اثر عوامل ضد میکروبی بر روی سلول های پلانکتونیک و بیوفیلم سویه های استرپتوکوکوس موتانس جدا شده از پلاک های دندانی

فرزانه حسینی[1] - مریم قوام شیرازی[2] - جمیله نوروزی[3]

چکیده

زمینه و هدف: استرپتوکوک های موتانس به خاطر قابلیت سنتز پلیمرهای خارج سلولی و تشکیل بیوفیلم از عوامل مهم ایجاد کننده ی پوسیدگی دندان در انسان هستند. هدف از این مطالعه تشکیل بیوفیلم از سویه های بالینی و استاندارد استرپتوکوکوس موتانز در شرایط آزمایشگاهی و بررسی مقاومت آن ها نسبت به عوامل ضد میکروبی می باشد.

روش تحقیق: در این بررسی از بین سویه های استرپتوکوکوس موتانس جدا شده از پلاگ های دندانی و عفونت های دهان، سویه ای با قابلیت برتر تولید بیوفیلم جهت آزمون عوامل ضد میکروبی انتخاب گردید. بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس در میکروپلیت هایی از جنس پلی استیرن تشکیل گردید. میزان تأثیر مواد ضد میکروبی متداول مانند آنتی بیوتیک های پنی سیلین، اریترومایسین، تتراسایکلین و کلرهگزیدین در زمان های مختلف بر روی تعداد سلول های زنده بیوفیلم مورد ارزیابی قرار گرفت. MIC مواد مورد آزمون برای سلول های پلانکتونیک استرپتوکوکوس موتانس تعیین گردید.

یافته ها: بیشترین اثر باکتریوسایدی بعد از ۵ دقیقه تیمار بیوفیلم در مورد کلرهگزیدین ۰/۲ درصد با ۰/۰۹ mg/ml MIC و کمترین تأثیر در مورد تتراسایکلین با ۰/۳ mg/ml MIC مشاهده گردید. نسبت جذب نوری بیوفیلم سویه ی بالینی به OD بیوفیلم حاوی بیوساید در همان سویه (OD_r) نشان داد که ضخامت بیوفیلم تشکیل یافته در حضور مواد میکروبی مؤثرتر در پایین ترین حد خود قرار دارد. کاهش پایدار در تعداد سلول های زنده بیوفیلم در تیمارهای اریترومایسین و پنی سیلین مشخص بوده است.

نتیجه گیری: این بررسی نشان داد که برای ریشه کن کردن سلول های زنده بیوفیلم به غلظتی بیش از ۵ MIC مواد ضد میکروبی لازم است.

کلید واژه ها: استرپتوکوکوس موتانس؛ بیوفیلم؛ عوامل ضد میکروبی

افق‌دانش؛ فصلنامه ی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد (دوره ی ۱۷؛ شماره ی ۲؛ تابستان ۱۳۹۰)

دریافت: ۱۳۸۹/۳/۱ اصلاح نهایی: ۱۳۹۰/۲/۲۸ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۴

۱- **نویسنده ی مسؤول؛** استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

آدرس: خیابان مکران جنوبی- دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال - گروه میکروبیولوژی- دانشکده ی علوم زیستی

تلفن: ۰۹۱۲۳۴۷۲۴۴۱ **نمابر:** ۰۲۱-۲۲۹۵۰۷۲۳ **پست الکترونیکی:** farzaneh953@yahoo.com

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

۳- استاد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال، گروه میکروبیولوژی، تهران، ایران

مقدمه

استرپتوکوک های ویریدانس عامل اصلی مرگ و میر در رابطه با عفونت خون، شوک و سندرم های تنفسی در بیماران نوتروپنی می باشند و نقش مهمی را در اتیولوژی اندوکاردیت عفونی بازی می کنند (۱). راه ورود آن ها از طریق زخم های مخاطی دستگاه گوارشی و دهان و کاتترهای داخل عروقی است. قابلیت تشکیل بیوفیلم یکی از مشخصات بیماری زایی استرپتوکوک های موتانز در بین سایر استرپتوکوک های ویریدانس است. عفونت های بافت پریودنتال شامل گروه وسیعی از بیماری های دهان و دندان می باشند که در اغلب آن ها پروسه های التهابی لثه و بافت های متصل به دندان مشاهده می گردد. این بیماری ها نتیجه ی تشکیل بیوفیلم پلاگ های میکروبی است. بیوفیلم کمپلکسی مرکب از میکروارگانیسم هایی است که به یکدیگر در روی سطحی متصل شده اند. استرپتوکوکوس موتانس از باکتری های گرم مثبتی است که در دهان به سر می برد و از طریق متابولیزه کردن کربوهیدرات های مختلف محیط اسیدی ایجاد می کند. قابلیت *S. mutans* برای سنتز گلوکان خارج سلولی عامل بیماری زایی اصلی این باکتری ها بوده و عامل ایجاد کننده ی پوسیدگی های دندانی در حیوانات و انسان است (۲).

گلوکان خارج سلولی به خصوص گلوکان نامحلول سنتز شده از سوکروز از طریق گلوکوزیل ترانسفراز با ایجاد امکان اتصال باعث تجمع استرپتوکوک های بومی بر روی سطح دندان ها می شود و با همراهی سایر میکروارگانیسم ها در توسعه ی ماتریکس پلی ساکاریدی خارج سلولی، جرم ایجاد شده به صورت بیوفیلم دندانی تحت عنوان پلاگ دندانی تشکیل می گردد و بوی بدی در دهان ایجاد می کنند (۳).

بیوسایدهای شیمیایی ترکیبات با ارزشی جهت کنترل مکانیکی پلاگ ها برای جلوگیری از پوسیدگی های دندان و بیماری های پریودنتال می باشند (۲,۴,۵). کلرهگزیدین بیوسایدی با ساختمان گوانیدی کاتیونیک با سمیت کم و اثر باکتریوسایدی وسیع الطیف می باشد (۶).

مکانیسم اصلی این بیوساید تخریب غشای سلولی است و می تواند به سطح دندان ها و مخاط دهان متصل شود و با رهایی عوامل فعال منجر به کاهش میزان سلول های باکتریایی زنده ی دهان شود (۹-۷). تأثیر قوی آن بر روی پلاک های دندانی و پیشگیری از ژنژیویت در مطالعات گذشته ثابت شده است (۱۰).

بروز مقاومت نسبت به عوامل بیوساید و همچنین آنتی بیوتیک ها در میان میکروفلور نرمال دهان به خصوص استرپتوکوک های گروه ویریدانس نشان داده شده است (۱۰,۱۱). پنی سیلین و اریترومایسین از داروهای انتخابی برای درمان عفونت های ایجاد شده توسط استرپتوکوک های ویریدانس هستند و این گروه به طرز یکنواختی نسبت به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام حساس هستند (۱۰). اگرچه بروز مقاومت آنتی میکروبی در میان استرپتوکوک های ویریدانس هنوز معضلی برای درمان آنتی بیوتیکی عفونت ها به عنوان مثال اندوکاردیت ها است، گزارش فزاینده ی بروز مقاومت نسبت به عوامل ضد میکروبی بتالاکتام، ماکرولیدها و تتراسایکلین در میان این گروه از باکتری ها، بحرانی جدی در مدیریت درمان را پیش آورده است (۱۰). از آن جایی که بیوفیلم ها می توانند ۱۰۰۰ مرتبه پایداری بیشتری نسبت به عوامل ضد میکروبی داشته باشند و میزان حساسیت باکتری های بیوفیلم نسبت به عوامل ضد میکروبی بسیار کاهش می یابد (۵,۱۲,۱۳)، مطالعاتی در مورد کنترل بیوفیلم به صورت in situ و تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عوامل ضد میکروبی می تواند مفید باشد (۱۴).

الیادس و همکارانش در یک بررسی بیوفیلم *S.mutans* را برروی استیل ضد زنگ تشکیل دادند و به دنبال آن مطالعات زیادی در مورد تشکیل بیوفیلم بر روی براکت های فلزی ارتودنسی، پلاستیک و سرامیک انجام شده است (۱۵,۱۶). در این بررسی در جهت مطالعه ی تأثیر عوامل ضد میکروبی آنتی پلاگ، بیوفیلمی از سویه های *S.mutans* جدا شده از پلاگ های دندانی بر روی سطوح پلی استیرنی تشکیل داده شد و میزان حساسیت سویه ها در شکل بیوفیلم و پلانکتونی نسبت به عوامل بیوساید کلرهگزیدین و آنتی بیوتیک های پنی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین تعیین گردید. تأثیر عوامل ضد میکروبی بر روی تشکیل بیوفیلم از طریق محاسبه ی نسبت جذب نوری

بیوفیلم سویه ی بالینی به جذب نوری بیوفیلم حاوی بیوساید در همان سویه (OD_r) با میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

روش تحقیق

جداسازی و شناسایی سویه ها: در این بررسی تعداد ۳۰ نمونه از پلاگ های فوق لثه ای و ضایعات پوسیدگی دندان افراد مبتلا، با استفاده از سواب استریل برای هر فرد جدا شده و هر کدام در ml ۱ محیط ترانسپورت حاوی PBS در PH=۷/۲ قرار داده شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. هر کدام از نمونه ها برای جداسازی استرپتوکوک های موتانس در محیط جامد[1] بر روی پلیت تلقیح شده و مدت ۷۲ ساعت در ۳۷°C در ۱۰ درصد CO_2 گرماگذاری شد (۱۷). شناسایی بر اساس آزمون های استانداردی مانند شکل کلنی، رنگ آمیزی گرم، فعالیت کاتالازی، رشد در نمک ۶/۵ درصد، هیدرولیز اسکولین، فعالیت هموليتیکی و تجزیه قندهای لاکتوز- مانیتول- سوربیتول- رافینوز- اینولین، بررسی تولید اسید و تشکیل لخته در اثر رشد در محیط لیتموس میلک، تست VP و هیدرولیز اوره انجام پذیرفت (۱۸).

تشکیل بیوفیلم: از تک کلنی های کشت خالص سویه های جدا شده و کنترل (Streptococcus mutans: ATCC۵۶۶۸ PTCC۱۶۸۳) در TYCSB مایع وسپانسیون میکروبی با جذب نوری معادل ۰/۱ برابر با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند (معادل تعداد تقریبی $۱/۵\times۱۰^{۸}$ CFU/ml) در طول موج ۶۵۰ نانومتر برای هر نمونه تنظیم شد. در مرحله ی بعد هر نمونه و سویه ی کنترل به میزان ۱۰۰ میکرولیتر به ۶ چاهک موازی در پلیت میکروتیتر ۹۶ چاهکی پلی استیرن افزوده شد و به عنوان شاهد از محیط مایع TYCSB به همراه ۱ درصد ساکارز در یک ردیف ۶ تایی چاهک استفاده گردید. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷°C گرماگذاری شدند. پس از این مدت محتوی چاهک ها به آرامی تخلیه شده و بافر فسفات پتاسیم ۰/۰۱ مولار ایزوتونیک با سالین PH=۷/۵ استریل به هر چاهک اضافه شد و تخلیه گردید. سپس جهت تثبیت به هر چاهک حدود ۲۰۰ میکرو لیتر متانول خالص افزوده و مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از تخلیه در مرحله ی بعد رنگ کریستال ویوله ۱ درصد (W/V) افزوده شد و مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. بعد از تخلیه ی رنگ و شستشو با آب، اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد حجمی افزوده و با کمک دستگاه الایزا ریدر جذب هر چاهک در طول موج ۵۵۰ نانومتر قرائت گردید (۱۹).

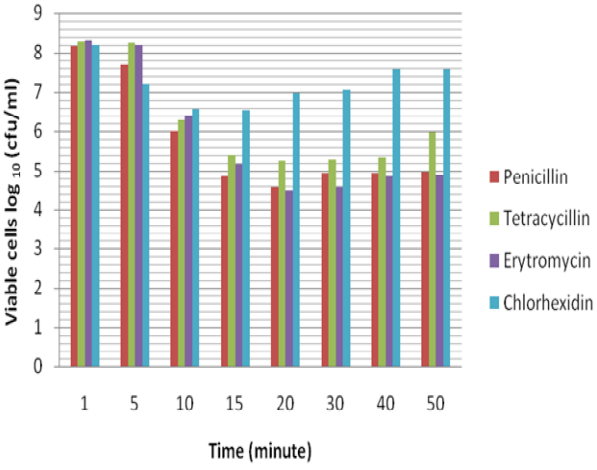
هر آزمون سه بار تکرار شد. محلول کلرهگزیدین ۰/۲ درصد، تتراسایکلین ۲ mg/l، پنی سیلین ۴ mg/l و اریترومایسین ۱ mg/l پودری (Sigma ,Poole, UK) بعد از استریلیزاسیون به طریق فیلتراسیون به میزان ۱۰۰ µl به پلیت ۹۶ چاهکی با بیوفیلم زنده افزوده و به مدت یک ساعت در ۳۵°C گرماگذاری شدند در زمان گرماگذاری و هر ۵ دقیقه یک بار میزان OD و CFU بیوفیلم ها ارزیابی گردید. در هر مورد نسبت OD بیوفیلم سویه ی بالینی به OD بیوفیلم حاوی بیوساید در همان سویه ی بدون بیوساید (کنترل) محاسبه گردید (۲۰). برای تعیین MIC مواد ضد میکروبی برای سلول های پلانکتونیک رقت سریال از مواد مورد آزمون تهیه گردید و سوسپانسیون میکروبی با جذب نوری معادل ۰/۱ به هر لوله اضافه شد. آزمون بر اساس روش مایکرودایلوشن براث پروتکل NCCLS انجام پذیرفت (۲۱). برای تعیین CFU در هر مرحله، در رقت های سریال ۱۰ تایی از لوله های حاوی سلول بعد از ورتکس کردن به میزان ml ۱ به اولین لوله رقت سریال اضافه شد و بعد از ورتکس کردن ml ۱ به لوله ی دوم و به همین ترتیب تا آخرین لوله این کار انجام پذیرفت. از آخرین لوله ml ۱ بیرون ریخته شد و از هر لوله رقت سریال به میزان ml ۰/۱ در پلیت های cm ۱۰ حاوی محیط TYCSA تلقیح شد و بعد از پخش شدن به صورت یکنواخت به مدت یک شب در ۳۵°C گرماگذاری شدند. برای هر لوله سه پلیت حاوی محیط در نظر گرفته شد (۲۲). اختلاف بین داده ها با آنالیز واریانس و آزمون مقایسه ای توکی کرامر با نرم افزار آماری Minitab و رسم نمودارهای توزیع فراوانی با نرم افزار Excel مورد بررسی قرار گرفت.

1- Tryptone-Yeast-Cysteine-Sucrose -Bacitracin Agar (Bacto Agar)- TYCSB

بررسی بیوفیلم از طریق میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM): درون هر چاهک حاوی بیوفیلم یک سرسمپلر استریل به ابعاد ۵×۵ mm در زمان های مختلف تا ۷۲ ساعت قرار داده و پس از تشکیل بیوفیلم هر کدام از چاهک های حاوی سر سمپلر با آب مقطر دو بار تقطیر شسته شدند. سپس یک شب در فرم آلدئید و در دمای ۲۰ درجه گرماگذاری شدند. به ترتیب در رقت های ۷۰، ۸۰، ۹۰ و ۱۰۰ اتانول به مدت ۵ دقیقه آبگیری انجام گرفت و بعد از گرماگذاری و خشک شدن در پلیت استریل به مدت ۲۴ ساعت در فریزر قرار گرفت و جهت تهیه ی گراف های میکروسکوپ الکترونی نگاره SEM (مدل Leo 440 i) در مرکز میکروسکوپ الکترونی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران آماده شدند.

یافته ها

نتایج حاصل از جداسازی استرپتوکوک های دهانی از ۳۰ بیمار تحت مطالعه نشان داد که ۴۳ درصد آن ها متعلق به استرپتوکوک های موتانس و ۵۷ درصد متعلق به استرپتوکوک های غیر موتانس بوده اند. با توجه به میزان جذب نوری نمونه های مورد بررسی سویه ی بالینی جدا شده با OD معادل ۱/۴۳ به عنوان سویه ای با قابلیت بهتر تولید بیوفیلم برای ادامه ی کار انتخاب شد (۱۹). حداقل غلظت مهارکنندگی در مورد اریترومایسین ۰/۰۸ mg/ml، پنی سیلین ۰/۱۲ mg/ml، تتراسایکلین ۰/۳۵ mg/ml و کلرهگزیدین ۰/۰۹۵ mg/ml در مورد سلول های پلانکتونیک بوده است. بررسی های انجام یافته بر روی سلول های پلانکتونیک بالینی جدا شده از پلاگ های دندانی و سویه ی استاندارد S. mutans نشان داد که این سلول ها در مقایسه با سلول های بیوفیلم در حداقل غلظت مهارکنندگی عوامل ضد میکروبی مورد آزمون ریشه کن شدند. در آزمون مشابه که با سلول های بیوفیلم انجام پذیرفته بود مشخص شد که بیشترین اثر باکتریوسایدی در کوتاه ترین زمان بر روی بیوفیلم بعد از ۵ دقیقه تیمار با کلرهگزیدین می باشد. به طوری که بعد از ۱۰ دقیقه حدود ۱۸/۸ درصد سلول ها کشته شدند. اثر باکتریوسایدی پنی سیلین در همین زمان با مرگ حدود ۲۵ درصد سلول ها مشاهده گردید. در حالی که بعد از ۲۰ دقیقه تیمار بیوفیلم با اریترومایسین تنها ۴۷/۵ درصد سلول ها از بین رفته بودند. تعداد سلول های زنده در مورد تیمار با تتراسایکلین در زمان مساوی بیشتر از این میزان بوده است. بیوفیلم سویه ی بالینی بعد از تیمار با هر یک از عوامل بیوساید به طور مشخصی کاهش یافته است و فقط بعد از مدت زمان ۱۰ دقیقه تیمار با کلرهگزیدین در تعداد سلول های زنده افزایش مشخصی مشاهده می شود که ناشی از بی تأثیر شدن این ماده طی زمان ۱۰ دقیقه است (نمودار ۱).



نمودار ۱: تعداد سلول های زنده در بیوفیلم *S.mutans* بعد از انکوباسیون در حضور مواد ضد میکروبی مورد آزمون

نتایج حاصل از محاسبه ی OD_r (نسبت OD بیوفیلم تیمار شده بر OD بیوفیلم همان سویه بدون تیمار با ماده ی ضد میکروبی) بیوفیلم سویه های مورد بررسی نشان داد که جذب نوری پایین تر در مواد ضد میکروبی مؤثرتر دیده می شود. اختلاف آشکاری در میزان فعالیت باکتریوسایدی عوامل ضد میکروبی مورد آزمون در بین سلو ل های پلانکتونیک و بیوفیلم مشاهده گردید. این میزان اختلاف نشان دهنده ی مقاومت بالای بیوفیلم نسبت به پلانکتونیک است و تفاوت معنی داری با استفاده از آزمون Tukey-Kramer مشاهده گردید ($p<0/05$). در آنالیزهای آماری اعدادی که دارای سطح معنی دار ی آزمون های ۵ درصد در نظر گرفته شده است. ولی در مورد هر یک از بیوسایدها بعد از طی زمان های متفاوتی، کاهش بیشتری در دفعات بعدی مشاهده نمی شود. OD_r بیوفیلم تیمار شده با پنی سیلین ۰/۱۰۵±۰/۴۹۶در زمان ۳۰ دقیقه در مقایسه با زمان ۴۰ دقیقه بود ($p<0/001$) (جدول ۱).

جدول۱: OD_r بیوفیلم سویه ی انتخابی جدا شده

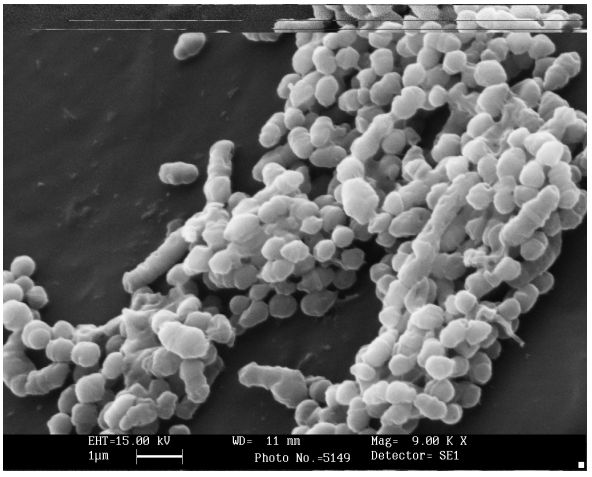
مواد ضد میکروبی	زمان انکوباسیون (دقیقه)						
	۱	۵	۱۰	۱۵	۲۰	۳۰	۴۰
کلر هگزیدین	۰/۵۳۵±۰/۲۴۳	۰/۵۰۲±۰/۱۵۶	۰/۴۱۲±۰/۲۰۶	۰/۴۹۶±۰/۱۶۵	۰/۵۲۵±۰/۳۲۷	۰/۶۳۷±۰/۱۶۵	۰/۶۴۰±۰/۰۶۵
تتراسایکلین	۰/۶۷۶±۰/۲۲۳	۰/۶۵۴±۰/۱۷۳	۰/۵۲۵±۰/۱۵۴	۰/۵۲۴±۰/۱۰۷	۰/۵۲۴±۰/۱۳۹	۰/۴۲۶±۰/۰۸۷	۰/۴۲۵±۰/۲۳۷
اریترومایسین	۰/۷۱۴±۰/۱۴۲	۰/۷۰۲±۰/۱۲۶	۰/۴۰۶±۰/۱۰۲	۰/۳۹۸±۰/۱۰۶	۰/۳۷۸±۰/۱۷۶	۰/۳۸۵±۰/۰۴۵	۰/۳۸۴±۰/۱۳۱
پنی سیلین	۰/۶۲۵±۰/۲۹۸	۰/۶۱۵±۰/۲۲۰	۰/۵۰۳±۰/۱۱۹	۰/۴۹۸±۰/۰۵۴	۰/۳۸۵±۰/۶۷۲	۰/۴۹۶±۰/۱۰۵	۰/۴۹۶±۰/۵۴۹

OD_r بیوفیلم تیمار نشده برابر با ۱ است.

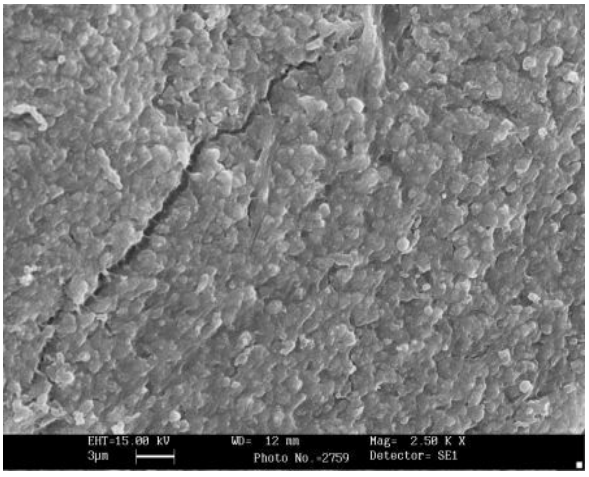
جدول۲: تعداد سلول های زنده در بیوفیلم *S.mutans* قبل و بعد از تیمار با مواد ضد میکروبی در MIC های متفاوت

غلظت آنتی بیوتیک (g/ml)	تعداد سلول های بیوفیلم (CFU/ml)			
	تعداد اولیه ی سلول ها	MIC	MIC4	MIC6
تتراسایکلین	۱/۹×۱۰^{۸}	۱/۴×۱۰^{۲}	۰/۲۵×۱۰	۰/۰۰۳۴
پنی سیلین	۱/۵×۱۰^{۸}	۱/۲۲×۱۰^{۲}	۰/۰۰۲۴	۰
اریترومایسین	۱۸/۲×۱۰^{۸}	۱/۱۶×۱۰^{۳}	۰/۰۰۶۷	۰
کلرهگزیدین	۵۴/۱×۱۰۸	۱/۲۴×۱۰^{۴}	۰/۶۳۸	۰/۲۹۵

به این ترتیب بعد از کاهش تأثیر تیمار بیوساید در بیوفیلم مربوطه، تعداد سلول های با قابلیت تشکیل بیوفیلم افزایش می یابد. در مقادیر MIC بیوسایدها کاهش پایداری در میزان سلول های زنده ی بیوفیلم چندان قابل ملاحظه نبوده است. بدین مفهوم که بعد از گذشت زمان های متفاوتی مجدداً افزایش در میزان تعداد سلول های زنده مشاهده گردید. نتایج نشان دادند که برای ایجاد کاهش پایدارتر در میزان سلول های بیوفیلم (cfu/ml) نیاز به استفاده از غلظت های بالاتر مواد ضدمیکروبی است. یعنی بیشتر از مقادیر MIC به دست آمده برای سلول های پلانکتونیک همان سویه لازم است. نتایج نشان دادند که افزودن میزان بیوساید تا مقادیر ۴ و ۶ برابر حداقل غلظت مورد نیاز برای مهار رشد سلول ها، منجر به ریشه کن شدن سلول های بیوفیلم شده است. نتایج حاصل از بررسی های میکروگراف میکروسکوپ الکترونی نشان دهنده ی تشکیل بیوفیلم با ضخامت مناسب (حداکثر میزان جذب نوری قرائت شده) بعد از ۱۰ و ۷۲ ساعت انکوباسیون در حضور ساکارز ۱ درصد بوده است (شکل ۱).



الف) بعد از ۲۴ ساعت



ب) بعد از ۷۲ ساعت

شکل۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی از بیوفیلم *S.mutans* بعد از ۲۴ و ۷۲ ساعت انکوباسیون

بحث

در اغلب استرپتوکوک های دهانی گلوکان ها شامل لایه ی نازک خارج سلولی تولید شده در حضور سوکروز هستند که باعث ادهسین و تشکیل بیوفیلم پلاگ دندانی می شوند. شواهدی موجود است که بیوفیلم باکتریایی استرپتوکوک های ویریدانس در سبب اندوکاردیت بیمارانی که دریچه ی مصنوعی در قلبشان دارند و هم چنین در ۱۳ درصد بیمارانی که عفونت توسعه یافته دارند سبب مرگ و میر بیش از ۷۰ درصد است (۲۳). یکی از عوامل مهم بیماری زایی *S.mutans* قابلیت تشکیل بیوفیلم در بین سایر باکتری ها است. تشکیل بیوفیلم نیاز به اتصال اولیه باکتری ها به یک سطح دارد و ازدیاد جمعیت باکتریایی به دنبال آن رخ می دهد (۲۴). بحث های مکرری در ارتباط با مقاومت سلول های بیوفیلم در برابر عوامل ضد میکروبی شده است و در این بررسی ها برای تشکیل مدل بیوفیلم از سطوح مختلفی استفاده شده است (۲,۱۲,۱۳,۲۵). در این بررسی بیوفیلم با استفاده از روش پلیت میکروتیتر بر روی سطوح پلی استیرنی تشکیل گردید و پس از رنگ آمیزی با کریستال ویوله از طریق دستگاه الایزا ریدر قرائت گردید (۲۶,۲۷). MIC و MBC از معیارهای استاندارد مهم در آزمون های سنجش حساسیت آنتی بیوتیکی میکروارگانیسم ها هستند. ولی در واقع از آن جایی که در اغلب پژوهش ها از سلول های پلانکتونیک برای تعیین MIC استفاده می شود ولی آنتی بیوتیک ها را برای درمان سلول های بیوفیلم به کار می برند و روند درمانی با شکست مواجه می شود (۲۸). از میان بیوسایدهای رایج مورد استفاده در دهان شویه ها بیوگوانیدین ها (کلرهگزیدین و هگزیتیدین) نشان داده اند که قابلیت مهار توسعه و رشد بیوفیلم و متابولیسم باکتریایی را دارند (۵). در بررسی دیگری ثابت شده است که تیمار دهان انسان با کلرهگزیدین منجر به کاهش ۳۰ تا ۵۰ درصد باکتری های دهان به خصوص در رابطه با *S.mutans* می شود (۲۹). مک بین و همکارانش طی مطالعه ای گزارش نمودند که کلرهگزیدین موجود در محلول های دهان شویه باعث کاهش مشخصی در میزان باکتری های هوازی و بی هوازی دهان می شود. این تأثیر به خصوص در مورد استرپتوکوک های ویریدانس مشخص می باشد. نتایج آن ها نشان داد که میزان درصد کاهش کلنی *S.mutans* در اثرکلرهگزیدین تفاوت معنی داری با آنتی بیوتیک های پنی سیلین و اریترومایسین ندارد (۳۰).

در سال ۱۹۸۸ مقاومت سویه های بالینی *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus sanguis* نسبت به کلر هگزیدین گزارش شد (۳۱). گزارش افزایش میزان MIC کلرهگزیدین و آنتی بیوتیک ها ی بتالاکتام و ماکرولیدی در مورد *S.mutans* نشان دهنده ی افزایش مقاومت بوده و این مقاومت در ارتباط با مصرف آنتی بیوتیک ها در درمان عفونت های دندانی است (۱۱,۳۲). طبق گزارشی تمام سویه های جداشده ی استرپتوکوکوس گروه ویریدانس به ترتیب ۲۵ و ۳۳ درصد نسبت به پنی سیلین و اریترومایسین مقاوم بودند (۳۳). در سال ۱۹۷۶ بیکر و همکارانش اعلام نمودند که سویه های *S.mutans* جدا شده از بیماران مبتلا به اندوکاردیت با MIC ۰/۰۸۰ µg/ml نسبت به پنی سیلین و اریترومایسین حساس بودند (۲۴). در سال ۱۹۹۳ طبق گزارشی MIC µg/ml کلرهگزیدین، پنی سیلین، اریترومایسین و تتراسایکلین به ترتیب ۱، ۰/۰۳۱، ۰/۱۳ و ۱ در سلول های پلانکتونیک *S.mutans* بوده است (۳۱). میزان MIC (mg/ml) کلرهگزیدین و آنتی بیوتیک های مورد آزمون برای سویه های پلانکتونیک جدا شده ی *S.mutans* در این بررسی نسبت به مطالعات پیشین افزایش مشخصی را نشان داد (۳۲). به خاطر تنوع میکروبی بالای پلاگ دندانی، کشت تک تک آن ها مشکل است و بهتر است از روند شمارش سلول های زنده ی بیوفیلم *S.mutans* استفاده شود (۳۰). ولسون و همکارانش در بررسی باکتری های شرکت کننده در بیوفیلم *S.mutans* برای تعیین میزان حساسیت آنتی بیوتیکی علاوه بر MIC و MBC تعداد سلول های زنده (CFU) را نیز در نظر گرفته و نشان دادند که بعد از ۶ ساعت تیمار بیوفیلم با کلرهگزیدین هیچ سلول زنده ای مشاهده نشد. درحالی که در مورد سلول های پلانکتونیک تنها بعد از ۵ دقیقه تیمار به میزان سه برابر کاهش در تعداد سلول های زنده مشاهده گردید (۳۴). در این بررسی تعداد

سلول های زنده ی بیوفیلم در غلظت MIC مواد ضد میکروبی مورد آزمون بعد از ۵ دقیقه تیمار کاهش مشخصی را نشان نداد و تنها بعد از ۱۵ دقیقه بیش از ۲۰ درصد سلول ها از بین رفتند و بعد از رفع اثر این مواد از محیط بیوفیلم افزایشی در میزان جذب نوری بیوفیلم، مشاهده گردید که در مطالعات قبلی به آن اشاره نشده است. نابودی کامل سلول های بیوفیلم فقط در بیش از ۴ برابر حداقل غلظت های مهارکننده بیوسایدهای مورد آزمون مطالعات زیادی در زمینه میزان حساسیت باکتری ها به هنگام رشد در بیوفیلم و در سوسپانسیون های میکروبی انجام پذیرفته است. یافته ها نشان می دهد که دلایل زیادی در ارتباط با مقاومت بالای باکتری ها در حالت بیوفیلم وجود دارد. یکی از این موارد ساختمان بیوفیلم باکتریایی و ضخامت آن است. در این بررسی برای تعیین کمیت و ضخامت بیوفیلم تشکیل شده از نسبت اپتیکال دانسیته ی بیوفیلم تیمار شده به OD بیوفیلم تیمار نشده استفاده گردید (OD_r) (۲۰). تفاوت مشخصی در میزان OD_r بیوفیلم در زمان های متفاوت در حداقل غلظت مهارکنندگی بیوسایدها (MIC) مشخص نگردید و نتایج نشان دادند که هر چه میزان جذب بیشتر باشد بر مقدار مورد نیاز بیوساید برای از بین بردن سلول های زنده افزوده خواهد شد. آنتی بیوتیک ها و عوامل ضد عفونی کننده ی مناسبی مانند کلرهگزیدین در غلظت MIC بر روی بیوفیلم تأثیر مشخصی نداشتند و در مقادیر بیش از ۴ برابر اثر ضد میکروبی مؤثرتری نشان می دهند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی SEM نشان داده است که سویه های منفرد باکتریایی در ساختمان بیوفیلم تنها ۵ تا ۳۵ درصد حجم بیوفیلم را اشغال می کنند (۳۴). کینی منت و همکارانش نشان دادند که بیوفیلم سودوموناس با ضخامت ۳۰۰μm حاوی حداکثر تعداد سلول زنده است و هر چه ضخامت بیشتر باشد تعداد سلول های زنده نیز بالاتر خواهد بود (۳۵). میکروگراف های به دست آمده در این بررسی نشان داد که بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون بیوفیلم مناسبی در سطوح پلی استیرنی تشکیل می شود که با نتایج حاصل از سایر محققین قابل مقایسه است (۳۰,۳۱,۳۲,۳۴) و تأثیر ترکیبات بیوساید مانند کلرهگزیدین بر روی بیوفیلم استرپتوکوکوس موتانس در زمان کوتاه بیشتر از آنتی بیوتیک ها است ولی پایداری آنتی بیوتیک ها در محیط بیشتر از عامل ضدعفونی کننده است. از طرف دیگر با توجه به تشکیل بیوفیلم با ضخامت مناسب بعد از ۲۴ ساعت انجام هر گونه آنتی بیوتیک تراپی قبل از زمان تشکیل بیوفیلم مؤثرتر خواهد بود. نتایج بدست آمده از این بررسی نشان داد که بیوسایدها و آنتی بیوتیک های مورد آزمون در غلظت های متفاوت تشکیل و مهار بیوفیلم را تحت تاثیر قرار داده و مطالعات مولکولی در این زمینه می تواند کمک موثری نماید.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کارشناسان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال به خصوص سرکار خانم رؤیا رضوی پور به خاطر همکاری صمیمانه شان کمال تشکر و امتنان را داریم. این بررسی حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد بوده است.

References:

1- Brassard J, Gottschalk M, Quessy S. Cloning and purification of the streptococcus suis serotype 2 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and its involvement as an adhesion. Vet Microbiol 2004; 102(1-2): 87-94.

2- Saswati B, Indranil B. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by Streptococcus mutans. Infec Immun 2005; 73(10): 6923-6934.

3- Vincent AF, Richard P, Novick, J J, Ferretti D A, Portnoy, Rood J I. Gram-positive pathogens. 2nd ed. Washington: American Society for Microbiology press; 2006.

4- Ahiwale S, Tamboli N, Thorat K, Kulkarni R, Ackermann H, Kapadnis B. In vitro management of hospital Pseudomonas aeruginosa biofilm using indigenous T7-like lytic phage. Cur Microbiol 2011; 62(2): 335-40.

5- Fraud S, Maillard JY, Kaminski M A, Hanlon G W. Activity of amine oxide against biofilms of Streptococcus mutans: a potential biocide for oral care formulations. J Antimicrob Chemother 2005; 56(4): 672-677.

6- Liljemark WF, Bloomquist C. Human oral microbial ecology and dental caries and periodontal diseases. Crit Rev Oral Biol Med 1996; 7(2): 180–98.

7- Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeda M, Yoshioka H, et al. Detection of cariogenic streptococcus mutans in extirpated heart valve and atheromatous plaque specimens. J Clinic Microbiol September 2006; 44(9): 3313-3317.

8- Baehni PC, Takeuchi Y. Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. Oral Dis 2003; 9: 23S-29S.

9- Sreenivasan P, Gaffar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. J Clin Periodontol 2002; 29(11): 965-974.

10- Eley BM. Antibacterial agents in the control of supragingival plaque: a review. Br Dent J 1999; 186: 286-96.

11- Dever J. G, Beck D J, Tagg J R. Oral changes associated with six months' exposure to chlorhexidine. J Dent Res 1982; 61: 529.

12- Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of streptococcus mutans to different types of brackets. Angle Orthod 2007; 77(6): 1090–1095.

13- Koo H, Schobel B, Scott-Anne K, Watson G, Bowen W H, Cury J A, et al. Apigenin and tt-farnesol with fluoride effects on S. mutans biofilms and dental caries. J Dent Res 2005; 84 (11): 1016-1020.

14- Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 1996; 44: 79–87.

15- Eliades T, Eliades G, Brantley WA. Microbial attachment on orthodontic appliances:s Wettability and early pellicle formation on bracket materials. Am J Orthod Dentofacial Orthop 1995; 108(4): 351-360.

16- Papaioannou W, Gizani S, Nassika M, Kontou E, Nakou M. Adhesion of Streptococcus mutans to different types of brackets. Angle Orthodontist 2007; 77(6): 1090–1095.

17- Zezhang T, Wen R, Burne A. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by streptococcus mutans. ppl. Environ.Microbiol 2002; 68(3): 1196-1203.

18- Holt J G. (Editor-in-Chief). Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.1-4. USA: Williams and Wilkins, Baltimore; 1984-1989.

19- Fujiwara T, Hoshino T, Ooshima T, Hamada S. Differential and quantitative analyses of mRNA expression of glucosyltransferases from Streptococcus mutans MT8148. Dent Res 2002; 81(2): 109-113.

20- Presterl E, Suchomel M, Eder M, Reichmann S, Lassnigg A, Graninger, Rotter M. Effects of alcohols, povidone-iodine and hydrogen peroxideon biofilms of staphylococcus epidermidis. J Antimicrob Chemotherap 2007; 60: 417-420

21. Committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, 8th ed. Approved standard 2009; 29: 2.

22- Mattos-Graner R O, Napimoga M H, Kasuo ukushima, Duncan M J, Daniel J S. Comparative analysis of Gtf Isozyme production and diversity in isolates of Streptococcus mutans with different biofilm growth phenotypes. J Clin Microbiol October 2004; 42(10): 4586-4592.

23- Analysis of gene expression in streptococcus mutans in biofilms in vitro advances in dental research. Adv Dent Res 1997; 11(l): 100-109.

24- Baker C, Thornsberry C. Antimicrobial susceptibility of streptococcus mutans isolated from patients with endocarditis. Antimicrob Agent Chemotrap Mar 1974; 5(3): 268-271.

25- Coenye T, Honraet K, Rigole P, Nadal Jimenez P, Nelis H J. In vitro inhibition of streptococcus mutans biofilm formation on hydroxyapatite by subinhibitory concentrations of anthraquinones. Antimicrob agent chemotrap. 2007; 51(4): 1541-1544.

26- Djordjevic D, Wiedmann M, McLands borough LA. Microtiter plate assay for assessment of listeria monocytogenes biofilm formation. Appl Environ Microbiol 2002; 68(6): 2950-8.

27- Loo C Y, Corliss D A, Ganeshkumar N, Streptococcus gordonii biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. J Bacteriol 2000; 182(5): 1374-1382.

28. Hyun Koo, Pedro L R, Jaime A C, Yong K P, William H B. Effects of compounds found in propolis on streptococcus mutans growth and on glucosyltransferase activity. Antimicrobial Agents Chemotherapy 2002; 46(5): 1302-1309.

29. Schiott C R, Briner W W, Kirkland J J, Loe H. Two-year oral use of chlorhexidine in man. II. The effect of salivary bacterial flora. J Peridontal Res 1976; 11(3): 145–152.

30- Andrew J, McBain R G, Bartolo C E, Catrenich, Duane C, Ruth G, Gilbert L, Gilbert P. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. Appl Environ Microbiol 2003; 69(8): 4770-4776.

31- Jarvinen H, Tenovuo J, Huovinenp. In vitro susceptibility of Streptococcus mutans to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. Antimicrob Agent Hemotrap1993; 37 (5): 1158-1159.

32- Castillo A, Li´ebana J, L´opez E, Baca P, Jos´e M, Li´ebana M, Li´ebana J, Castillo F. Interference of antibiotics in the growth curves of oral streptococci. Internat J Antimicrob Agent, 2006; 27: 263-266.

33- Wayne A, Little Thomson L, Bowen W H. Antibiotic susceptibility of streptococcus mutans: comparison of serotype profiles. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1979; 15(3): 440-443.

34- Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 1996; (44): 79-87.

35- Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. Applied and Environmental Microbiology 1998; 64(9): 3515-3519.

The Effects of Antimicrobial Agents on Planktonic and Biofilm Strains of Streptococcus Mutans Isolated from Dental Plague

Farzaneh Hosseini[1], Maryam Ghavam Shirazi[2] and Jamileh Norouzi[3]

Abstract

Background and Aim: *Streptococcus mutans* are the most important factors of dental cavity in the mortal because the mutans have the ability to synthesize the extracellular polymers and biofilm formation. Biofilm formation from clinical *Streptococcus mutans* strains from dental plaque in vitro and our purpose was to study the resistance to antimicrobial agents.

Materials and Methods: In this study, one strain was selected with prevalent ability in biofilm formation for testing antimicrobial agents from among the isolated *Streptococcus mutans* strains from dental plaque. Biofilms of *Streptococcus mutans* were constituted on polyacetiren micro plates. The efficacy scale of common antimicrobial agents such as Penicillin, Erythromycin, Tetracycline and Chlorhexidine was evaluated on the number of live biofilm cells in different occasions. MIC for planktonic cells of *Streptococcus mutans* was determined.

Results: It was observed that chlorhexidine 0.2 % with 0.09 mg/ml MIC has the most bactericidal effects within a five-minute treatment on biofilm and Tetracycline with 0.3mg/ml MIC has the lowest effect. The OD a ratio of the untreated biofilm to OD of the biofilm containing biocide in the same strain (OD_r) shows that untreated biofilm forms thicker biofilms than that of treated biofilm with effective microbial agents. A constant reduction was observed in the number of living biofilm cells within treatment by Erythromycin and Penicillin.

Conclusion: This research demonstrated that to eradicatet the living biofilm cells, a density of over 5 MIC of antimicrobial agents is needed.

Keywords: Antimicrobial agents, biofilms, *Streptococcus mutans*

Ofogh-e-Danesh. GMUHS Journal. 2011; Vol. 17, No. 3

1- **Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran.
Tel: +98 9123472441 **Fax:** +98 21 22950723 **E-mail:** farzaneh953@yahoo.com
2- Department of Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran
3- Professor in Microbiology, Islamic Azad University, North Tehran Branch, Tehran, Iran