطر تهیه شد. غلظت های متفاوتی از BSA برای منحنی استاندارد، تهیه شد. از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر خوانده شد و با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده برای BSA، غلظت ترکیبات شبه باکتریوسینی بدست آمد. در این مرحله از محیط کشت BHI برات به عنوان بلانک استفاده شد. علت این امر تولید این ترکیبات شبه باکتریوسین در این محیط کشت بود (۱۷).

### اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسین به روش میکروتیتر پلیت

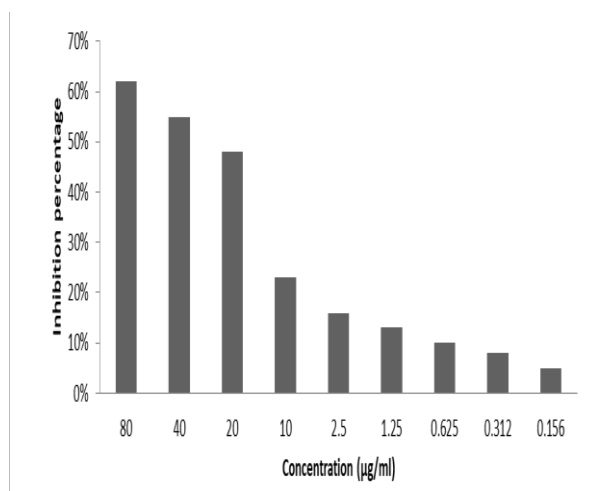
برای این منظور از ۴ سویه باکتریایی *Streptococcus mutans* ATCC 5668، *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027، *Escherichia coli* ATCC 6538، *Staphylococcus aureus* ATCC 8739 استفاده شد. باکتری های یاد شده تا رسیدن به غلظت نیم مک فارلند در محیط کشت کازوبرات کشت داده شدند و سپس جهت رسیدن به غلظت معادل  $1.8 \times 10^6$  CFU/ml با محیط کشت مناسب برای تشکیل بیوفیلیم رقیق شدند. برای تشکیل بیوفیلیم *P. aeruginosa* و *E. coli* از محیط کشت M63 و برای *S. mutans* محیط کشت BHI با ۲ درصد (w/v) سوکروز و برای *S. aureus* محیط کشت TSB با ۰/۲۵ درصد (w/v) گلوکز استفاده شد.

چاهک چهاردهم با غلظت معادل  $0.009 \mu\text{g/ml}$  بسیار ناچیز شده و به ۲٪ رسیده است.



نمودار ۱. اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر *S. mutans*

در نمودار شماره ۲ اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات باکتریوسینی در برابر *S. aureus* در غلظت  $80 \mu\text{g/ml}$  برابر با ۶۲٪ است و در غلظت  $0.009 \mu\text{g/ml}$  به ۵٪ می‌رسد.



نمودار ۲. اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر *S. aureus*

در نمودار ۳ اثر ضد بیوفیلمی این ترکیبات بر علیه *E. coli* در غلظت معادل  $80 \mu\text{g/ml}$  برابر با ۵۰٪ است و در غلظت‌های کمتر سیر نزولی دارد و در نهایت در غلظت  $0.009 \mu\text{g/ml}$  به ۲٪ می‌رسد.

۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون میکروبی در داخل هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از این مرحله باکتری‌هایی که به دیواره میکروپلیت اتصال پیدا نکرده بودند خالی و محیط کشت تازه حاوی رقت‌های مختلف ترکیبات شبه باکتریوسینی اضافه و دوباره به مدت ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری شد. بعد از ۲۴ ساعت سلول‌هایی که نجسبیده بودند با شستشوی بافر فسفات جدا شدند. سلول‌های چسبیده شده با رنگ آمیزی کریستال ویوله مشخص شدند. به این ترتیب که ابتدا به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تثبیت شدند. سپس متانول خالی شده و ۲۰۰ میکرولیتر محلول کریستال ویوله اضافه شد، بعد از ۵ دقیقه رنگ اضافی خالی شده و پلیت با آب جاری شسته شد و در معرض هوا قرار گرفت تا خشک شود. رنگ جذب شده توسط میکروارگانیسم‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ۳۳٪ حل شد و جذب چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب نوری محیط کشت فاقد باکتریوسین به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد (۱۰).

برای محاسبه درصد مهار تشکیل بیوفیلم برای هر میکروارگانیسم از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{Percentage inhibition} = [1 - (\text{A sample} / \text{A control})] \times 100$$

## یافته‌ها

### تولید و تعیین مقدار ترکیبات شبه باکتریوسین

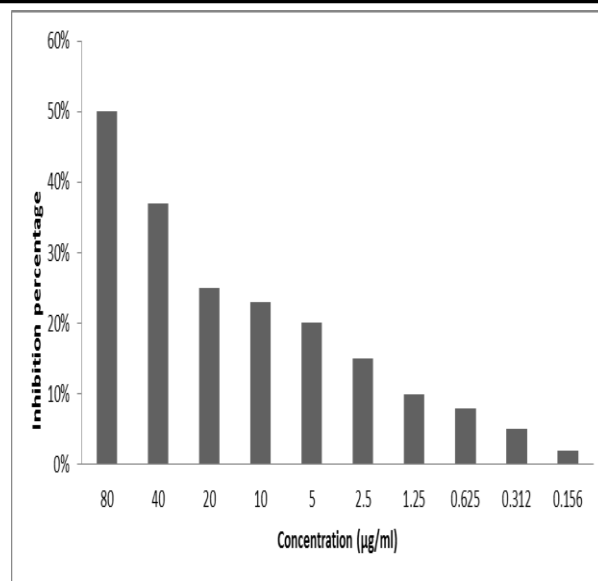
بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون، سوپرناتانت عاری از هر نوع میکروارگانیسم احتمالی که آنزیم کاتالاز آن خنثی شده است، برای بررسی اثبات حضور ترکیبات شبه باکتریوسین استفاده شد. با تیمار توسط پروتئیناز K، تریپسین و پپسین اثر ضد میکروبی سوپرناتانت از بین رفت و در آزمون AWDA هاله عدم رشد مشاهده نشد که این امر خود تاییدی بر ماهیت پپتیدی این ترکیبات است. با استفاده از روش برادفورد غلظت ترکیبات شبه باکتریوسینی معادل  $80 \mu\text{g/ml}$  محاسبه شد.

### مهار تشکیل بیوفیلم

برای هر باکتری اثر ضد بیوفیلمی به صورت ۳ بار تکرار در رقت‌های متوالی ترکیبات شبه باکتریوسین بررسی شد. در ارتباط با باکتری *S. mutans* برای بررسی خاصیت ضد بیوفیلمی همان‌طور که در نمودار ۱ مشاهده می‌شود، در غلظت  $80 \mu\text{g/ml}$  میزان مهار تشکیل بیوفیلم معادل ۸۰٪ است که به تدریج درصد مهار کنندگی کمتر شده تا در

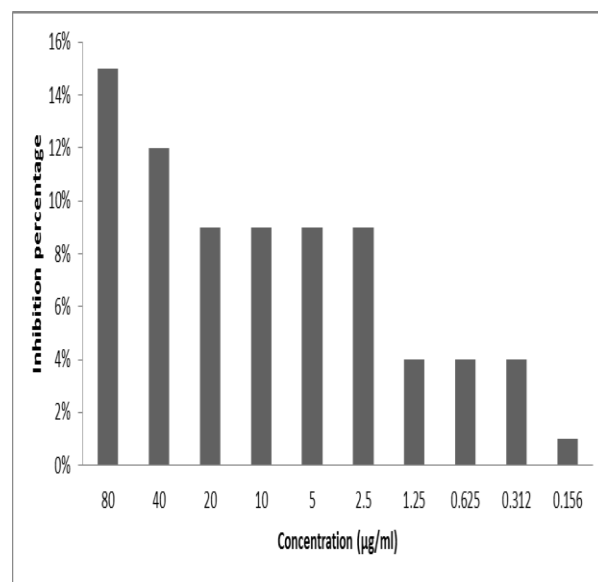
به صورت یک معضل مطرح هستند و سالانه هزینه‌های بسیار زیادی برای پژوهش در زمینه از بین بردن و جلوگیری از تشکیل بیوفیلم‌ها اختصاص داده می‌شود. در نتیجه، تحقیقات فراوانی به مبحث بیوفیلم‌ها که عمدتاً توسط باکتری‌های گوناگون تولید می‌شوند، می‌پردازند (۱۸). عسل دارای اثرات ضد باکتریایی و ضد بیوفیلم است. بنابراین، عسل این پتانسیل را دارد که به عنوان یک آنتی بیوفیلم و عامل ضد باکتری در کاربردهای مختلف از جمله در پیشگیری از پوسیدگی دندان و عفونت زخم استفاده شود. یکی از موادی که در عسل این خواص را دارد، پپتیدهایی تحت عنوان باکتریوسین است که توسط باکتری‌های مفید موجود در عسل تولید می‌شود (۱۹)، (۲۰).

باکتریوسین‌ها پپتیدها یا پروتئین‌های فعال زیستی هستند که توسط باکتری‌هایی تولید می‌شوند که پتانسیل مهار توسعه بیوفیلم‌ها و مبارزه با عفونت‌های باکتریایی ناشی از بیوفیلم را دارند (۲۱). باکتریوسین‌ها می‌توانند از تشکیل بیوفیلم‌ها جلوگیری کنند و بیوفیلم‌های بالغ و باکتری‌های پلانکتونیک را از بین ببرند (۱۲). مطالعات متعددی اثرات ضد بیوفیلم باکتریوسین‌ها را نشان داده‌اند. به عنوان مثال، یک باکتریوسین تولید شده توسط باسیلوس دریایی سویه Sh10 دارای خواص ضد باکتریایی در برابر سویه‌های بیوفیلم ساز *Proteus mirabilis* است (۱۰). باکتریوسین BMP32 $\tau$  تشکیل بیوفیلم لیستریا مونوسیتوزنز را مهار می‌کند (۲۲). باکتریوسین جدا شده از لاکتوکوکوس لاکتیس سویه CH3 اثرات ضد میکروبی و ضد بیوفیلم قابل توجهی از خود نشان داده است (۲۳). سونورسین، باکتریوسینی متعلق به زیرخانواده هتروسیکلوانتراسین، به طور موثر سلول‌های فعال و غیر تکثیر شونده باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی را از بین می‌برد و فعالیت مهاری قابل توجهی در برابر بیوفیلم استافیلوکوکوس اورئوس نشان داده است (۲۱). آنچه در نتایج مربوط به این مطالعه دیده شد، نشان می‌دهد که باکتریوسین جدید تولید شده توسط باسیلوس سوبتیلیس SPI1 جدا شده از عسل بومی سبلان توانایی قابل توجهی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم سویه‌های گرم‌مثبت و گرم‌منفی مورد آزمون دارد. با توجه به اهمیت این باکتری‌ها در حوزه عفونت بیمارستانی و بیماری‌زایی و تبدیل سریع آنها به سویه‌های مقاوم به درمان، این ترکیبات می‌توانند گام موثری در مهار بیوفیلم این باکتری‌ها داشته باشند. این یافته‌ها نشان می‌دهند که باکتریوسین‌ها پتانسیل امیدوارکننده‌ای به عنوان عوامل آنتی بیوفیلم برای مبارزه با باکتری‌های تشکیل دهنده بیوفیلم



نمودار ۳. اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر *E. coli*

در نمودار ۴ اثر ضد بیوفیلمی در برابر *P. aeruginosa* در غلظت ۸۰ µg/ml معادل ۱۵٪ و در نهایت در غلظت ۰/۱۵۶ µg/ml به ۱٪ می‌رسد. تفاوت درصد مهار بیوفیلم در غلظت ۸۰ µg/ml ترکیبات باکتریوسینی که بیشترین اثر مهاری را نشان داد، در بین باکتری‌های بیماری‌زای مورد آزمون معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).



نمودار ۴. اثر ضد بیوفیلمی ترکیبات شبه باکتریوسینی در برابر *P. aeruginosa*

## بحث

اهمیت بیوفیلم‌ها در جوامع امروزی به حدی است که در حوزه پزشکی و تجهیزات مربوط به آن و همچنین در صنایع غذایی

سمیت کم و دارا بودن هدف اختصاصی پتانسیل خوبی برای استفاده‌های درمانی در انسان دارند. با توجه به اینکه در طبیعت گونه‌های مختلف تولید کننده باکتریوسین را می‌توان یافت، لذا کاربرد درمانی باکتریوسین‌ها می‌تواند بسیار وسیع باشد (۱۲). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که از ترکیبات غیر آنتی بیوتیکی جدید مانند باکتریوسین‌ها به تنهایی یا به صورت ترکیب با عوامل دیگر می‌توان برای غلبه بر مقاومت‌های آنتی بیوتیکی مانند بیوفیلیم‌های باکتریایی استفاده کرد که کاربرد عملی آنها در زمینه‌های درمانی یا آلودگی‌های محیطی و غذایی نیازمند مطالعات بیشتر است.

دارند. توانایی باکتریوسین‌ها در مهار تشکیل بیوفیلیم و مختل کردن بیوفیلیم‌های بالغ، آنها را به یک جایگزین بالقوه برای آنتی بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های فعلی در کاربردهای مختلف، از جمله نگهداری مواد غذایی و درمان‌های پزشکی تبدیل می‌کند.

امروزه پزشکی مدرن، در مواجهه با باکتری‌های بیماری‌زای مقاوم به آنتی بیوتیک با افزایش مشکلات جدی روبرو شده است. از طرف دیگر، اثرات نامطلوب نسل جدید آنتی بیوتیک‌ها و خاصیت سمیت بالا آنها سبب شده که روش‌های جایگزین مورد بررسی قرار گیرند. باکتریوسین‌ها به دلیل

## REFERENCES

- Chen C, Chen Y, Wu P, Chen B. Update on new medicinal applications of gentamicin: Evidence-based review. J Formos Med Assoc 2014;113:72–82.
- Hamzeie M, Nomanpour B, Akhavansepahy A. The effect of bromhexine, gentamicin and imipenem on biofilm of standard bacterial *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by ELISA method. Med Sci J 2019;29:216–21.
- Kafil HS, Mobarez AM. Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. Journal of King Saud University - Science 2015;27:312–7.
- Lu Q, Yu J, Yang X, Wang J, Wang L, Lin Y, et al. Ambroxol interferes with *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing. Int J Antimicrob Agents 2010;36:211–5.
- Bekoe A, Azorliade R, Ablordey A, Addo MG. Microbial Profile and Antibiotic Resistance Pattern of Urine and Biofilm Pathogens Isolated from Catheterized Patients at Komfo Anokye Teaching Hospital, Kumasi, Ghana. J Biosci Med 2021;09:1–13.
- Fennell Y, Ymele-Leki P, Azeezat Adegboye T, Jones KL. Impact of Sulfidation of Silver Nanoparticles on Established *P. aeruginosa* Biofilm. J Biomater Nanobiotechnol 2017;08:83–95.
- Abdulrahim U, Kachallah M, Rabiou M, Usman NA, Adeshina GO, Olayinka BO. Molecular Detection of Biofilm-Producing *Staphylococcus aureus* Isolates from National Orthopaedic Hospital Dala, Kano State, Nigeria. Open J Med Microbiol 2019;09:116–26.
- Marchand S, De Block J, De Jonghe V, Coorevits A, Heyndrickx M, Herman L. Biofilm Formation in Milk Production and Processing Environments; Influence on Milk Quality and Safety. Compr Rev Food Sci Food Saf 2012;11:133–47.
- Gholap H, Gholap A, Patil R. ZnO/CdS Nanocomposite: An Anti-Microbial and Anti-Biofilm Agent. Adv Microbiol 2020;10:166–79.
- Shayesteh F, Ahmad A, Usup G. In vitro anti-biofilm activity of bacteriocin from a marine bacillus sp. Strain sh10 against proteus mirabilis. Iran J Microb 2020; 12.
- Ansari A, Aman A, Siddiqui NN, Iqbal S, Ul Qader SA. Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *Bacillus subtilis* KIBGE IB-17. Pak J Pharm Sci 2012;25:195–201.
- Gradisteanu Pircalabioru G, Popa LI, Marutescu L, Gheorghe I, Popa M, Czobor Barbu I, et al. Bacteriocins in the era of antibiotic resistance: rising to the challenge. Pharmaceutics 2021;13:1–15.
- Darbandi A, Asadi A, Mahdizade Ari M, Ohadi E, Talebi M, Halaj Zadeh M, et al. Bacteriocins: Properties and potential use as antimicrobials. J Clin Lab Anal 2022;36:1–40.
- Khalili Samani M, Noormohammadi Z, Fazeli MR, Samadi N. Bacteriocin activity of various Iranian honey-associated bacteria and development of a simple medium for enhanced bacteriocin activity. J Environ Heal Sci Eng 2021;19:427–35.
- Taheri P, Samadi N, Reza Ehsani M, Reza Khoshay M, Jamalifar H. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. Brazilian J Microbiol 2012;43:1452–62.
- Abriouel H, Franz CMAP, Omar N Ben, Galvez A. Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. FEMS Microbiol Rev 2011;35:201–32.

17. Ahsan A, Mazhar B, Khan MK, Mustafa M, Hammad M, Ali NM. Bacteriocin-mediated inhibition of some common pathogens by wild and mutant *Lactobacillus* species and in vitro amplification of bacteriocin encoding genes. *ADMET DMPK* 2022;10:75-87.
18. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2017;41:276-301.
19. Deglovic J, Majtanova N, Majtan J. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Honey in the Prevention of Dental Caries: A Recent Perspective. *Foods* 2022;11:2670.
20. Balázs VL, Nagy-Radványi L, Bencsik-Kerekes E, Koloh R, Szabó D, Kocsis B, et al. Antibacterial and Antibiofilm Effect of Unifloral Honeys against Bacteria Isolated from Chronic Wound Infections. *Microorganisms* 2023;11:509.
21. Chopra L, Singh G, Kumar Jena K, Sahoo DK. Sonorensin: A new bacteriocin with potential of an anti-biofilm agent and a food biopreservative. *Sci Rep* 2015;5:13412.
22. Qiao Z, Zhang L, Wang X, Liu B, Shan Y, Yi Y, et al. Antibiofilm Effects of Bacteriocin BMP32r on *Listeria monocytogenes*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2022;14:1067-1076.
23. Krishnamoorthi R, Srinivash M, Mahalingam PU, Malaikozhundan B, Suganya P, Gurushankar K. Antimicrobial, anti-biofilm, antioxidant and cytotoxic effects of bacteriocin by *Lactococcus lactis* strain CH3 isolated from fermented dairy products-An in vitro and in silico approach. *Int J Biol Macromol* 2022;220:291-306.