نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 25-18

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 18-25

مقایسه روش‌های جداسازی بیوفیلم‌های باکتریایی تشکیل شده بر سطوح لوله‌های انتقال آب و وسایل استفاده شده در شیردوشی در دامدارای‌ها

ستاره نبی زاده اصل[1*] - رضا ولی زاده[2]

تاریخ دریافت: 1392/06/02
تاریخ پذیرش: 1392/06/24

چکیده

بیوفیلم‌های باکتریایی بسته به ترکیب و محل ایجاد می‌توانند سودمند یا زیان آور باشند. تشکیل آنها در لوله‌های انتقال آب و استفاده شده در شیردوشی در دامداری‌ها می‌تواند مشکلاتی را ایجاد نمایدو منبع بالقوه‌ای برای آلودگی باشد. در این تحقیق با توجه به توانایی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *با سیلوس سوبتیلیس* با برخورداری از خصوصیات ویژه انتخاب گردید. ابتدا امکان تشکیل بیوفیلم بر روی قطعات مختلف پلاستیک (پلی وینیل کلراید، پلی پروپیلن و پلی اتلین گیکول)، فلزآلومینیوم و شیشه در دمای ۳۷، ۳۰، ۴ درجه سانتیگراد مورد مطالعه قرار گرفت. بر روی تمام سطوح مورد استفاده بیوفیلم *با سیلوس سوبتیلیس* تشکیل شد. و دمای بهینه تشکیل بیوفیلم آن 30 درجه سانتیگراد تعیین گردید. دو روش جداسازی بیوفیلم ها شامل زدودن با سوآپ و ورتکس بکار رفت و بازده هر روش محاسبه گردید. روش ورتکس بازده و کارایی بیشتری برای جداسازی سلولهای چسبیده و بیوفیلم‌ها از سطوح مختلف داشت. شمارش تام پرگنه های حاصل از بیوفیلم مشخص کرد که احتمال چسبیدن باکتریها به سطوح پلاستیکی به خصوص پلی پروپیلن بیشترین و سطوح شیشه‌ای کمترین بود.در واقع چسبیدن سلول های باکتری با توجه به خاصیت فیزیکی سطوح به نسبت 2-1/2 برابر ممکن است متغیر باشد .نتایج این مطالعه می‌تواند به انتخاب لوله‌های مناسب برای انتقال مایعات بویژه آب و کاهش آلودگی در دامداری‌ها کمک کند.

واژه‌های کلیدی : باکتری *با سیلوس سوبتیلیس*، بیوفیلم، سوآپ، ورتکس.

مقدمه

باکتری‌ها در محیط به دو شکل شناور (آزاد) و چسبیده (بیوفیلم) به سطوح مختلف موجودند. شکل غالب میکرو ارگانیسم ها در طبیعت حالت چسبیده بوده و به عنوان مخازنی برای شکل شناور باکتری ها می باشند (3و 5) . سلول های باکتری بر روی سطوح متنوع اعم از فلزات و غیر فلزات که در معرض آب غیر استریل و یا مایعات دیگر قرار می‌گیرند متصل شده و نهایتاً بیوفیلم شکل می‌گیرد (6) . تشکیل بیوفیلم به صورت یک فرآیند مرحله‌ای صورت میگیرد که به شکل خلاصه شامل چسبیدن قابل برگشت، غیر قابل برگشت و تشکیل کلنی می‌باشد (5). بیوفیلم ها علاوه بر محیطهای طبیعی مانند دندان و شکمبه می توانند در محیطهای کشاورزی و دامداری و سیستم های صنعتی و پزشکی نیز تشکیل گردند(4، 8 و 9). بیوفیلم‌ها بسته به ترکیب و محل ایجادشان می توانند سودمند یا زیان آور باشند(6 و 11). تشکیل آنها در لوله‌ها آبخوری و شیردوشی‌ها علاوه بر خوردگی میکروبی و پوسیدگی تجهیزات، باعث انسداد و گرفتگی لوله‌ها، آلودگی دائم آب آشامیدنی و شیر خام به دلیل ورود میکروبها و سموم آنها می‌شود. همچنین این بیوفیلم‌ها موجب کاهش اثر واکسن های دامی، اتلاف بخش قابل توجهی از ویتامین‌های قابل استفاده دام به دلیل جذب مقداری از آنها توسط میکروبهای بیوفیلم ایجاد طعم و بوی نامطبوع در آب و شیر و کاهش میل نوشیدن آب، خطر مسمومیت ناشی از تداخلات دارویی و فساد شیر می‌شوند(3 و 8). سرعت تشکیل بیوفیلم به عوامل متعدد چون ویژگی‌های میکروب مورد مطالعه، ساختار سطح استفاده شده، ترکیب و شرایط محیط کشت (دما و موادمغذی) بستگی دارد (8) . در این آزمایش تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *با سیلوس سوبتیلیس* در سطوح مختلف مورد مطالعه قرار گرفت. این میکرو ارگانیسم به شکل ساپروفیت در آب، هوا و خاک وجود دارد و توانایی تولید اسپور را نیز دارد (1) . باکتری باسیلوس سوبتیلیس متحرک است و نسبت به باکتری های غیر متحرک اتصال محکمتری را با سطوح ایجاد می‌کند (2 و 5). این باکتری توانایی تشکیل بیوفیلم در لوله‌های مختلف از جمله لوله‌های

1- دانشجوی دکتری گروه علوم دامی، پردیس بین الملل دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد رودهن، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، رودهن،
2- استاد گروه علوم دامی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد.
(*- نویسنده مسئول: Email: se_nabizadeh@yahoo.com)

Archive of SID
www.SID.ir

انتقال آب و شیر را دارا می باشد (5 و 8) . شناسائی بیوفیلم این باکتری می‌تواند در زدودن آلودگیهای میکروبی شکل گرفته در سطوح و سایل مختلف مورد استفاده در واحدهای دامداری تولیدکنندگان و دست اندرکاران را یاری نماید.

مواد و روش ها

تهیه کشت مادر

با سیلوس سوبتیلیس سویه ca به صورت لیوفیلیزه در آمپول تهیه گردید. آمپول از محل بالای پودر میکروب به وسیله سوهان برش داده شد و از همان ناحیه شکسته و توسط پیپت پاستور استریل 0/5 ml از محیط آبگوشت-مغذی به پودر میکروب اضافه گردید تا سوسپانسیون حاصل گردد. بعد از مخلوط نمودن میکروب و تهیه سوسپانسیون، به کمک آنس استریل مقداری از سوسپانسیون میکروبی به محیط آگار مغذی (در لوله های مک کارتنی) منتقل شد و کشت انجام گردید. این محیط در گرمخانه با دمای 30 °C به مدت 5 روز قرار داده شد و سپس به عنوان کشت مادر در یخچال نگهداری گردید و هر دو ماه یکبار تجدید کشت شد.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

از منبع کشت مادر کشت دیگری در سطح محیط کشت در لوله مک کارتنی تهیه شد، و به مدت 50 روز در گرمخانه قرار گرفت، تا اطمینان حاصل شود که اسپور تشکیل گردیده است (1 و 2). میکرو ارگانیسم ها با 0/2 ml نرمال سالین شستشو داده شد و باپیپت استریل سوسپانسیون میکروبی به داخل لوله های میکروبیولوژی استریل منتقل گردید و با اضافه نمودن نرمال سالین سوسپانسیون میکروبی با غلظت لازم ساخته شد. سوسپانسیون میکروبی به مدت 15 دقیقه در حمام بن ماری با دمای 85 °C گرمایی داده شد تا اسپورها به شکل رویشی تبدیل گردند.

بررسی امکان تشکیل بیوفیلم *با سیلوس سوبتیلیس* بر روی قطعات مختلف

قطعات مورد استفاده برای تشکیل بیوفیلم از جنس های مختلف پلی پروپیلن، پلی اتیلن گلیکول، پلی وینیل کلراید، آلومینیوم و شیشه انتخاب گردید. قطعات شیشه‌ای درون فلاسکهای کشت بیوفیلم انداخته شد و همراه با کشت مایع در اتوکلاو استریل گردید. قطعات دیگر به وسیله دترجنت آنیونی دودسیل سولفات (Cinna Gen. Iran) شسته و با آب مقطر آبکشی شد سپس با اسید سولفوریک غلیظ اسید شویی و ضدعفونی شد و چندین مرحله در شرایط کاملاً استریل به وسیله آب مقطر استریل اسید زدایی گردید. محیط کشت مایع مورد استفاده جهت تشکیل بیوفیلم محیط مایع آب گوشت مغذی[1] (N.B) بود. برای تشکیل بیوفیلم بر روی هر یک از قطعات 100ML از محیط آب گوشت مغذی در داخل فلاسک‌های شیشه‌ای به حجم 500ML ریخته شد. برای بدست آورد تلقیح میکروبی ابتدا بوسیله آب مقطر استریل سوسپانسیونی از کشت 5 روزه باسلیوس سوبتیلیس تهیه و سپس به مدت 15 دقیقه در بن ماری با دمای 85 C قرار گرفت تا اسپورها از حالت نهفته به شکل رویشی تبدیل شوند.در مرحله بعد سوسپانسیونی با غلظت 10^8 $CFUL^{-1}$ میکروب تهیه شد که سوسپانسیون میکروبی با این غلظت کدورتی معادل کدورت 0/5 مک فارلند دارد و 1 ml از این سوسپانسیون به فلاسکهای حاوی محیط کشت و قطعات مورد آزمایش اضافه گردید و به مدت 48 ساعت در دمای 30 °C گرماگزاری شد. بعد از این مدت قطعات به کمک پنس استریل از محیط خارج و به مدت 1 دقیقه در دمای آزمایشگاه بوسیله آب مقطر استریل شستشو داده شد. سطح قطعات باسوآپ پنبه ای استریل کاملاً پاک گردید و با کشیدن همان سوآپ ها به روی محیط کشت جامد آگار مغذی در پلیت‌های استریل کشت یکنواختی تهیه و پلیت‌ها در گرمخانه با دمای 30 °C به مدت 24 ساعت قرارداده شد.

ایجاد دماهای مختلف برای تشکیل بیوفیلم

به منظور بررسی اثر سه دمای 4 و30 و 37 درجه سانتیگراد در تشکیل بیوفیلم مانند آزمایش قبل عمل شد و و بعد از 2 ، 6 و 9 روز نتایج بررسی گردید. هر دو روز یکبار محیط کشت مایع داخل فلاسکها تخلیه و محیط کشت جدید جایگزین گردید.

جداسازی بیوفیلم ها از سطوح با روش ورتکس

جداسازی بیوفیلم ها از سطوح با استفاده از ورتکس براساس روش لیندسی و وبنولی (1997) انجام شد. ابتدا بیوفیلم ها در دمای30°C 30 بر روی قطعات از جنس شیشه ، پلی اتیلن گلیکول، پلی وینیل کلراید، پلی پروپیلن و آلومینیوم با ابعاد 4x1 سانتیمتر تشکیل گردید. بعد از 2 و 5 و 10 روز قطعات مورد آزمایش را در شرایط استریل خارج شد و به مدت 1 دقیقه در محیط آزمایشگاه با آب مقطر استریل شستشو داده شد و هر قطعه را به طور جداگانه به یک لوله محتوی 10 میلی متر نرمال سالین منتقل شد و به مدت 4 دقیقه لوله محتوی قطعه ورتکس گردید تا سلول های چسبیده به سطوح جدا و سوسپانسیونی میکروبی ایجاد شود.

از سوسپانسیون حاصل رقت‌های متوالی تهیه و با روش کشت مخلوط (Pour plate) با استفاده از محیط کشت آگار شمارش استاندارد (Standard plate count agar)در دمای30°C به مدت 24-48 ساعت کشت داده شد. بعد از گذشت زمان لازم تعداد

1- N.B1=Nutrient Broth

Archive of SID

www.SID.ir

پرگنه‌های حاصل از سلولهای چسبیده را بوسیله دستگاه شمارنده کلنی شمارش شد با ضرب نمودن تعداد پرگنه ها در عکس ضریب رقت، تعداد سلول های بیوفیلم محاسبه گردید.

جداسازی بیوفیلم ها از سطوح با روش سوآپ

در این روش نیز ابتدا بیوفیلم ها بر روی قطعات مورد نظر تشکیل گردید و بعد از خارج سازی و شستشوی قطعات در شرایط کاملاً استریل با استفاده از یک سوآپ پنبه ای به طور جداگانه و محکم بر روی سطح هر یک از قطعات کشیده و سوآپ به لوله آزمایش محتوی 10 میلی لیتر نرمال سالین استریل منتقل و 2 دقیقه تکان داده شد. از سوسپانسیون حاصل رقت های متوالی تهیه و به روش کشت مخلوط با استفاده از محیط کشت آگار استاندارد کشت داده شد. پلیت ها به مدت 48-24 ساعت در 30 °C انکوبه گردیدند و بعد از گذشت زمان لازم پرگنه‌ها شمارش شد.

بازده عمل جداسازی بیوفیلم ها در دو روش مورد آزمایش

قطعات استفاده شده در آزمایشات قبل در شرایط کاملاً استریل برای انجام تیمار دوم بکار رفت به این شکل که قطعات استفاده شده در روش ورتکس دوباره در10 میلی لیتر نرمال سالین قرارداده شد و به مدت 4 دقیقه ورتکس گردید و قطعات استفاده شده در روش سوآپ نیز مجدداً بوسیله سوآپ استریل دیگری پاک شد و سوآپ درون 10 میلی لیتر نرمال سالین قرارگرفت و به مدت 2 دقیقه تکان داده شد. سپس از سوسپانسیونهای حاصل از دو روش مورد استفاده رقت‌های متوالی ساخته شد و در پلیت‌ها با روش کشت مخلوط در دمای37 °C کشت داده شد. بعد از مدت زمان لازم پرگنه ها شمارش گردید و بازده دو روش محاسبه شد.

بررسی میزان تشکیل بیوفیلم وچسبیدن سلولهای باکتری به سطوح مختلف این ازمایش به منظور تعیین سطوحی که کمترین وبیشترین احتمال چسبیدن سلولهای باکتری به انها وجود دارد انجام شد با توجه به ازمایشات قبل دمای بهینه تشکیل بیوفیلم باکتری *باسیلوس سوبتیلیس* 30°C بود که این دما برای تشکیل بیوفیلم انتخاب شد.سطوح مورد نظر پلاستیکهای(پلی پروپیلن، پلی اتیلن گلیکول ، پلی وینیل کلراید) شیشه والومینیوم انتخاب گردید که بعد از 2 ،6 و10 روز میزان تشکیل بیوفیلم از طریق شمارش تام پرگنه ها انجام گردید. روش جداسازی سلولهای چسبیده باکتریها وبیوفیلم نیز با توجه به ازمایشات فوق روش ورتکس بود.

نتایج و بحث

تشکیل بیوفیلم و بر روی قطعات مختلف

کلنی‌های کرم رنگ دایره‌ای نسبتاً درشت بعد از گذشت 24 ساعت در دمای 30°C روی محیط آگار جامد مغذی تشکیل شد که نشاندهنده تشکیل شدن بیوفیلم بر روی تمامی سطوح غوطه‌ور مورد آزمایش در محیط آب گوشت مغذی می باشد.

نتایج اثر سه دمای مختلف در تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح مختلف

تعداد سلولهای تشکیل دهنده بیوفیلم در یک سانتیمتر مربع بیوفیلم از سطوح مختلف و در جداول 1، 2 و 3 ارائه شده‌اند. در دمای 4 درجه سانتیگراد در هیچ یک از حالت های مورد بررسی بیوفیلمی تشکیل نگردید.

تعداد سلولهای شمارش شده بر روی سطوح پلی پروپیلن دردمای 30 °C بعد از گذشت شش و نه روز از شروع آزمایش نسبت به تعداد همین سلولها در دمای37°C بیشتر بود.

جدول 1- تعداد سلولهای بیوفیلم (CFU*) در هر سانتی مترمربع از سطوح شیشه‌ای در دما و زمانهای مختلف

Table 3- The number of biofilm cells (CFU*) per square centimeter of glass surfaces at different temperatures and times

دما (°C)	زمان پس از تلقیح (روز) Time after inoculation (Day)		
Temperature (°C)	2	6	9
4	--	--	--
30	7×10^4	1.7×10^5	2×10^5
37	4×10^4	1.1×10^5	2×10^5

--کلنی یا بیوفیلم تشکیل نشد. است.
*واحد تشکیل کلنی

--It is not biofilm or colony
*Colony Forming Unit

Archive of SID

www.SID.ir

جدول 2- تعداد سلولهای بیوفیلم (CFU^*) در هر سانتی مترمربع از سطوح پلی پروپیلن در دما و زمانهای مختلف

Table3- The number of biofilm cells (CFU^*) per square centimeter of Poly Propylene surfaces at different temperatures and times

دما (°C)	زمان پس از تلقیح (روز) Time after inoculation (Day)		
Temperature (°C)	2	6	9
4	--	--	--
30	2×10^5	3.8×10^5	5.1×10^5
37	6×10^4	2.4×10^5	4×10^5

--کلنی یا بیوفیلم تشکیل نشد. است.
*واحد تشکیل کلنی

--It is not biofilm or colony
*Colony Forming Unit

جدول 3- تعداد سلولهای بیوفیلم (CFU^*) در هر سانتی مترمربع ازسطوح پلی وینیل کلراید در دما و زمانهای مختلف

Table 3- The number of biofilm cells (CFU^*) per square centimeter of Poly Vinyl Chloride surfaces at different temperatures and times

دما (°C)	زمان پس از تلقیح(روز) Time after inoculation(Day)		
Temperature(°C)	2	6	9
4	--	--	--
30	1.2×10^5	1.7×10^5	2×10^5
37	9.3×10^4	1×10^5	1.3×10^5

--کلنی یا بیوفیلم تشکیل نشد. است.
*واحد تشکیل کلنی

--It is not biofilm or colony
*Colony Forming Unit

جدول 4- تعداد سلولهای بیوفیلم جدا شده (CFU^*) در هر سانتیمتر مربع از سطوح مختلف به روشهای ورتکس و سوآپ

Table 4- The number of biofilm cells (CFU^*) isolated per square centimeter iso of vortex and swaps methods of various materials

جنس قطعه Materials	روش Way	زمان (روز) Time (day) 2	5	10
شیشه Glass	ورتکس Vortex	2.5×10^5	2.5×10^5	2.5×10^5
	سواپ Swap	8×10^4	1.25×10^5	1.5×10^5
پرو پیلین Poly Propylene	ورتکس Vortex	8×10^5	1.3×10^6	5.8×10^6
	سواپ Swap	2.2×10^5	3×10^5	5×10^5
پلی وینیل کلراید Poly Vinyl Chloride	ورتکس Vortex	3×10^5	4.5×10^5	7.1×10^5
	سواپ Swap	1×10^5	1.5×10^5	2×10^5

--کلنی یا بیوفیلم تشکیل نشد. است.
*واحد تشکیل کلنی

--It is not biofilm or colony
*Colony Forming Unit

Archive of SID

www.SID.ir

در مورد سطوح پلاستیکی پلی وینیل کلراید تشکیل بیوفیلم در دمای°C 30 بهتر از°C 37 صورت گرفت (جدول3).

همانگونه که در جدول 4 ذکر شده تعداد باکتری های جدا شده به وسیله عمل ورتکس در مقایسه با عمل جداسازی به وسیله سوآپ بیشتر بود.

بازده روش ورتکس در مورد سطوح شیشه ای و آلومینیومی و همچنین پلی اتیلن گلیکول 99 درصد بود که بیشترین بازده در این آزمایش بود.کمترین بازده در هر دو روش مربوط به پلاستیک پلی وینیل کلراید بود که نشان می‌دهد جداسازی باکتری ها از سطوح پلی وینیل کلراید با این جنس سخت تر از سایر سطوح است.

جدول 5- بازده روشهای جداسازی سلولهای بیوفیلم از سطوح مختلف

Table 5- Output isolation test methods of biofilm cells of different material

روش Way	جنس ظرف Materials				
	شیشه Glass	پلی اتیلن گلیکول Poly Ethylene Glycol	پلی وینیل کلراید Poly Vinyl Chloride	پلی پروپیلن Poly Propylene	آلومینیوم Aluminum
سواپ Swap	96%	96%	91%	93%	98%
ورتکس Vortex	99%	99%	93%	97%	99%

جدول 6- میزان کل سلولهای شمارش شده بیوفیلم (CFU*) در هر سانتیمتر مربع از سطوح مختلف بیوفیلم طی زمانهای مختلف

Table6- Total the biofilm cell (CFU*) were counted of each square centimeter of biofilm material at different times

جنس قطعه Materials	زمان (روز) Time (day)		
	2	6	10
شیشه Glass	9.8×106	1×105	5.2×105
پلی پرو پیلین Poly Propylene	1×10^6	2×10^6	6.5×10^6
پلی وینیل کلراید Poly Vinyl Chloride	1×10^5	2×10^5	6×10^5
پلی اتیلن گلیکول Poly Ethylene Glycol	9.3×10^5	1.6×10^6	5.6×10^6
آلومینیوم Aluminium	6×10^5	8×10^5	1×10^6

*واحد تشکیل کلنی

*Colony Forming Unit

در دامداری‌ها همواره چسبیدن باکتریها به سطوح و لوله‌های انتقال آب و شیرو تشکیل بیوفیلم باکتریایی یکی از مشکلات می‌باشد. باکتری با سیلوس سوبتیلیس به صورت ساپروفیت در محیط وجود دارد، اسپورهای این باکتری در شرایط نامساعد محیطی باقی مانده و پراکندگی زیادی دارند که این مسئله می‌تواند به تشکیل بیوفیلم به وسیله این باکتری بر روی سطوحی که در مجاورت با مایعات می‌باشند، کمک کند. بیوفیلم‌ها منبع بالقوه آلودگی هستند. بنابراین احتمال ایجاد مشکلات ثانویه و آلودگی محتویات ظروف و وسایل شیردوشی و آب آشامیدنی دام ها زیاد است. درجه حرارت ازعوامل بسیار مهم در تشکیل بیوفیلم ها می‌باشد. همانگونه که نتایج این مطالعه نشان داد در دمای 4°C بیوفیلمی تشکیل نشد، اما بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم در30°C بدست آمد. در واقع تعداد سلولهای تشکیل دهنده بیوفیلم در 30 °C به طور متوسط 1/5 برابر بیشتر از سلولهای تشکیل دهنده بیوفیلم در دمای 37°C بود. که به طورکلی می‌توان گفت دماهای بالا و پایین اثر منفی بر رشد بیوفیلم داشت و دمای بهینه رشدآن حدود دمای 30°C بود (جداول 1 تا 3).

بدلیل چسبندگی زیاد سلولهای بیوفیلم به سطوح، استفاده از روش ورتکس که بوسیله دستگاه و با گویچه‌های شیشه‌ای برای کندن سلولهای چسبیده به سطوح مورد استفاده قرار گرفت نسبت به روش سوآپ که به صورت دستی انجام پذیرفت روش مناسب تری برای

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی بیوفیلم‌هاست بنابراین برای زودودن و جداسازی بیوفیلم ها حتماً باید از روش‌هایی استفاده گردد که اتصال پایدار باکتری با سطوح را از بین برده و امکان تشکیل بیوفیلم ها را به حداقل برساند با توجه به اعداد بدست آمده در محاسبه کارآیی دو روش به کاررفته میزان کارآیی (بازده) روش ورتکس (در همه سطوح) بیشتر از کارایی روش سوآپ بود (جدول 5).

در این تحقیق مسئله دیگری که مورد توجه قرار گرفت جنس سطوح و رابطه آن با میزان چسبیدن باکتریها و تشکیل بیوفیلم بود که شاید بتوان مطلب را بوسیله آبگریزی و آبدوستی سطوح توجیه نمود(10). نتایج نشان دادکه باکتریها به سطوح پلی پروپیلن، پلی اتیلن گلیکول که آبگریز می باشند نسبت به سطوح آبدوست پلی وینیل کلراید، شیشه و فلزاتی نظیر آلومینیوم بیشتر می‌چسبند. البته با توجه به اختلافی که در تشکیل بیوفیلم در سطوح با هیدروفوبیسیته مشابه دیده شد می‌توان نتیجه گرفت که عوامل دیگری نیز در جذب و اتصال باکتریها به سطوح مهم می باشند. مثلاً تشکیل بیوفیلم در سطوح با جنس پلی وینیل کلراید به مراتب بیشتر از سطوح شیشه ای می باشد شاید یکی از دلایل این مسئله زبری سطح مورد نظر باشد چسبیدن باکتریایی در مجاورت یک سطح خشن بهتر از یک سطح صاف صورت می پذیرد. زیرا در سطوح خشن به دلیل پستی و بلندی های زیاد افزایش سطح وجود دارد که می‌تواند باعث جذب بیشتر باکتریها گردد. در یک بررسی نشان داده شده است که متوسط چگالی جمعیت سلولهای چسبیده در سطح شیشه صاف کمتر از سطح شیشه خراش دار می‌باشد (7). این یافته نشان می‌دهد لوله‌های انتقال مایعات چون آبخوریها یا لوله انتقال شیر و امثال آن هر چه صاف و صیقلی باشند احتمال تشکیل بیوفیلم در آنها کمتر است. در این تحقیق نیز مشخص شد میزان چسبیدن باکتریها به سطوح پلی پروپیلن حدود 10 برابر بیشتر از سطوح پلی وینیل کلراید است در صورتیکه تعداد باکتریهای چسبیده به سطوح پلی پروپیلن تنها 1/3، 1/2 برابر سطوح پلی اتیلن گلیکول است که می توان نتیجه گرفت در سطوحی که خواص فیزیکی متفاوت و متقابل یکدیگرند دارند چسبندگی سلولها تا حدود 20-10 برابر قابل تغییر است و نهایتاً بیشترین میزان چسبیدن باکتری و تشکیل بیوفیلم در سطوح پلی پروپیلن و کمترین در سطوح شیشه‌ای مشاهده گردید (جدول6).

با توجه به فاکتورهای موثربر چسبیدن باکتریها از جمله ماهیت ونوع سطح ، شکل سطح(همگن بودن)، بار (فقدان بارهای سطحی)، آبگریزی وخصوصیات هیدرودینامیک (جریان) و فاکتورهای موثر بر رشد بیوفیلم از قبیل نفوذ مواد مغذی محدودکننده سرعت (وابسته به بافت و محیط)، ماهیت فضاهای هوازی وبی هوازی بین بیوفیلم وجمعیت های همگن در مقابل ناهمگن می توان بیوفیلم ها را بررسی وکنترل نمود واحتمال الودگی را کاهش داد (3 و 7).

در مجموع می‌توان گفت مواد سنتتیک بر پایه هیدروکربن‌ها بیشتر در معرض تشکیل بیوفیلم و ایجاد آلودگی هستند و سطوح شیشه‌ای کمترین احتمال آلودگی را دارند. به طور کلی هر چه خلل و فرج میکروسکوپی سطوح کمتر باشد. احتمال چسبیدن پایدار باکتریها به آنها کمتر بوده و لذا تشکیل بیوفیلم ها نیز کمتر صورت می پذیرد. بنابراین لوله های زنگ زده و فرسوده و وسایل پلاستیکی قدیمی و خش‌دار می‌توانند احتمال آلودگی میکروبی را بالا برده و مشکلاتی ایجاد نمایند. طراحی مناسب شبکه آبرسانی و تجهیزات شیر دوشی از عوامل مهم در کنترل بیوفیلم می باشد با توجه به روش های بررسی شده برای جدا سازی باکتریها در این تحقیق می توان پیشنهاداتی مانند استفاده از مواد پاک کننده ،حذف لکه های حاوی میکروارگانیسم ها از روی سطوح توسط آب سرد و گرم و به کارگیری عوامل شیمیایی و در نهایت ضد عفونی را برای حذف کامل بیوفیلم ها ارایه نمود، همچنین در پاک سازی از طریق عوامل پاک کننده شیمیایی و نیروهای فیزیکی، استفاده از درجه حرارت بالا می‌تواند اثر بخش باشد (7). مطالعه پایه‌ای بیوفیلم‌ها و روش زودودن آنها می‌تواند تولیدکنندگان دام و طیور را درجهت استفاده مناسب از وسایل و روشهای عملی زدودن آلودگی‌ها یاری نماید.

منابع

1- Bailey, C.P., and A. Vonholy. 1993. Bacillus Spore Contamintion associated with commerical bread manufacture. Journal Food Microbiology, 10:287-294.

2- Bob, F.B. 1997.Text book of microbiology. 12 thed. Philadelphia USA. WB Saunder Company;p.631.

3- Costerton, J.W., Z. Lewandowski., D. E. Caldwell., and E. Korber. 1995. Microbial biofilm in the nature.Journal Microbiology, 49:711-745.

4- Duguid, I. G., E. Evans., M. R. Brown., and P. Gilbert. 1992. Effect of biofilm culture upom the susceptibility of *staphyloccus epidermidis* to tobramycim. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 30:803-810.

5- Lindsay, D., and A. Vonholy .1997. Evaluation of disloading methods for laboratory- grown bacterial biofilms. Journal Food Microbiology, 14:383-390.

6- Marshall, K. C., and G. W. Characklis. 1990. Biofilms a basis for an interd is ciplinary approach. In: Characklis, G.W. and K.C. Marshall editor. Biofilms.3 thed.USA.Wiley, P.3-15.

Archive of SID

www.SID.ir

7- Mcfeters, G. A., K.C.Marshall., and W. G. Characklis. 1990. The microbial cell physiological ecology in biofilm systems. In : Characklis G.W. and K.C. Marshall editor. biofilms .3 the.USA.wiley, p.42-45.
8- Writanen, G., and T. Sandholm. 1993. Epifluorescence image analysis and cultiration of foodborne biofilme bacteria grown on stainless steel surface. Journal of Food Protection, 56:678-683.
9- Zheng, Z., and P. S. Stewart. 2002. Penetration of rifampin through *staphylococcus epidermidis* biofilms.Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 49:900-903.
10- Zottola, E. A. 1994.Microbial attachment and biofilm formation: a new problem in food industry. Journal Food Technology, 48:107-114.
11- Zulfiqar, A. M., A. Mubashir., M. Naseem khan., I. Lai., N. Hassan., and S. I. Kan. 2013. Biofilm formation and dispersal of *staphylococcus aureus* under the influence of oxacillin. Journal Microbial Pathogenesis, 62:66-72.

Archive of SID

www.SID.ir

Iranian Journal of Animal Science Research
Vol. 8, No. 1, Spring 2016, p. 18-25

نشریه پژوهشهای علوم دامی ایران
جلد 8، شماره 1، بهار 1395، ص. 25-18

Comparing Methods of Separating Bacterial Biofilms on the Surface of Water Transportation Pipes and Equipment of Milking in the Farms

S. Nabizadeh Asl[1*]-R. Valizadeh[2]

Received: 24-8-2013
Accepted: 15-9-2013

Introduction Bacterial biofilms can be both useful and harmful based on their combination and locations. Biofilm formation occurs as a stepwise process. Their formation in liquid transportation pipes used for milking system and drinking water in animal farms may create some problems and is a potential source of pollution. Speed of biofilm formation depends on many factors including: construction and functional characteristics of bacteria, the composition and culture conditions such as temperature and substratum. In this research the *Bacillus subtillis* bacteria with special characteristics was selected due to its capability for biofilm creation. *Bacillus subtillis* bacteria is mobility and a stronger connection than other bacteria levels are created. In the research conducted in the biofilm there are many resources on biofilm formation by *Bacillus subtillis* bacteria. *Bacillus subtillis* is saprophytic in the soil, water and air. There is also the ability to form spores of *Bacillus subtillis.*

Materials and Methods Firstly the possibility of creating biofilms on different Plastic (polyvinilchlorid, polypropylene, polyethylengelycole), alluminum and glass surfaces in three temperatures of 4°C, 30°C and 37°C were studied. Two different methods of biofilms separation including separating swap and vortex were tested and their efficienceies were calculated. After biofilm formation on parts of the vortex separation method after washing parts in sterile conditions in a tube containing normal saline for 4 minutes was vortex. The bacterial suspension decreasing dilution series was created. Pour plate in medium using agar plate count agar and was cultured at 30°C for 24-48 hours. Numbers of colonies were counted. The numbers of biofilm cells were calculated. In swap method after biofilm formation on parts using a cotton swap was isolated biofilms. The swap was transferred to tube containing normal saline and the bacterial suspension decreasing dilution series was created. Pour plate in medium using agar plate count agar and was cultured at 30°C for 24-48 hours. Numbers of colonies were counted. The numbers of biofilm cells were calculated.

Results and Discussion *Bacillus subtillis* biofilms were formed on all studied surfaces. Total count of bacteria detached from biofilm indicates that these bacteria can develop on the polypropylene surface much more than the other surfaces. 10 days later, the formation of biofilm reached the maximum level. The optimum temperature was 30°C. The vortex method was more efficient in comparison to other methods. The bacterial attachment was highest with the plastic surface, specially the propylene surface; whereas the lowest attachment was detected in the glass surfaces. Synthetic materials based on hydrocarbons are more susceptible to the formation of biofilm and infection. Generally lower levels are microscopic pores and also less likely to form a biofilm. Rusty pipes, old, worn-out and scratched plastic furniture raised the possibility of contamination and could cause problems.

Conclusion It was concluded that glass pipes are the best materials for liquid transportation in different forms of animal farms. According to this study, basic methods of removing biofilm and enable ranchers to make good use of the equipment and the practical methods of removing contaminants help.

Keywords: *Bacillus subtillis*, Biofilm, Swap, Vortex.

Archive of SID

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad International Campus, Mashhad, Iran and Member of Scientific Bord, Department of Biology, Basic Science Faculty, Roudehen, Islamic Azad University, Roudehen, Iran.
2- Professor, Departement of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran
(*- Corresponding author email: se_Nabizadeh@yahoo.com)

www.SID.ir