Archive of SID

مجله پژوهشی دانشگاه اصفهان(علوم پایه)
جلد ۳۱ ـ شماره ۲ ـ سال ۱۳۸۷
صص۴۶-۳۵

بررسی اثر ضدعفونی‌کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌های مختلف

منیژه مهدوی*، روحا کسری کرمانشاهی و محمد جلالی*****

*** کارشناس‌ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان**

**** گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهراء**

*****گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان**

چکیده

سابقه و هدف: بیوفیلم عبارت است از تجمع میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای ما بین آنها که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلم‌ها به‌دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمریک خارج سلولی مانعی در برابر نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌گردند. بیوفیلم با عوامل کنترلی مانند حرارت، خشک کردن، پاک‌کننده‌ها و شوینده‌ها به‌سادگی از بین نمی‌روند و بر روی سطوح در تماس با مواد غذایی باقی می‌ماند. در نتیجه احتمال زنده‌ماندن باکتری‌های بیماریزا و فاسد کننده و سپس آلودگی و انتقال بیماری‌های ناشی از غذا بیشتر می‌گردد.

مواد و روش‌ها: اثر حذفی و کشندگی ضدعفونی‌کننده‌های معمول مورد استفاده در صنایع غذایی و مراکز عفونی بر بیوفیلم باکتری‌های بیماریزا مانند Salmonella enteritidis، Listeria monocytogenes و Staphylococcus aureus و محیطی کارخانه فراورده گوشتی با روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. در مورد سنجش میزان حذف بیوفیلم باکتری‌ها از رنگ کریستال ویوله و در مورد اثر کشندگی از رنگ تنفسی TTC استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بیوفیلم باکتری‌ها به اثر ضد عفونی‌کننده‌ها مقاومت نشان می‌دهند، گرچه بعضی از آنها مانند هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن بیشترین درصد حذف بیوفیلم و گلوتارآلدهید، بیشترین اثر کشندگی را نشان دادند.

نتیجه‌گیری: بنابراین کارایی ضدعفونی‌کننده‌ها بسته به نوع بیوفیلم باکتری‌ها بر حسب گونه، ساختار و شرایط محیطی متفاوت است. این مسأله اهمیت انتخاب ضدعفونی‌کننده مناسب را در صنایع و مراکز بهداشتی برای جلوگیری و در نتیجه کنترل تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی: اتصال، بیوفیلم، ضد عفونی‌کننده، میکروتیتر پلیت.

www.SID.ir

Archive of SID

The Assessment of Disinfectants on Various Bacterial Biofilms

M.Mahdavi*, R. Kasra Kermanshahi, M. Jalali*****
M.Sc. Biology Department, The University of Isfahan
**** Biology Department, University of Al-Zahra***
***** Department of Nutrition, School of Health, Medical Sciences, University of Isfahan***

Abstract
Biofilm is a functional consortium of microorganisms attached to the surface and is embedded in the extracellular polymeric substances (EPS) produced by the microorganisms. The biofilm consists of microbial cell clusters with a network of internal channels or voids in the extracellular polysaccharide and glycoprotein matrix (EPS). Biofilms, due to special structure and EPS, are more resistant to antimicrobial agents. Thus control measurement such as heating, drying and detergents can not eliminate them. Biofilms even with cleaning and disinfecting methods can remain on various surfaces which may assist the survival of pathogenic and spoilage bacteria in the food processing environment, a contributing factor in foodborne disease outbreaks. In this study biofilm elimination potentional and bactericidal effect of current food industry and clinical disinfectants on biofilm of pathogenic bacteria such as Salmonella enteritidis, Listeria monocytogenes and Staphylococcus aureus and environmental bacteria from meat processing factory were assessed by microtiter plate method. Biofilm elimination potentional and bactericidal effect were assessed by crystal violet and TTC stain, respectively. Results indicated that bacterial biofilms are resistant to disinfectants. However, Hypochlorite Sodium, Propanol and Peroxide Hydrogen had the most Biofilm elimination and Glutaraldehyde had the most bactericidal effect on biofilms. Thus, efficiency of disinfectants based on strain, structure and environmental condition is different. This indicates the importance of appropriate choice of disinfectants in industries and hygiene centers for prevention and control of biofilm formation.

Keywords: Adhesion, Biofilm, Disinfectant, Microtiter plate method.

مقدمه

میکروارگانیسم‌ها قادرند به سطوح مختلف چسبیده و در مدت کوتاهی رشد و تکثیر نموده و توده‌ای به نام بیوفیلم(Biofilm) تشکیل دهند. بیوفیلم می‌تواند در شرایط مناسب توسط اغلب میکروارگانیسم‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های بیماریزا و فاسدکننده موادغذایی تشکیل شود(۱ و ۲). در حقیقت بیوفیلم، گروهی از سلول‌های میکروبی است که با شبکه‌ای از کانالهای داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی‌ساکاریدی خارج سلولی به نام ماده پلی‌مریک خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده پلی‌مریک خارج سلولی از پلی‌ساکارید، پروتئین،فسفولیپید، تیکوییک اسید و دیگر مواد پلی‌مریک هیدراته با ۸۵ تا ۹۵ درصد آب تشکیل شده است و نقش انتقال مواد غذایی، اتصال به سطوح و افزایش مقاومت به عوامل باکتری‌کش را دارد(۳). بیوفیلم در سیستم‌های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی تشکیل می‌گردد(۴).

در صنایع غذایی اتصال باکتری‌های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرایندهای تولید و بسته‌بندی آنها و نهایتاً، تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی، می‌تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فراورده‌های غذایی و انتقال بیماریها

www.SID.ir

Archive of SID

باشد(۵، ۶ و ۷). همچنین تشکیل بیوفیلم بر روی وسایل، تجهیزات و دستگاههای پزشکی باعث آلودگی و در نتیجه انتقال عفونتهای بیمارستانی می‌گردد (۸ و ۹).

میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تماس با سطوح آلوده به راحتی می‌توانند انتقال یابند. رشد باکتری‌ها به حالت بیوفیلم بر روی سطوح، شستشو و از بین بردنشان را مشکل می‌کند، زیرا سلول‌های بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های آزاد، به عوامل باکتری‌کش و ضدعفونی کننده‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. در این حالت باید برای انتخاب مناسب ضدعفونی‌کننده جانب احتیاط را رعایت کرد، زیرا گاهی اوقات عوامل شوینده و ضدعفونی کننده بر روی سطوح درتماس با مواد غذایی باقی می‌مانند و مواد غذایی را آلوده می‌کنند(۱۰).

کارآیی ضدعفونی‌کننده‌ها معمولاً به حضور مواد آلی مزاحم، pH، دما، غلظت و مدت زمان تماس بستگی دارد ضدعفونی‌کننده‌ها باید مؤثر و ایمن بوده و استفاده از آنها آسان باشد، آثار آنها بر روی سطوح باقی نمانند و به‌راحتی شسته‌شوند، اثر سمی نداشته باشند و یا بر کیفیت محصولات تأثیر نامطلوب نگذارند(۱۱).

در کل کنترل و حذف بیوفیلم‌ها در محیط‌های صنعتی، غذایی و تجهیزات پزشکی که حضور جمعیتهای میکروبی مشکل‌زاست، یکی از بحث‌برانگیزترین موضوعات می‌باشد. در صنایع غذایی می‌توان بیوفیلم‌ها را با به‌کارگیری استراتژی‌های متفاوت شبیه روش‌های فیزیکی و شیمیایی از بین برد. علاوه براین در سال‌های اخیر از روش‌های بیولوژیک برای کنترل باکتری‌ها استفاده می‌شود(۱۲).

با توجه به این که در ایران اطلاعات اندکی در رابطه با کنترل تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها بر روی سطوح در تماس با فراورده‌های غذایی یا پزشکی و مقاومت آنها به عوامل ضدعفونی‌کننده وجود داشت، هدف از این تحقیق بررسی اثر ضدعفونی‌کننده‌های متفاوت مورد استفاده در صنایع غذایی یا پزشکی بر سالمونلا اینتریتیدیس(RITCC 1624)، لیستریا مونوسیتوژنز(RITCC 1293 4a serotype) و باکتری‌های جداسازی شده از محیط کارخانه فراورده گوشتی بود. نتایج این تحقیق در کنترل بیوفیلم‌ها حایز اهمیت است.

مواد و روش‌ها

باکتری‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق برای بررسی اثر ضدعفونی‌کننده‌ها، لیستریا مونوسیتوژنز سروتیپ 4a 1293 RITCC و سالمونلا اینتریتیدیس(RITCC 1624) تهیه شده از انستیتو رازی و نیز تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده از کارخانه فراورده گوشتی(۱۳) شامل استافیلوکوکوس اورئوس از سطح اسلایسر، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از سطح چرخ‌گوشت و باسیلوس سوبتیلیس از هوای کارخانه بودند.

باکتری‌های لیستریا مونوسیتوژنز، سالمونلا اینتریتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب بر روی محیط کشت‌های اختصاصی(PALCAM(Merck، و XLD(Merck) و بردپارکر (Merck) همراه با ساپلیمنتهای مربوط جهت اطمینان از خالص بودن، کشت و سپس در یخچال نگهداری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

تهیه مواد ضد عفونی‌کننده با رقت‌های مورد نظر

برای تهیه رقت از بیوسایدهای مایع، اطلاعات لازم از روی دستورالعمل‌های شرکت سازنده، جمع‌آوری و میزان غلظت مورد نیاز با توجه به رابطه‌های ذکر شده ذیل به دست آمد.

C2 =A mg/lit *g/1000mg=B g/lit

V1=C2V2/C1

C2=A= میزان غلظت مورد نیاز

چگالی(دانسیته)= d

درصد بیوساید روی بطری= a

غلظت گرم در لیتر بیوساید درون بطری C1=۱ad

ضدعفونی کننده‌های مورد آزمایش این تحقیق در کارخانه‌های غذایی برای ضدعفونی سطوح به کار می‌روند. همچنین در این تحقیق از همان دامنه غلظتهای ضدعفونی کننده که در کارخانه‌های غذایی مجاز بود، استفاده گردید. در جدول ۱ رقت‌های نهایی تهیه شده از ضدعفونی کننده‌ها آورده شده است(۵).

جدول ۱. میزان غلظت ضدعفونی کننده‌های مورد استفاده در این تحقیق

نوع ضد عفونی کننده	*غلظت مورد استفاده (ppm)*
هیپو کلریت سدیم	۱۰۰ و ۱۰،۱
پروپانل	۲۰۰۰ و ۱۵۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰
آب اکسیژنه	۲۰۰۰ و ۱۵۰۰،۱۰۰۰،۵۰۰
گلوتار آلدهید	۱۰۰ و ۸۰،۶۰،۴۰

تعیین توانایی عوامل ضد میکروبی در حذف بیوفیلم

برای سنجش اثر عوامل ضدمیکروبی روی حذف بیوفیلم در آزمایش میکروتیتر پلیت، بعد از آماده سازی کشت باکتری ۱۸ تا ۲۰ ساعته، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک‌فارلند از هر کدام از ایزوله‌ها تهیه شد. این سوسپانسیون به نسبت یک به ۱۰۰ در تریپتیکاز سوی براث استریل رقیق گردید و تمام چاهک‌ها در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۵۰ میکرولیتر از این محیط پر شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و فوراً عوامل ضدعفونی پس از خارج کردن محتویات چاهک‌ها و شستشوی آنها به کار رفتند. تمام این عوامل ضد عفونی به مدت یک ساعت بکار رفت و نیز هر۲۰ دقیقه یک بار عوض[1] شدند.

علاوه بر این، ستون‌های تیمار شده، ستون‌های کنترل(حاوی بیوفیلم و بدون تیمار) و همچنین ستون‌های شاهد(حاوی محیط براث استریل) در هر پلیت وجود داشتند. بعد از گذشت یک ساعت، عوامل ضدمیکروبی بوسیله شستن چاهک‌ها خارج شدند و چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲% به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. چاهک‌ها با آب شیر شسته و با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳% پر شدند. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای۳۰ oC انکوبه و بعد از این مدت

1 - Refresh

www.SID.ir

Archive of SID

به شدت تکان داده شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. در آخر سنجش کارایی بیوساید یا درصد کاهش بیوفیلم[1] از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به فرمول زیر محاسبه شد(۱۴):

$$\text{Reduction Percent} = \left[\frac{(C-B)-(T-B)}{(C-B)}\right]\times 100$$

میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل = C

میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد = B

میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده = T

روش تعیین میزان اثر کشندگی عوامل ضد میکروبی بر بیوفیلم‌ها

برای سنجش اثر عوامل ضد میکروبی در کشتن سلول‌های بیوفیلم، روش آزمایش دقیقاً مشابه با آزمایش تعیین پتانسیل حذف بیوفیلم بود، اما در آخرین مرحله به جای استفاده از رنگ کریستال ویوله، از رنگ TTC با غلظت ۰/۲% استفاده گردید. همچنین مدت زمان انکوباسیون میکروپلیت‌ها با این رنگ نزدیک به ۲ ساعت، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و تاریکی بود. در نهایت بعد از شستشوی چاهک‌ها و استفاده از اسیداستیک گلاسیال ۳۳% جذب نوری چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدرخوانده شد. نحوه محاسبه درصد کاهش یا کارآیی بیوسایدها نیز همانند روش قبلی انجام شد(۱۵، ۱۶).

آنالیزهای آماری

اختلاف بین داده‌ها، با آنالیز واریانس(ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای Tukey-Kramer توسط نرم‌افزار Excel و Minitab مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیزهای آماری اعدادی که دارای P value کمتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

بعد از سه بار تکرار آزمایش‌های بررسی اثر ضدعفونی کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها نتایج زیر به دست آمد. اثر حذفی هیپوکلریت سدیم، گلوتارآلدهید، آب اکسیژنه و پروپانل بر بیوفیلم باکتری‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان نداد و اثر آن بر همه باکتری‌ها یکسان بود($P>0/05$). تنها میزان کشته شدن بیوفیلم سلول‌های باکتریایی متفاوت در غلظت ۱۰۰ppm هیپوکلریت سدیم اختلاف معنی‌دار نشان داد($P<0/05$) و در مورد سایر ضدعفونی‌کننده‌ها این میزان یکسان بود($P>0/05$). در غلظت ۱۰۰ppm هیپوکلریت سدیم بیشترین تأثیر کشندگی بترتیب بر باکتری‌های Listeria monocytogenes (۷۵/۷%)، Bacillus subtilis (۶۲/۵%)، Salmonella enteritidis (۵۰%)، Staphylococcus aureus (۴۶%) و Staph. Epidermidis (۳۴%) بود ($P<0/05$).

در این تحقیق بیشترین مقاومت به اثر ضدعفونی کننده‌ها به بیوفیلم باکتری‌های B. subtilis و Staph. epidermidis تعلق داشت، زیرا میزان حذف و کشته‌شدن بیوفیلم این باکتری‌ها در اثر غلظت‌های متفاوت ضدعفونی‌کننده‌های به کار رفته اختلاف معنی‌داری نشان

1 - Reduction Percent

www.SID.ir

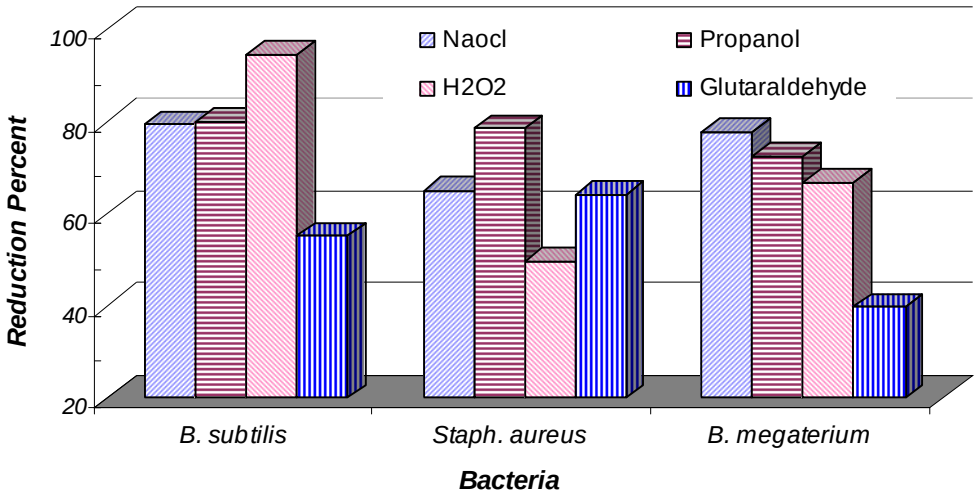
Archive of SID

نداد(P>۰/۰۵). نتایج اختلاف معنی‌دار اثر حذفی و کشندگی ضدعفونی‌کننده‌ها بر سایر باکتری‌ها در جدول ۲ آمده است. توجه به این نکته که عدد ذکر شده در این جدول، بیشترین میزان اثر ضدعفونی کننده و در بالاترین غلظت آن بر باکتری مورد آزمایش می‌باشد.

جدول ۲. نتایج اختلاف معنی‌دار اثر حذفی و کشندگی غلظت‌های متفاوت ضدعفونی‌کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها

ضدعفونی کننده / باکتری	هیپوکلریت سدیم (٪)		گلوتارآلدهید (٪)		آب اکسیژنه (٪)		پروپانل (٪)	
	کشندگی	حافظی	کشندگی	حافظی	کشندگی	حافظی	کشندگی	حافظی
B. megaterium	معنی‌دار (۶۶)	معنی‌دار (۷۸)	معنی‌دار (۷۹)	-	-	معنی‌دار (۶۷)	معنی‌دار (۶۲)	معنی‌دار (۷۲)
Staph. aureus	معنی‌دار (۶۰)	معنی‌دار (۶۵)	معنی‌دار (۸۷)	-	-	-	-	-
B. subtilis					-			
S. enteritidis	-	معنی‌دار (۶۰)	معنی‌دار (۹۹)	-	-	-	-	معنی‌دار (۷۵)
Staph. epidermidis					-			
L. monocytogenes	معنی‌دار (۷۶)		معنی‌دار (۹۰)	-			معنی‌دار (۶۲)	-

مقایسه تأثیر ضدعفونی‌کننده‌ها نشان داد که آنها در بیشترین غلظت به کار رفته هرضدعفونی‌کننده بالاترین قدرت را دارند. اختلاف درصد حذف باکتری‌های *L. monocytogenes*، *Staph. epidermidis* و *S. enteritidis* با بیوسایدهای مختلف معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵). نتایج بقیه باکتری‌ها با اختلاف معنی‌دار در نمودار ۱ آمده است.



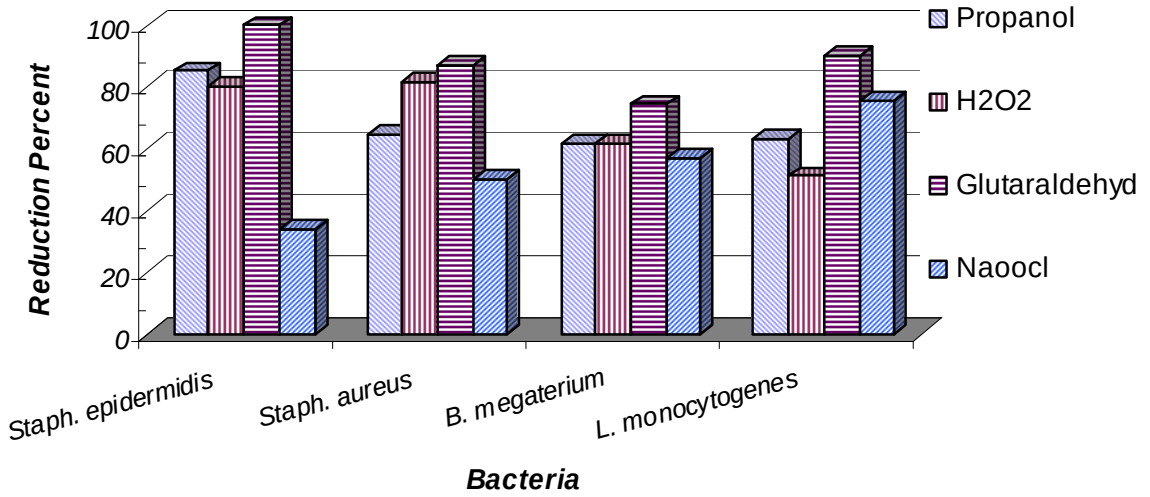
نمودار ۱. مقایسه اثر حذفی ضدعفونی‌کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها

هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن به ترتیب بر *B. megaterium*(۷۸٪)، *Staph. aureus*(۷۹٪) و *B. subtilis*(۹۵٪) بیشترین تأثیر را داشتند. اثر کشندگی بیوسایدهای به کار رفته در این تحقیق بر باکتری‌های *S.*

www.SID.ir

Archive of SID

enteritidis و B. subtilis معنی‌دار نبود و در نمودار ۲ نتایج سایر باکتری‌ها با اختلاف معنی‌دار مشاهده می‌شود. با توجه به این شکل، اثر کشندگی گلوتارآلدئید نسبت به سایر بیوسایدها با اختلاف معنی‌داری بیشتر می‌باشد(P<۰/۰۵)، بطوری‌که توانسته است ۱۰۰% از بیوفیلم باکتری‌های Staph. epidermidis، ۹۰% سلول‌های L. monocytogenes، ۸۷% سلول‌های Staph. aureus و ۷۴% سلول‌های B. megaterium را بکشد.



نمودار ۲. مقایسه اثر کشندگی ضدعفونی‌کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها.

بحث

تنها راه جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، ضدعفونی منظم سطوح قبل از شروع تشکیل بیوفیلم می‌باشد. اما در عمل، اجرای آن در صنایع غذایی بسیار مشکل است(۱۷). یکی از راههای مرسوم جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، استفاده از مواد ضدعفونی‌کننده در صنایع غذایی است. از جمله ضدعفونی‌کننده‌های رایج در صنایع غذایی می‌توان هیپوکلریت سدیم و پراکسید هیدروژن را نام برد(۱۸).

معمولاً در مبارزه با بیوفیلم، کلر فعال به عنوان انتخاب اول مطرح است. کلر علاوه بر کشتن میکروب‌ها، EPS آنها را نیز از سطوح برمی‌دارد و بنابراین امکان اتصال باکتری‌های جدید و تشکیل بیوفیلم در سطوح کمتر می‌گردد(۱۷). استفاده از کلر به عنوان وسیله‌ای برای از بین بردن EPS توسط Samrakandi در سال ۱۹۹۷ تأیید شد. علاوه بر این Kumar و Anand در سال ۱۹۹۸ کلر را به عنوان ماده شیمیایی که EPS را دپلیمریزه می‌کند، معرفی کردند(۱۹). Trachoo(۲۰۰۲) نشان داد که کلرین مؤثرترین sanitizer در غیر فعال کردن باکتری بیماریزای Campylobacter jejuni است، به طوری‌که غلظت ۵۰ppm آن به مدت ۴۵ ثانیه برای غیر فعال کردن این باکتری کافی می‌باشد(۲۰).

www.SID.ir

Archive of SID

Lomander و همکاران(۲۰۰۴) نیزگزارش کردند که غلظت ۵۰ppm کلر برای کشتن سلول‌های بیوفیلم کافی است، اما قادر به برداشتن باکتری‌ها از روی سطوح نیست و حتی در این حالت توانایی آن با شستشو به وسیله آب قابل مقایسه نمی‌باشد(۱۹). Caldwell(۱۹۹۰) نیز به این نتیجه رسیده بود که غلظت‌های پایین هیپوکلریت سدیم(۰/۵-۵ ppm) تنها از تشکیل بیوفیلم روی سطوح جلوگیری می‌کند، اما برای ازبین بردن و غیر فعال کردن کامل بیوفیلم به غلظت‌های بالاتر از ۵۰ ppm کلرین نیاز می‌باشد(۲۰).

Norwood و Gilmour(۲۰۰۰) غلظت‌های بالای کلر(۱۰۰۰ ppm) را برای کاهش اساسی تعداد باکتری‌ها در بیوفیلم لازم دانستند، درحالی‌که تنها غلظت ۱۰ppm آن برای از بین بردن سلول‌های پلانکتونیک کافی است(۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۱۰۰ppm کلر قادر است با اختلاف معنی‌داری اکثر سلول‌های باکتری‌های مورد آزمایش را از سطح حذف و بکشد. به عنوان مثال در غلظت ۱۰۰ ppm هیپوکلریت سدیم، ۶۰% سلول‌های L. monocytogenes حذف و ۸۰% کشته شدند.

Jessen و Lammert(۲۰۰۳) نشان دادند که اثر دترجنت‌ها بر L. monocytogenes قابل چشم‌پوشی است، در حالیکه کاراترین ضدعفونی‌کننده‌ها توانایی حذف آن را در بیوفیلم دارند. البته این تأثیر زمانی است که ضد عفونی‌کننده طبق دستورالعمل کارخانه سازنده، به مدت زمان طولانی و همراه با دترجنت استفاده گردد(۲۱). Koffi و Frank(۱۹۹۰) در مطالعات خود مقاومتهای متفاوت بیوفیلم L. monocytogenes را در تیمارهای ترکیبی هیپوکلریت سدیم و گرما نشان دادند(۲۲، ۲۳).

در این تحقیق به نظر می‌رسد هیپوکلریت سدیم در از بین بردن سلول‌های S. enteritidis چندان کارایی ندارد زیرا تنها ۵۵% سلول‌های آن را از بین برده و ۴۵% را کشته است. در حالی‌که Joseph و Karunasagar(۲۰۰۰) مقاومت بیوفیلم‌های تشکیل‌شده سالمونلا را در برابر یدوفور و کلرین سنجیدند. آنها بیان کردند که ۱۰۰ppm کلر در طی ۲۰ دقیقه تمام سلول‌های سالمونلا را غیر فعال می‌کند(۲۴).

Coworkers و De Beer(۱۹۹۴) با استفاده از میکروالکترودهای ردیاب کلرین در طی ضدعفونی با کلر، غلظت‌هایی از آن را که به بیوفیلم P. aeruginosa و Klebsiella pneumonia نفوذ کرده بود، اندازه‌گیری کردند. نفوذ کلرین به بیوفیلم، شبیه به آنتی‌بیوتیک، ۲۰% کمتر از غلظت به کار رفته بود. این محققین نتیجه گرفتند که مقدار نفوذ و سرعت انتشار بیوساید درون بیوفیلم بسته به وضعیت و تنوع در توده سلولی، متفاوت می‌باشد. به همین دلیل در تحقیق حاضر نیز بین درصد کشته شدن سلولهای بیوفیلم با غلظت ۱۰۰ppm هیپوکلریت سدیم باکتری‌های مختلف، اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود که می‌تواند بیان کننده این مطلب باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

در جدول ۲ به خوبی دیده می‌شود که بیشترین مقاومت به اثر ضدعفونی‌کننده‌ها مربوط به دو باکتری B. subtilis وStaph. epidermidis می‌باشد. زیرا نتایج آنها دارای اختلاف معنی‌داری نبوده است(P>۰/۰۵). همچنین Staph. aureus به پروپانل و پراکسیدهیدروژن، S. enteritidis و L. monocytogenes به پراکسید هیدروژن مقاومت نشان داده‌اند(P>۰/۰۵). بنابراین با حضور این باکتری‌ها در محیط‌های غذایی، تشکیل بیوفیلم اجتناب ناپذیر است که به راحتی نیز از بین نمی‌روند. این نتیجه از نظر این‌که باکتری‌های S. enteritidis، L. monocytogenes و Staph. aureus بیماریزا می‌باشند، از اهمیت بیشتری هم برخوردار است.

در این تحقیق پراکسید هیدروژن با کارایی بالا نزدیک به ۱۰۰% سلول‌های بیوفیلم B. subtilis را غیر فعال کرده است و بیشترین تعداد(۹۰%) از سلولهای B. megaterium را کشته است.

Stewart و Coworker(۲۰۰۰) نیز نشان دادند که پراکسید هیدروژن نمی‌تواند به بیوفیلم P. aeruginosa نفوذ کند و سلول‌های آن را بکشد. Carpentier (۱۹۹۳)، Bourion (۱۹۹۶) و Fatemi (۱۹۹۹) پیشنهاد کردند که ضدعفونی‌کننده‌های اسیدی مانند پراکسید هیدروژن از ترکیبات کلردار در تجهیزات فراورده‌های گوشتی کاراتر می‌باشند. درحالی که Frank و Koffi(۱۹۹۰) فعالیت این دو را مشابه ارزیابی کردند و همچنین Possini و Gaylard(۲۰۰۰) کارایی کاملاً متفاوتی از این دو بیوساید گزارش می‌کنند(۲۱).

در این پژوهش با مقایسه اثرات بیوسایدهای مختلف بر باکتری‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که اثر بیوسایدها بسته به نوع باکتری متفاوت است، به طوری که درصد حذف باکتری‌های L. monocytogenes، Staph. epidermidis و S. enteritidis توسط هیپوکلریت سدیم، گلوتارآلدهید، پروپانل و پراکسید هیدروژن مشابه می‌باشد (P>۰/۰۵)، اما اثر آنها بر باکتری‌های B. megaterium، Staph. aureus و B. subtilis مطابق با نمودار ۱ می‌باشد.

هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن به ترتیب بیشترین تأثیر را بر آنها داشته‌اند. اثر کشندگی گلوتارآلدهید بر همه باکتری‌ها بیشتر می‌باشد، در حالی که اثر حذفی آن کمترین است(نمودار ۱). این مسأله می‌تواند به طبیعت سمی گلوتارآلدهید ارتباط داشته باشد که باعث کشته شدن بیشتر سلول‌های بیوفیلم می‌شود. بنابراین در این تحقیق از لحاظ قدرت کشندگی، گلوتار آلدهید نسبت به سایر بیوسایدها بیشترین توانایی را نشان داد. Grobe و همکاران (۲۰۰۰) غلظت‌های بالای گلوتارآلدهید را برای از بین بردن کامل بیوفیلم ضروری می‌دانند. Laopaiboon و همکاران(۲۰۰۶) نشان دادند که غلظت‌های ۴۰ppm، ۸۰ و ۱۰۰ گلوتارآلدهید قادر به حذف کافی میکروارگانیسم‌های بیوفیلم نمی‌باشد(۲۵).

www.SID.ir

Archive of SID

در این تحقیق استفاده از غلظت ۱۰۰ppm گلوتارآلدهید تمام سلول‌های بیوفیلم باکتری‌ها را می‌کشد، ولی در از بین بردن آنها کارایی چندانی از خود نشان نمی‌دهد. از آنجایی که قدرت کشندگی بالای یک ماده ضدعفونی کننده می‌تواند از رشد و تکثیر مجدد سلول‌های بیوفیلم جلوگیری کند، گلوتارآلدهید می‌تواند بهترین گزینه برای ضدعفونی سطوح باشد، اما به دلیل میزان حذف کم سلول‌های بیوفیلم به تنهایی توصیه نمی‌شود بلکه بهتر است همراه با ضدعفونی کننده‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

از نتایج تحقیق حاضر می‌توان پی برد که کارایی عوامل شوینده بسته به توان آنها در برداشتن بیوفیلم از سطوح و کشتن باکتری‌های درون بیوفیلم متفاوت می‌باشد. البته حذف کامل بیوفیلم تنها با تیمارهای ضدعفونی‌کننده به دست نمی‌آید، حتی اگر آن عامل مورد استفاده در مقابل سلول‌های پلانکتونیک بسیار مؤثر باشد(نمودار ۱ و ۲). بنابراین برای حذف کامل بیوفیلم بر روی سطوح دستگاهها، محیط کارخانه‌های تولیدی و اماکن بهداشتی بهتر است از ترکیب چندین ضد عفونی کننده و بطور همزمان استفاده گردد.

از آنجایی که تشکیل بیوفیلم در سیستم‌ها بیانگر وجود آلودگی در فرایند می‌باشد، به نظر می‌رسد جلوگیری از تشکیل بیوفیلم با مطالعه بیشتر اثر ضدعفونی‌کننده‌های مختلف بر بیوفیلم باکتری‌ها دست یافتنی باشد. انتخاب ضدعفونی‌کننده مناسب که بیوفیلم‌ها کمترین مقاومت را به آن نشان دهند و بیشترین درصد از آنها را حذف و بکشد، هم هزینه‌ها را کاهش می‌دهد و هم محیط‌هایی را که در آنها شستشوی مؤثر انجام شده است، حفظ می‌کند. سود این اقدامات برای صنایع کاهش فساد محصولات، بهبود کیفیت و اطمینان مصرف‌کنندگان می‌باشد.

نتیجه‌گیری

از آنجایی که از بین بردن بیوفیلم باکتری‌های تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلم‌ها منبع بالقوه آلودگی منجر به فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماریها می‌باشند، بنابراین مبارزه با ایجاد شدن آنها در صنایع غذایی برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می‌باشد. نتایج این تحقیق به خوبی نشان داد که در صنایع غذایی شستشو برای از بین بردن بیوفیلم باید با طراحی سیستماتیک انجام گیرد و نیز برنامه‌های دقیقی وجود داشته باشد از جمله برنامه‌ریزی در شستشو، انتخاب عوامل شوینده، ضدعفونی‌کننده و تجهیزات شوینده مناسب و کارا.

منابع

1- J.W., Costerton Z., Leweandowski, D.E., Caldwell, D.R., Korber H.M., Lappin-Scott et al.

www.SID.ir

Archive of SID

Microbial biofilms: Annual reviews. J. microbiol 49: 711-745; (1995).

2- K.C., Marshall An overview of bacterial adhesion, activity, and control of surfaces. ASM news; 58: 202-207; (1992).

3- R.A.N., Chmielewski J.F., Frank et al. Biofilm formation and control in food processing facilities. J food Sci; 2: 22-32; (2003).

4- N., Trachoo Biofilms and the food industry. J Sci Technol; 25(6): 807-815; (2003).

5- J.D., Bryers BiofilmsII: process analysis and application. John Wiley and Sons, New York;; 327-360; (2000).

6- H.M., Neil Reflections on salmonella and other "wee Beasties" in foods. Food Technol; 55: 61-67; (2001).

7- E.A., Zottola K.C., Sasahara et al. Microbial Biofilms in the food processing industry: shoud they be a concern? Int J Food Microbiol; 23: 125-148; (1994).

8- R.J.C., McLean J.C., Nickel M.E., Olson et al. Biofilm associated urinary tract infections, p. 261–273. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton(ed.), Microbial biofilms. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom; (1995).

9- G., Reid D., Lam Z., Policova A.W., Neumann et al. Adhesion of two uropathogens to silicone and lubricious catheters: influence of pH, urea and creatine. J Mater Sci Mater Med; 4:17–22; (1993).

10- D. G., Dunsmore, A., Twomey, W. G., Whittlestone, and H. W., Morgan, Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: Rev. J Food protects. 44, 220-240; (1981).

11- R. D., Ponterfact, Bacterial adhesion: Its consequence in food processing. J Can. Inst. Food Sci. Technol. 24, 113-117; (1991).

12- P., LenaVena, Microbial biofilm in food processing. Rev. J Academic Press. 32, 321-326; (1999).

13- M., Mahdavi, M. Jalali and R.K. Kermanshahi, The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. Res. J. Microbiol. 3(3): 181-186; (2008).

14- S., Sonak, and N. B., Bhosle, A simple method to assess bacterial attachment to surfaces. Biofoul. 9, 31– 38; (1995).

15- J., Smith, and G., McFeters, Mechanisms of INT(2-(4-iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in Escherichia coli K-12. J Microbiol Methods. 29, 161– 175; (1997).

16- S., Stepanovic, D., Vukovic, I., Dakic, B., Savic, and M., Svabic-Vlahovic, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbial Meth. 40(2), 175– 179; (2000).

www.SID.ir

Archive of SID

17- B., Meyer, Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. Int Biodeter & Biodegrad. 51, 249-253; (2003).

18- S., Langsrud, M. S., Sidhu, and A., Holk, Bacterial disinfectant resistance- a challenge for the food industry. Int Biodeter & Biodegrad. 51.283-290; (2003).

19- A., Lomander, P., Schreuders, R., Cohen, and A., Laila, Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. Bioresource Technol. 94, 275-283; (2004).

20- N., Trachoo, Biofilms and the food industry. Sci Technol. 25(6), 807-815; (2003).

21- B., Jessen, and L., Lammert, Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int biodetrer & biodegrad. 51, 265-269; (2003).

22- M. W., Mittelman, Structural and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. Dairy Sci. 81, 2760-2764; (1998).

23- J. S., Peng, W. C., Tsai, and C., Chou, Inactivation and removal of Bacillus cereus by sanitizer and detergent. Int Food Microbiol. 77, 11-18; (2002).

24- B., Joseph, S. K., Otta, and I., Karunasagar, Biofilm formation by Salmonella spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int Food Microbiol. 64, 367-372; (2000).

25- L., Laopaiboon, Effect of glutaraldehyde biocide on laboratory-scale rotating biological contactors and biocide efficacy. J Biotechnol. 9, 358-369; (2006).

www.SID.ir