بررسی تشکیل بیوفیلم میکروکوکوس لوتئوس و سنجش اثر عوامل ضد میکروبی بر روی آن توسط روش میکروپلیت

شهریار شاکری، روحا کسری کرمانشاهی و گیتی امتیازی

دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی

چکیده

میکروکوکوس لوتئوس باکتری است که در محیطهای آبی و سیستمهای صنعتی به فراوانی یافت می شود و توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم و در نتیجه ایجاد مشکل در این سیستمها را دارد. در این تحقیق بعد از نمونه برداری از دیواره برجهای خنک کننده، جداسازی باکتری میکروکوکوس لوتئوس و در نهایت شناسایی آن صورت گرفت. سپس برای سنجش هیدروفوبیسیتی سطح سلولهای پلانکتونیک ایـن باکتـری از روش MATH (اتصال باکتریها به هیدروکربن) استفاده شد. همچنین بررسی تشکیل بیوفیلم میکروکوکوس لوتئوس و میزان رشد آن ازطریق تشکیل بیوفیلم روی اسلاید شیشه ای و رنگ آمیزی و شمارش سلولهای درون بیوفیلم صورت گرفت. در نهایت سنجش اثر عوامل ضد میکروبی بر روی بیوفیلم این باکتری بمنظور حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای مولد آن توسط روش میکروپلیت انجام شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که درصد اتصال یا هیدروفوبیسیتی سطح سلول این باکتری و نسبت رشد آن در بیوفیلم بسیار بالا می باشد. همچنین مشخص شد که نمی توان بیوفیلمهای پایدار را با بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل سولفاتیازول حذف کرد. در حقیقت این بیوسایدها را باید همراه با دیگر بیوسایدها، برای کنترل بیوفیلم بکار برد. اما توانایی حذف بیوفیلم توسط بیوسایدهای اکسید کننده مثل H_2O_2 و NaOCl در مقایسه با غیر اکسید کننده ها بسیار بالا می باشد. در نتیجه این بیوسایدها برای کنترل بیوفیلمهای پایدار روی سطح مناسب می باشند. همچنین اثر بیوسایدهایی مثل الکیل دی متیل بنزیل آمونیوم کلراید با خاصیت دترجنتی در حذف بیوفیلم همانند بـیوسایدهـای اکسـید کنـنده می باشد.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، عوامل ضد میکروبی، هیدروفوبیسیتی، میکروکوکوس لوتئوس

مقدمه

بیوفیلمها در سال ۱۹۷۸ توسط کاسترتون در مورد باکتریها شرح داده شدند (٤و ٥). این ساختارها شامل جمعیت میکروارگانیسمهای اتصال یافته به سطوح غوطه ور در محیط های آبی است که خصوصیات متفاوتی از سلولهای منفرد یا پلانکتونیک دارد (۸). تشکیل بیوفیلم شامل مراحل زیر می باشد: ۱- اتصال برگشت پذیر سلول های پلانکتونیک به سطوح ۲- اتصال برگشت ناپذیر سلولها و تشکیل میکروکلنی ۳- تولید مواد پلیمری خارج سلولی ٤- بلوغ نهایی بیوفیلم(۳). بیوفیلمها می توانند بر روی سطوح مختلفی تشکیل شوند(۲). از این رو بدلیل تنوع در اتصال به سطح در زمینه های زیادی از جمله صنعت از اهمیت خاصی برخوردار می باشند(۷و۱۸). برای مثال تشکیل بیوفیلم میکروکوکوس لوتئوس در سیستمهای صنعتی مثل سیستمهای خنک کننده آب می تواند صدمات جبران ناپذیری به سیستم وارد کند(۱۱). می توان گفت که اتصالات و ارتباطات سطحی اولیه بین میکروارگانیسمها با سطح و با میکروارگانیسمهای دیگر، نقشی اساسی در گسترش بیوفیلم بازی می کند. باکتری میکروکوکوس لوتئوس در سیستمهای آبی به فراوانی یافت می شود و

Archive of SID
www.SID.ir

توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم دارد. اخیراً مشخص شده است که این باکتری توانایی اتصال به اکثر باکتریهای درون سیستم آبی را دارد و می تواند با اتصال به این باکتریها و همچنین سطوح غوطه ور در آب سبب تشکیل بیوفیلم و گسترش این ساختار ها شود(۳). در نتیجه بیوفیلم این باکتری می تواند سبب خوردگی لوله ها، کاهش جریان آب در سیستم و عدم انتقال حرارت شود(۱۱). هدف این تحقیق بررسی هیدروفوبیسیتی سطح سلول این باکتری، تشکیل بیوفیلم آن و همچنین سنجش اثر عوامل ضد میکروبی شامل بیوساید های اکسید کننده، غیر اکسید کننده و بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی بر روی بیوفیلم این باکتری به منظور حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای مولد آن می باشد.

مواد و روش ها

نمونه برداری از دیواره برج های خنک کننده و جداسازی باکتری: برای نمونه برداری از ظروف خاص استریل شده استفاده گردید. بدین صورت که لایه های نازک چسبیده به دیواره برج های خنک کننده کارخانه پلی اکریل اصفهان، توسط یک قاشقک استریل برداشته شد و داخل ظروف نمونه برداری قرار گرفت.

سپس نمونه ها سریعاً به آزمایشگاه انتقال یافت و در نهایت سری رقت تهیه و سپس روی محیط تریپتیکاز سوی آگار یا TSA (Merck, Darmstadt, Germany) کشت شد. بعد از ٢٤ ساعت آنکوباسیون در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد جداسازی اولیه باکتریها صورت گرفت(۱۰) و در نهایت شناسایی باکتری میکروکوکوس لوتئوس از طریق تستهای بیوشیمیایی و با توجه به کتاب باکتری شناسی برگی انجام شد(۹).

تعیین هیدروفوبیسیتی سطح سلولهای پلانکتونیک: برای سنجش هیدروفوبیسیتی سطح سلولهای پلانکتونیک این باکتری از روش MATH (اتصال باکتریها به هیدروکربن) استفاده شد(١٤). برای این منظور یک کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته از این باکتری (Overnight culture) در لوله های حاوی تریپتیکاز سوی براث یا TSB (Merck, Darmstadt, Germany) در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد تهیه شد. سپس با سانتریفیوژ سلولهای باکتری در دور ۳۰۰۰ RPM و بمدت ۱۵ دقیقه توسط دستگاه (مدلSigma 3-E-1) جمع آوری شد. مایع رویی را دور ریخته و به سلولهای ته نشین شده در ته لوله، بافر فسفات سالین (که ترکیبات آن شامل $NaCl, KH_2Po_4, Na_2HPo_4, KCl$ می باشد) اضافه گردید. سپس کدورت این سوسپانسیون از طریق خواندن جذب نوری آن با اسپکتروفتومتر(مدل Milton Roy) در طول موج ٦٤٠ nm بین ۰۸/. تا ۱/. تنظیم شد. این سوسپانسیون تقریباً حاوی 10^8 سلول در هر میلی لیتر می باشد. ۳/۵ ml از این سوسپانسیون در یک لوله کووت ریخته و جذب نوری(OD) آن در nm ٦٤٠ خوانده شد. این OD بعنوان A_1 یا جذب نوری اولیه گزارش گردید. سپس ۵/. ml از هیدروکربن اکتان به این سوسپانسیون اضافه نموده و لوله بمدت ۲ دقیقه ورتکس شد. عمل هم زدن برای افزایش سطح اتصال باکتریهای موجود در سوسپانسیون و هیدروکربن اکتان صورت گرفت. بعد از این مدت لوله کووت بمدت ۱۵ دقیقه در یک محل بصورت ساکن قرار داده شد تا دو فاز آبی و آلی از هم جدا شوند. در نهایت جذب نوری فاز آبی در ٦٤٠ nm خوانده شد. این OD بعنوان جذب نوری ثانویه یا A_2 گزارش شد. شاهد در این آزمایش بافر فسفات سالین فاقد سلولهای باکتری می باشد که همراه با هیدروکربن هم زده شد. در نهایت نسبت سلولهایی که از فاز آبی خارج شده اند بعنوان نتیجه در نظر گرفته شد. این نسبت از فرمول زیر بدست می آید(۱۵).

درصد سلول های متصل به هیدروکربن اکتان = $\{ A_1 - A_2/A_1 \} \times 100$

Archive of SID
www.SID.ir

بمنظور مقایسه هیدروفوبیسیتی سطح سلول باکتری میکروکوکوس لوتئوس، این آزمایش نیز برای باکتری استاندارد *Pseudomonas aeruginosa* PTCC 1074 , ATCC 9027 هم انجام گردید. این آزمایش ٦ بار تکرار شد(۱۳).

بررسی تشکیل بیوفیلم میکروکوکوس لوتئوس و میزان رشد آن: برای بررسی تشکیل بیوفیلم این باکتری، ابتدا یک لوپ پر از کلنی باکتری از محیط TSA به یک لوله حاوی TSB ٥ ml تلقیح و این لوله بمدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه می گردد. بعد از گذشت این مدت و فعال شدن باکتریها، از این محیط ml ٥/. سوسپانسیون باکتری به یک ارلن حاوی دو اسلاید شیشه ای که بطور عمودی در ml ٥٠ محیط TSB غوطه ور هستند، تلقیح شد. سطح این اسلاید ها قبل از ورود به محیط کشت مایع با اتانل بمنظور حذف چربیها شسته شده است و بعد از غوطه وری ارلن ها اتوکلاو شدند. در این آزمایش ٦ ارلن بدین صورت با سوسپانسیون باکتری تلقیح و سپس در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد روی شیکر با دور RPM ۱۰۰ قرار داده شدند.(۳ و ۸). بعد از گذشت ٤، ۸، ۱۲، ۱٦، ۲۰ و ۲٤ ساعت دو اسلاید شیشه ای از یک ارلن خارج شده و هر دو با آب مقطر استریل شسته شد و در نهایت یکی از اسلایدها با رنگ کریستال ویوله ۲٪ بمدت ٥ دقیقه رنگ آمیزی شد و سپس توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت و اسلاید دیگر برای شمارش باکتریهای درون بیوفیلم بکار رفت.

سنجش اثر عوامل ضد میکروبی روی بیوفیلم باکتری میکروکوکوس لوتئوس بمنظور حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای مولدآن با روش میکروپلیت: در این تحقیق اثر بیوسایدهای اکسید کننده(سدیم هیپوکلرایت و پراکسید هیدروژن)، بیوسایدهای غیر اکسیدکننده (سولفاتیازول) و بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی مثل الکیل دی متیل بنزیل آمونیوم کلراید(ADBAC) با غلظتهای متفاوت و بر حسب ppm توسط روش جدید میکروپلیت بر روی بیوفیلم میکروکوکوس لوتئوس مورد بررسی قرار گرفت. برای سنجش اثر این مواد بمنظور حذف و یا کشتن سلولهای مولد بیوفیلم، بعد از آماده سازی کشت ٢٤ ساعته از باکتری و تهیه سوسپانسیون میکروبی با کدورت معادل ۰/٥ مک فارلند، این سوسپانسیون به نسبت ۱به ۱۰۰رقیق شد و تمام چاهکها در یک میکروپلیت ۹٦ خانه ای با ۲٥۰ میکرولیتر از این محیط پر شدند. جنس میکروپلیتها از پلی استیرن می باشد و هر کدام دارای ۸ ردیف و ۱۲ ستون می باشند. بعد از تلقیح، سطح پلیتها پوشیده شد و آنکوباسیون بمدت ٢٤ ساعت در ۳۰ درجه سانتیگراد صورت گرفت. بعد از گذشت این مدت، محیط کشت داخل چاهکها تخلیه شد و شستشوی چاهکها ۳ مرتبه با بافر فسفات سالین صورت گرفت. سپس µl ۲٥۰ از عوامل ضد میکروبی با غلظت های معین به چاهکها اضافه شد. تمام عوامل ضد میکروبی بمدت ۱ ساعت روی بیوفیلم موجود در چاهکها اثر داده شد. همچنین عوامل ضد میکروبی هر ۲۰ دقیقه مجدداً تخلیه و دوباره اضافه می شدند. در این آزمایش هر ۸ چاهک در یک ستون یک تیمار مشابه دریافت می کردند. علاوه بر ستونهای تیمارشده، ستونهای کنترل (بدون تیمار و حاوی بیوفیلم) و یک ستون شاهد (استریل بدون بیوفیلم) هم در هر کدام از میکروپلیتها وجود داشت. بعد از گذشت یک ساعت، عوامل ضد میکروبی خارج و بعد از سه بار شستشو با بافر فسفات سالین هر چاهک با µl۲۰۰ از کریستال ویوله ۲٪ (CV) بمدت ٥ دقیقه و یا تری فنیل تترا زولیوم کلراید ۰/۲ ٪ (TTC) بمدت ۲ ساعت رنگ شد. سپس چاهکها شسته شد و با ۲۰۰ میکرولیتر از اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ بعنوان حلال پر شدند و بع از ۱٥ دقیقه آنکوباسیون پلیتها بمنظور حل شدن رنگها تکان داده شدند و سپس جذب

Archive of SID

www.SID.ir

نوری چاهکهای رنگ شده با کریستال ویوله در nm ٤٩٢ و چاهکهای رنگ شده با تری فنیل تترا زولیوم کلراید در nm ٤٥٠ توسط دستگاه ELIZA Reader(STAT FAX 2100) خوانده شد. در نهایت سنجش کارآیی بیوساید برای حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای مولد آن از طریق فرمول زیر محاسبه شد(۱۷).

کارآیی بیوساید = { (C-B) - (T-B)/(C-B) } × 100

C بیانگر میانگین OD یا جذب نوری چاهکهای کنترل، B بیانگر میانگین OD چاهکهای شاهد و T بیانگر میانگین OD چاهکهای تیمار شده با بیوساید می باشد(۱٦و ۱۷).

آنالیز های آماری: اختلاف بین میانگینهای بدست آمده در آزمایشات بالا، توسط آزمون ویلکاکسون برای نمونه های مستقل و ذوج شده محاسبه شد(۱۷).

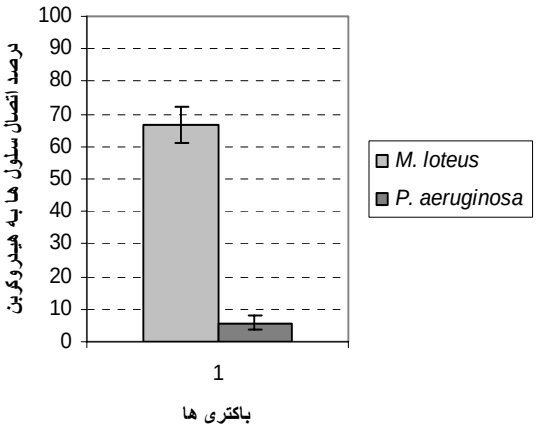
نتایج

نتایج مربوط به تستهای شناسایی باکتری میکروکوکوس لوتئوس در جدول (۱) نشان داده شده اند. این باکتری g+ و کوکسی می باشد که بر اساس محیط زندگی آن و عدم توانایی در تخمیر گلوکز از استافیلوکوکها تشخیص داده می شود. این باکتری در سیستمهای آبی به فراوانی یافت می شود و با اینکه فاقد قدرت حرکت می باشد، توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم دارد.

جدول ۱ : بعضی خصوصیات بیوشیمیایی باکتری میکروکوکوس لوتئوس

تست / باکتری	حرکت	اکسیداز	کاتالاز	VP	پیگمان	احیاء نیترات	تولید اسید از			هیدرولیز آرژینین
							سوکروز	فروکتوز	گلوکز	
Micrococcus luteus	–	+	+	–	زرد	–	–	–	–	–

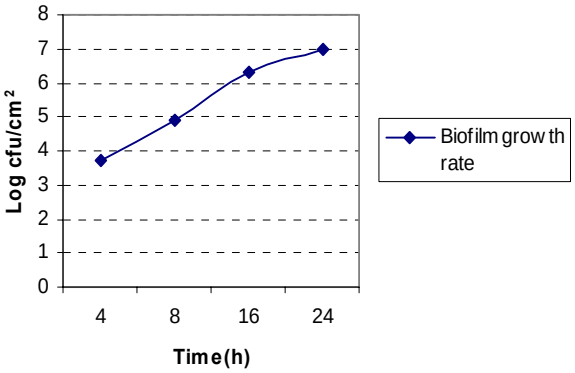
در تست MATH برای سنجش هیدروفوبیسیتی از هیدروکربن اکتان استفاده شد. این هیدروکربن آبگریز می باشد و روی فاز آبی یک فاز آلی تشکیل می دهد. با توجه به این نکته باکتریهایی که سطح سلول آنها دارای هیدروفوبیسیتی بالا باشد بعد از مخلوط کردن این دو فاز به قطرات هیدروکربن متصل می شود. شکل (۱) مقایسه هیدروفوبیسیتی سطح سلول این باکتری با سودوموناس آئروژینوزا را نشان می دهد.همانطور که در این شکل دیده می شود درصد اتصال یا هیدروفوبیسیتی باکتری میکروکوکوس نزدیک به ٦٦٪ می باشد. یعنی ٦٦٪ از سلولهای باکتری به قطرات هیدروکربن متصل شده اند. این در صورتی است که هیدروفوبیسیتی سطح سلول سودوموناس که بعنوان باکتری استاندارد در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفت برابر با ۵/۷ ٪ است. در حقیقت تفاوت بین این دو دارای اختلاف معنی دار است.



شکل ۱ : مقایسه بین هیدروفوبیسیتی سطح سلولها در باکتری میکروکوکوس لوتئوس و سودوموناس آئروژینوزا

www.SID.ir

همچنین نسبت رشد این باکتری در شکل (۲) نشان داده شده است. بیشترین رشد نزدیک بـه $۱۰^{۸}$ cfu/cm^2 می باشد که مربوط به ساعت ۲٤ از نمونه برداری است.



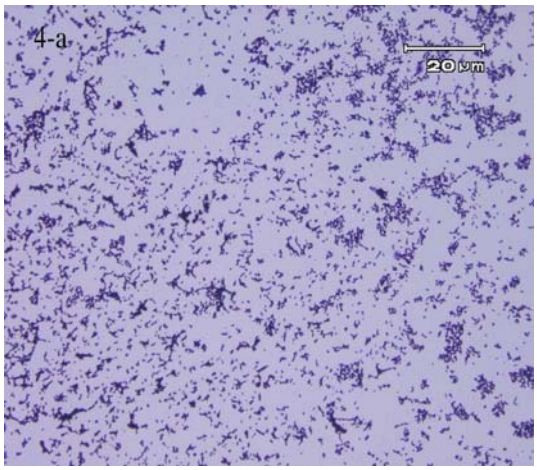
شکل ۲ : نسبت رشد باکتریها درون بیوفیلم در مدت زمان ۲٤ ساعت بر حسب Log cfu/cm^2

شکل (۳) مراحل تشکیل بیوفیلم را نشان می دهد. در شکل (a- ۳) باکتریها بصورت پلانکتونیک و پراکنده به سطح لام چسبیده اند. این باکتری ها توانایی جداشدن از سطح را دارند و می توانند دوباره بصورت شناور در محیط در آیند. در شکل (b-۳) اتصالات برگشت ناپذیر باکتریها به سطح و به یکدیگر (Co- aggregation) براحتی قابل تشخیص می باشد. این مرحله از تشکیل بیوفیلم بدلیل پیشرفت اتصالات باکتریها بسیار اهمیت دارد. در این مرحله باکتریها تکثیر پیدا کرده و میکروکلنیها را تشکیل می دهند. در شکل (c- ۳) این میکروکلنیها بزرگ شده و همچنین تولید پلی ساکارید خارج سلولی افزایش پیدا می کند و بیوفیلم تشکیل می شود. شکل (d- ۳) نیز یک بیوفیلم بالغ را نشان می دهد که کل سطح لام را پوشانیده است و به سختی از سطح لام کنده می شود.

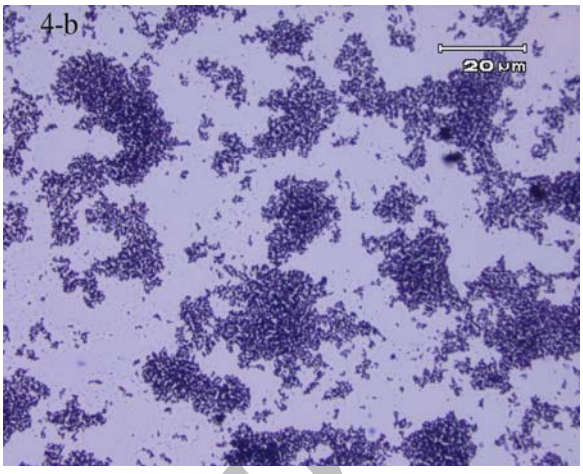
همانطور که گفته شد در تشکیل بیوفیلم اتصالات بین باکتریها از اهمیت خاصی برخوردار است. این اتصالات در شکل (e- ۳) بخوبی نشان داده شده اند. در این شکل سلولهای باکتری میکروکوکوس تحت یک نیروی خارجی مثل فشار آب قرار گرفته و گرچه از ساختمان بیوفیلم خارج شده اند، اما هرگز جدایی آنها از بیوفیلم صورت نگرفته است. زیرا توسط پلی ساکاریدهای خارج سلولی یا (EPS) به ساختمان اصلی بیوفیلم و همچنین به دیگر سلولها متصل می باشند.

اثر بیوساید ها روی بیوفیلم این باکتری در شکل (٤) نشان داده شده است. در این آزمایش برای بررسی اثر عوامل ضد میکروبی در حذف بیوفیلم از رنگ کریستال ویوله (CV) استفاده شد. این رنگ توانایی این را دارد که کل بیوفیلم متصل به دیواره چاهکها را رنگ کند. و در نتیجه می توان از آن در سنجش حذف بیوفیلم استفاده کرد. همچنین برای تعیین کشته شدن سلولها در بیوفیلم توسط عوامل ضد میکروبی از رنگ تری فنیل تترا زولیوم کلراید یا (TTC) که یک رنگ تنفسی است استفاده شد. در حقیقت باکتریهای فعال و زنده می توانند توسط آنزیم دهیدروژناز خود این ترکیب بی رنگ را احیاء کرده و و آن را به رنگ قرمز در آورند که در نهایت OD آن در طول موج ٤٥٠ nm توسط دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده می شود. همانطور که در شکل (- a ٤) دیده می شود هیپوکلریت سدیم با غلظت ppm ۱ توانایی حذف ۳۰٪ از کل بیوفیلم را دارد و در غلظت ppm ۱۰،۷۰ ٪ از بیوفیلم را حذف کرده است. این در حالی است که در این غلظتها بترتیب نزدیک به ٦۱ و ۹٦٪ از سلول ها مرده اند(اختلاف معنی دار با توجه به تست ویلکاکسون). پتانسیل حذف بیوفیلم توسط این بیوساید در غلظتهای ppm ۱۰۰۰ و ۱۰۰ به ۱۰۰٪ می رسد یعنی در این غلظتها هیچ اثری از بیوفیلم در چاهکها دیده نمی شود. شکلهای (b- ٤) و (c- ٤) مربوط به H_2O_2 و ADBAC می باشند. با توجه به این شکل ها در غلظتهای ۵۰۰ تا ppm ۲۰۰۰ از H_2O_2 و ٤۰۰ تا ppm ۷۰۰ از ADBAC هیچ اثری از بیوفیلم دیده نمی شود. می توان گفت که این دو بیوساید

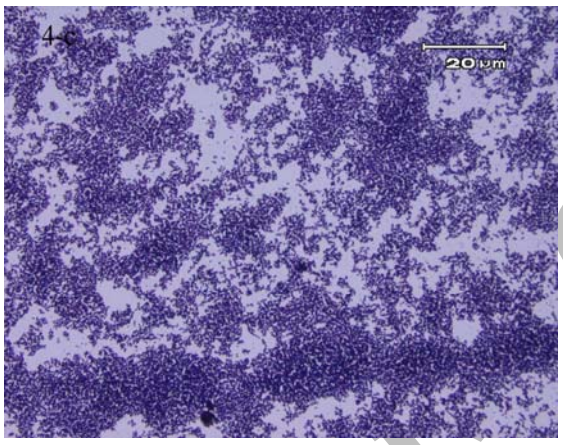
Archive of SID
www.SID.ir



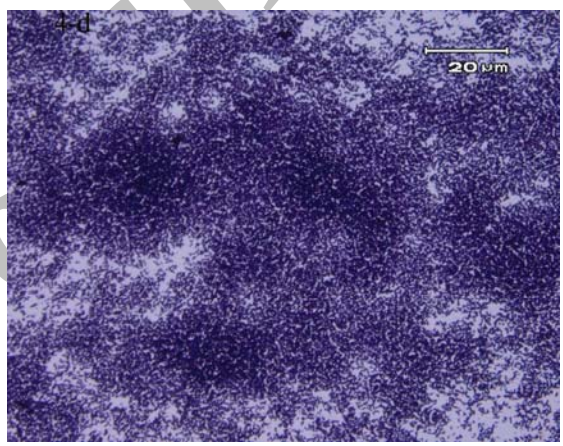
(۳ -a)



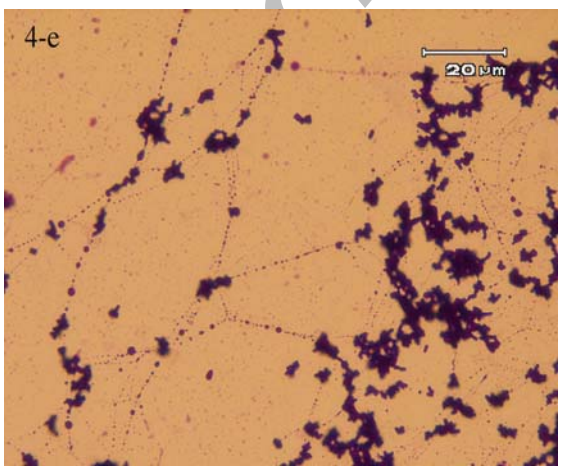
(۳-b)



(۳ -c)



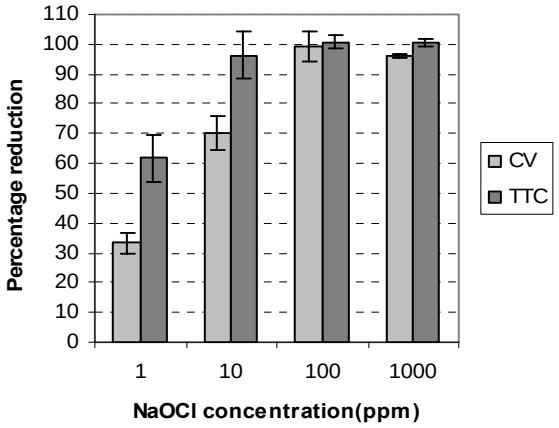
(۳ -d)



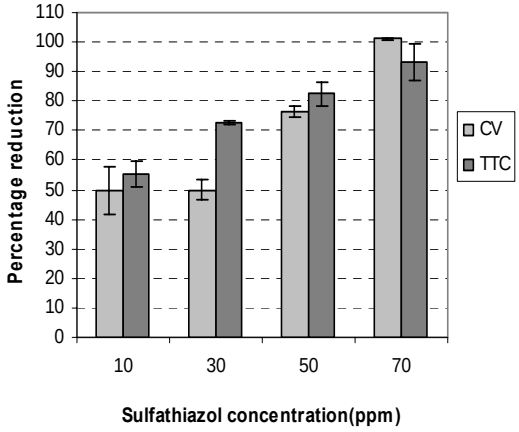
(۳-e)

شکل ۳ : شکلهای (a-d) با بزرگنمایی ٤۰ و استفاده از فیلتر زرد مراحل تشکیل بیوفیلم را در باکتری میکروکوکوس لوتئوس نشان می دهند. در شکل (۳-e) با بزرگنمایی۱۰۰ و استفاده از فیلتر آبی اتصالات بین سلولهای باکتری و پلی ساکارید خارج سلولی دیده می شود که دلیلی بر مقاومت ساختاری بیوفیلم می باشد.

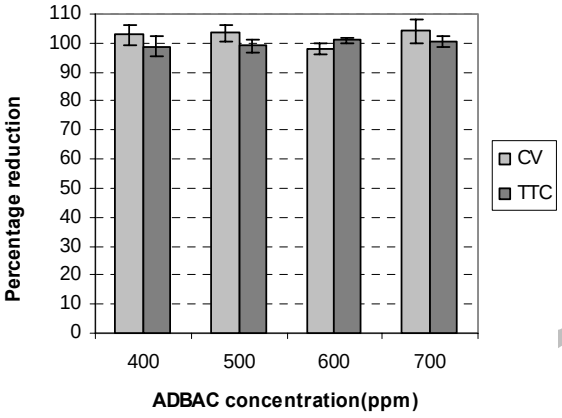
www.SID.ir



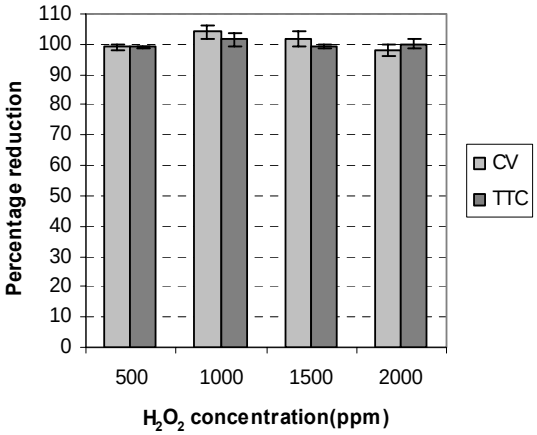
٤-a



٤-b



٤-c



٤-d

شکل ٤ : نمودارهای a تا d اثرات حذفی و کشندگی بیوسایدها که بترتیب توسط کریستال ویوله(CV) و تری فنیل تترا زولیوم کلراید (TTC) مشخص شده اند را نشان می دهند. اختلاف معنی دار بین میانگینها بوسیله آزمون ویل کاکسون مورد بررسی قرار گرفت. برای توضیح بیشتر به متن مراجعه کنید. (NaOCl = سدیم هیپوکلرایت، H_2O_2 = آب اکسیژنه، ADBAC = آلکیل دی متیل بنزیل آمونیوم کلراید).

توانایی بالایی در حذف بیوفیلم از سطوح و کشتن سلولهای مولد آن را دارند. شکل (d- ٤) مربوط به بیوساید سولفاتیازول می باشد. با توجه به این شکل در غلظت ppm ۱۰ این بیوساید، ٤۹٪ از بیوفیلم حذف شده است. همچنین کارایی بیوساید برای کشتن سلولهای درون بیوفیلم برابر با ۵۵٪ می باشد که اختلاف معنی داری با اثر حذفی آن ندارد. یعنی اینکه این بیوساید در این غلظت از اثر کشندگی خوبی برخوردار نیست. با افزایش غلظت بیوساید تا ppm ۷۰ اثر حذفی این بیوساید نیز افزایش می یابد. اما هیچ اختلاف معنی داری در غلظتهای ۵۰ و ppm ۷۰ وجود ندارد. یعنی اینکه این بیوساید توانایی کشتن سلولها را ندارد. تنها اختلاف معنی دار بین میانگینها در غلظت ppm ۳۰ وجود دارد.

www.SID.ir

بحث

تشکیل بیوفیلم سبب می شود که باکتریها به عوامل ضد میکروبی مقاوم شوند(۱، ٦ و۱۱). این مقاومت بیوفیلم در برابر عوامل مخرب، جنبه های مضر فراوانی در زمینه های متفاوت از جمله صنعت دارد(۱۰). اولین مرحله تشکیل بیوفیلم همانطور که گفته شد اتصال سلولهای باکتری به سطوح می باشد که عوامل زیادی از جمله حرکت باکتریها، هیدروفوبیسیتی سطح آنها، جنس سطح مورد اتصال و ... در آن نقش دارند(۳). روزنبرگ و همکاران گزارش کردند که بالا بودن هیدروفوبیسیتی سطح سلولها سبب می شود که باکتری تمایل بیشتری برای اتصال به سطوح داشته باشد که در نتیجه سبب شروع تشکیل بیوفیلم و بروز اثرات مخرب آن می شود(۱۵). در این بررسی هیدروفوبیسیتی سطح سلول باکتری میکروکوکوس نسبت به باکتری استاندارد بسیار بالا می باشد که این خود تمایل زیاد این باکتری را برای تشکیل بیوفیلم نشان می دهد(۱۳).

استووارت و همکاران گزارش کردند که حذف ناقص بیوفیلم از سطح توسط عوامل ضد میکروبی منجر به رشد مجدد سلولهای باقی مانده در بیوفیلم می شود و بیوفیلم بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود بر می گردد(۱۷). نسبت رشد یا سینتیک رشد بیوفیلم باکتری میکروکوکوس نشان می دهد که بعد از گذشت مدت زمان ٢٤ ساعت بیوفیلم به بیشترین میزان رشد خود رسیده است. که این مورد در شکل ۲ و ۳(a تا d) به وضوح قابل تشخیص است.تعداد زیاد سلولها در بیوفیلم و احاطه شدن آنها در یک ماتریکس پلی ساکاریدی، آنها را نسبت به عوامل ضد میکروبی مقاوم می سازد(۸). این ماتریکس پلی ساکاریدی یا EPS که ساختمان اصلی بیوفیلم را تشکیل داده از نفوذ عوامل ضد میکروبی به بیوفیلم جلوگیری می کند(۸). همچنین سلولها توسط این ماتریکس بهم متصل شده و در برابر عوامل فیزیکی از جمله نیروی هیدرودینامیک آب از خود مقاومت نشان می دهند و به سختی از ساختمان بیوفیلم جدا می شوند. از این رو استفاده از بیوسایدهایی که توانایی بالایی در حذف و هم در کشتن سلولهای درون بیوفیلم دارند و عدم آلودگی محیط زیست توسط آنها از اهمیت خاصی برخوردار است(۱۷). H_2O_2 و NaOCl عمومی ترین بیوسایدهای اکسید کننده هستند که در کنترل بیوفیلم کاربرد دارند و گزارش شده استکه H_2O_2 در غلظتهای بالاتر از ppm ۳۰۰۰۰ می تواند برای ضدعفونی کردن پوست نیز بکار رود(۱۹). می توان گفت که این دو بیوساید توانایی بالایی در حذف بیوفیلم از سطوح و کشتن سلولهای مولد آن را دارند. البته در کاربرد NaOCl باید به این نکته توجه داشت که کاهش pH در سیستم سبب خورنده شدن یون کلرین می گردد. در نتیجه عمل این بیوساید وابسته به pH می باشد(۹ و ۱۲).

ترکیبات آمونیوم چهار ظرفیتی مثل ADBAC نیز در حذف و کشتن سلولهای درون بیوفیلم اثر خوبی دارند. این ترکیبات علاوه بر کنترل بیوفیلم بعنوان مهارکننده خوردگی نیز مورد استفاده قرار می گیرند اما مشکلی که این ترکیبات برای سیستم ایجاد می کنند تولید کف است(۱۰و ۱۲). سولفاتیازول نیز بدلیل حذف ناقص بیوفیلم (در غلظتهای مورد آزمایش) بتنهایی مورد استفاده قرار نمی گیرد و باید استفاده از این بیوساید همراه با بیوسایدهای دیگر صورت گیرد(۱۰). با توجه به توضیحات و نتایج بدست آمده می توان اینچنین پیشنهاد نمود که کنترل بیوفیلمهای پایدار با بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل سولفاتیازول انجام نشود. در حقیقت این بیوسایدها را باید همراه با دیگر بیوسایدها و برای جلوگیری از رشد بیوفیلم بکار برد.یعنی در حالتی که بیوفیلم هنوز رشد نکرده است، کاربرد این بیوسایدها مناسب می باشد. همچنین می توان گفت که توانایی حذف بیوفیلم توسط بیوسایدهای اکسید کننده مثل

Archive of SID
www.SID.ir

H_2O_2 و NaOCl در مقایسه با غیر اکسید کننده ها بسیار بالا می باشد. در نتیجه این بیوسایدها برای کنترل بیوفیلم های پایدار روی سطح، مناسب می باشند(۱۰).

همچنین استفاده از بیوسایدهایی مثل الکیل دی متیل بنزیل آمونیوم کلراید با خاصیت دترجنتی می تواند در کنترل بیوفیلم مفید باشد.

منابع

1. Austin, J. W. and Bergeron, G. 1990. Development of bacterial biofilms in dairy processing lines. Journal Dairy Research **62**: 509-519.
2. Baty, A. M., Suci, P. A., Tyler, B. J. and Geesey, G. G. 1996. Investigation of mussel adhesive protein adsorption on polystyrene and polyoctadecyl methacrylate using angle dependent XPS, ATR- TIR and AFM. Journal of Colloid Interface Science **177**: 307–315.
3. Bos, R. and Mei, H. C. 1999. Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions. FEMS Microbiology Reviews **23**: 179-230.
4. Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. 1978. How bacteria stick. Scientific American **238**: 86–5.
5. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D. R. and Lappinscott, H. M. 1995. Microbial biofilms. Annual Reviews of Microbiology **49**: 711–745.
6. Danese, P. N., Pratt, L. A. and Kolter, R. 2001. Biofilm formation as a developmental process. Methods in Enzymology **336**: 19–26.
7. Davey, M. E., Toole, G. A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews **64**: 847–867.
8. Gubner, R. and Beech, I. B. 2000. The effect of extracellular polymeric substances on the attachment of *Pseudomonas* NCIMB 2021 to AISI 304 and 316 stainless steel. Biofouling **15**: 25–36.
9. Krieg, N. R. and et al. 1998. Bergeys Manual of Determinative for Bacteriology. Williams and Wilkins, New York.
10. Ludensky, M. 2003. Control and monitoring of biofilms in industrial applications. International Biodeterioration and Biodegradation **51**: 255-263
11. Mah, T. F. C. and Toole, G. A. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in Microbiology **9**: 34–39.
12. Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. International Biodeterioration and Biodegradation **51**: 249-253.
13. Mozes, N., and P. G. Rouxhet. 1987. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. Journal of Microbiology Methods. **6** :99–112.
14. Percival, S., Beech, I. B., Knapp, G., Edyvean, R. G. J. and Wales, D. S. 1997. Biofilm development on stainless steel 304 and 316 in a potable water system. Journal of the Institute of Water and Environmental Management **11**: 289–294.
15. Rosenberg, M., D. Gutnick, and E. Rosenberg. 1980. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiology Letters. **9**:29–33.
16. Stepanovic, S. and Vukovic, D. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiological Methods **40**: 175-179.
17. Stewart, S. P., Zelver, N., Hamilton, A. M. and Pitts, B. 2003. A microtiter plate screening method for biofilm disinfection and removal. Journal of Microbiological Methods **54**: 269-276.
18. Svensalter, G., Larsson, U. B., Greif, E. C. G., Cvitkovitch, D. G. and Hamilton, I. R. 1997. Acid tolerance response and survival by oral bacteria. Oral Microbiology and Immunology **12**: 266-273.
19. Videla, H. 2002. Prevention and control of biocorrosion. International Biodeterioration and Biodegradation **49**: 259-270.

Archive of SID
www.SID.ir

Study of *Micrococcus luteus* biofilm formation and evaluation of antimicrobial effects on its biofilm by microtiter plate test

Shakeri Sh., kasra kermanshahi R., and Emtiazi G.

Biology Dept., Faculty of sciences, Isfahan Univ., Isfahan, I.R. of Iran

Abstract

Micrococcus luteus is one of the bacteria that exists in water and industrial systems and shows high potential for biofilm formation. *M. luteus* cause some problems in these systems. In this study isolation and identification of *M. luteus* were performed of biofilm from cooling tower. Cell surface hydrophobicity, biofilm formation and growth rate were measured by MATH and slide test methods with staining and numbering respectively. The effect of antimicrobial agents in biofilm removal and killing was evaluated by microtiter plate test. Results showed a high degree of bacteria cell surface hydrophobicity and biofilm growth rate. So indicated that non- oxidizing biocides such as sulfathiazol are unable for biofilm removal. In fact this biocide is suitable together with other biocide for control of stable biofilms. But ability of oxidizing biocide such as H_2O_2 and NaOCl for remove the biofilm are very high than non- oxidizing biocides. As a result these biocides are suitable for control the stable biofilms on the surfaces. Also biocides with detergenic properties such as ADBAC act as oxidizing biocides in order to remove the biofilm.

Key words: biofilm, antimicrobial agents, hydrophobicity, *Micrococcus luteus*

Archive of SID

www.SID.ir