

اثرات دمای رشد و سن بیوفیلیم در مقاومت بیوفیلیم سالمونلا تیفی موریوم نسبت به باکتریوفاژ

ریبوار محمدی^۱، مهران مرادی^{۲*}، حسین تاجیک^۳، هادی قاسم مهدی^۴، روژان مدرسی^۵، سرور خلیلی صدقیانی^۶

تاریخ دریافت ۱۳۹۵/۱۱/۲۲ تاریخ پذیرش ۱۳۹۶/۰۲/۰۵

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: سالمونلا تیفی موریوم یکی از میکروارگانسیم‌های مهم بیماری‌زا مواد غذایی می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات فاژ سالمونلا تیفی موریوم بر بیوفیلیم سالمونلا در مدل غذایی گوشت مرغ بود.

مواد و روش کار: بیوفیلیم روی سطح استیل ضدزنگ و در ۳ دمای انکوباسیون ۸، ۴ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد و اثرات فاژ در سه غلظت ۱۰^۴، ۱۰^۶، ۱۰^۸ پلاگ در هر میلی‌لیتر، در دو سطح تماس ۱۰ و ۲۰ دقیقه در روزهای ۱ و ۷ بررسی شد.

یافته‌ها: داده‌های به‌دست‌آمده از این مطالعه نشان داد که باکتری توانایی تشکیل بیوفیلیم روی استیل ضدزنگ در محیط گوشت مرغ را دارد و میزان آن تحت تأثیر دمای انکوباسیون و سن بیوفیلیم است، به طوری که در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ روز، بیشترین تراکم بیوفیلیمی را نشان داد. اثرات فاژ بر بیوفیلیم نیز نشان داد که افزایش غلظت فاژ، اثرات معنی‌داری در از بین بردن بیوفیلیم ندارد و زمان تماس فاژ و باکتری نیز اثری معنی‌داری ندارد. اثرات فاژ بر بیوفیلیم تحت تأثیر سن بیوفیلیم است، به طوری که بیشترین اثر فاژ، بر بیوفیلیم یک روزه مشاهده گردید و بیوفیلیم ۷ روزه مقاومت نسبی نسبت به فاژ نشان داد.

بحث و نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که فاژ تنها در غلظت بالا روی بیوفیلیم سالمونلا تیفی موریوم تشکیل شده در سطح استیل در مدل گوشت مرغ اثر دارد، لذا استفاده از روش‌های ترکیبی برای کنترل بیوفیلیم توصیه می‌شود.

کلیدواژه‌ها: باکتریوفاژ، سالمونلا تیفی موریوم، بیوفیلیم، گوشت مرغ

مجله پزشکی ارومیه، دوره بیست و هشتم، شماره سوم، ص ۱۸۱-۱۷۳، خرداد ۱۳۹۶

آدرس مکاتبه: ارومیه، دانشگاه ارومیه، دانشکده دامپزشکی، تلفن: ۰۴۴۳۱۹۴۲۶۳۳

Email: m.moradi@urmia.ac.ir

مقدمه

بیماری ناشی از سالمونلا، یکی از مهم‌ترین بیماری‌های با منشأ غذایی در دنیا است که اثرات اقتصادی و بهداشتی مختلفی بر جوامع بشری دارد. فراوانی در طبیعت و حضور سروتیپ‌های مختلف از این باکتری در مواد غذایی باعث شده که حذف و ریشه‌کنی آن به‌عنوان یک چالش مهم محققان در سراسر دنیا باشد. این چالش زمانی غیرقابل کنترل می‌شود که سروتیپ‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در این‌گونه در طبیعت گردش پیدا می‌کنند. در جنس سالمونلا بیش از ۲۳۰۰ سروتیپ شناسایی شده است ولی سالمونلا تیفی موریوم و

سالمونلا انترییدیسیس مهم‌ترین و شایع‌ترین سروتیپ‌های سالمونلا به شمار می‌روند. ۵۰ تا ۷۰ درصد منبع آلودگی به سالمونلا محصولات غذایی با منشأ دامی است. گوشت و محصولات گوشتی یکی از مهم‌ترین محصولات غذایی است که در معرض آلودگی با این باکتری می‌باشند (۱).

بیوفیلیم، پدیده تجمع میکروارگانسیم‌ها در سطوح زنده (از جمله سطح غذا) و سطوح بی‌جان تحت شرایط خاص است. این تجمع اگر در مورد باکتری‌های بیماری‌زا یا عامل فساد در سطح ماده غذایی و یا سطوح در تماس با غذا یا غیر غذا باشد، تهدیدی جدی است که

^۱ دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۲ استادیار گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران (نویسنده مسئول).

^۳ استاد گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۴ دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۵ دانشجوی دکتری بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

^۶ دانش‌آموخته دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.

باکتری، ماده غیر سمی بوده و هیچ اثر سمی در انسان حتی در دوزهای بالا هم ایجاد نمی‌نماید، تداخلی با سلول‌های یوکاریوت ندارد، تغییر حسی خاصی نیز در غذا به وجود نمی‌آورند، جداسازی و تولید آن به‌صرفه است. از ثبات دمایی، pH، فشار اسمزی و تحمل انجماد مناسبی برخوردارند و اثرات محیطی نامناسبی ندارند بنابراین گزینه مناسبی برای ریشه‌کن کردن بیوفیلیم باکتری‌ها است (۹). امروزه مطالعات زیادی در زمینه کنترل بیوفیلیم‌ها توسط مواد ضدعفونی‌کننده با پایه طبیعی از جمله اسانس‌ها و استفاده از باکتریوفاژها به‌عنوان عوامل طبیعی و جایگزین برای مواد ضدعفونی‌کننده شیمیایی انجام شده است (۵). هدف این مطالعه بررسی اثر تیمار حرارتی ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در تشکیل بیوفیلیم سالمونلا در مدل غذایی برات گوشت مرغ، بررسی اثر دو زمان تماس (۱۰ و ۱۵ دقیقه) و ۳ غلظت مختلف فاژ (۱۰^۴، ۱۰^۶، ۱۰^۸ پلاگ در هر میلی‌لیتر) بر بیوفیلیم سالمونلا تیپ‌موریم در مدل گوشت مرغ و ارزیابی اثر سن بیوفیلیم یک و ۷ روزه سالمونلا تیپ‌موریم در اثر بخشی فاژ در مدل گوشت مرغ می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه و آماده‌سازی باکتری:

باکتری سالمونلا تیپ‌موریم با کد ST38 از کلکسیون میکروبی بخش بهداشت و کنترل مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه دریافت گردید. باکتری در کرایوتیوب حاوی گلیسرول ۲۵ درصد در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شد. احیای باکتریایی به روش ۲ مرحله‌ای در محیط لوریا برتانی برات انجام شد. جهت تعیین غلظت از روش تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

تهیه‌ی استوک فاژ:

باکتری به روش احیای ۲ مرحله‌ای آماده گردید. فاژ STP38 لیتیک متعلق به خانواده میرووریده موجود در بخش بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه دریافت گردید. محلول فاژی به میزان ۵۰ درصد حجمی/حجمی با گلیسرول استریل مخلوط و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری می‌شد. برای تهیه‌ی استوک فاژ خالص در SM بافر^۱ رقت سازی گردید و سپس به‌روش کشت دولایه کشت داده شد. پس از بستن لایه رویی، پلبت‌ها به‌صورت وارونه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری

ایمنی و کیفیت محصول غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باکتری‌های مختلفی از جمله جنس سالمونلا، لیستریا، اشریشیا، باسیلوس، استافیلوکوکوس و سودوموناس توانایی تشکیل بیوفیلیم در محیط فرآوری غذا را دارا هستند (۲). اتصال میکروارگانیسم و تشکیل بیوفیلیم ناشی از اثر متقابل سه جزء اصلی یعنی، سلول باکتری، سطح تماس و محیط اطراف است. سطح بسیاری از سلول‌ها دارای بار منفی است که این خود ویژگی منفی است که امکان اتصال آن به سطوح را به دلیل نیروی رانش الکترواستاتیک تحت تأثیر قرار می‌دهد (۳). شرایط محیطی مؤثر در تشکیل بیوفیلیم نیز شامل pH، دما، اسمولاریته، میزان O₂، محتوای تغذیه‌ای و حضور سایر باکتری‌ها است (۴). تداخل تمامی این خصوصیات در تشکیل بیوفیلیم باکتری مؤثر است. معمولاً میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت تشکیل بیوفیلیم نسبت به ترکیبات ضد میکروبی مقاوم هستند، لذا برای کاهش و یا از بین بردن بیوفیلیم نیاز به استفاده از غلظت‌های بالا و برای مدت طولانی از ترکیب بیوسید است (۵). برای کاهش یا حذف میکروارگانیسم‌های روی سطوح در تماس با غذا، استفاده از روش‌های شیمیایی و فیزیکی پاک‌سازی و ضدعفونی سال‌هاست که مورد توجه قرار گرفته است. مطالعات مختلف نشان داده است که مقاومت به مواد پاک‌کننده و ضدعفونی‌کننده در میکروارگانیسم‌های متصل به سطح نسبت به اجرام آزاد بیشتر است. علاوه بر این، روش‌های فعلی پاک‌سازی و ضدعفونی معایبی همچون سمیت و مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی را به دنبال دارد (۶ و ۷). بنابراین تلاش برای یافتن ترکیبات جدید برای کنترل و پیشگیری از بیوفیلیم، زمینه تحقیقاتی مهمی در این زمینه بشمار می‌رود.

استراتژی‌های مختلف برای کنترل و ریشه‌کنی بیوفیلیم پیشنهاد شده است. یکی از آن‌ها مهار اتصال باکتری به سطح موردنظر با جلوگیری یا کنترل سیستم درک حدنصاب و دیگری انتخاب سطوح مناسب و یا تغییر در خصوصیات فیزیکی-شیمیایی سطح است (۸). استراتژی دیگر، استفاده از ترکیبات ضد میکروب شیمیایی و طبیعی در روی سطوح مختلف است. باکتریوفاژ به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی یک روش مناسب برای کنترل زیستی بیوفیلیم مطرح می‌باشد که می‌توان به‌منظور کاهش و یا حذف بیوفیلیم از غذا و سطوح در تماس با غذا استفاده نمود. برخی از مزایای استفاده از فاژ در مواد غذایی به شرح ذیل است: یکی از سالم‌ترین روش‌های کنترل عوامل میکروبی در مواد غذایی است، نوع مکانیسم اثر فاژ به نحوی است که به دلیل لیتیک بودن، امکان رشد مجدد باکتری وجود ندارد، اختصاصی بودن نسبت به سویه‌های

¹ (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mMNaCl, 8 mM MgSO4:7H2O, 0.01% gelatin, pH 7.5)

میلی لیتر برسد. سپس در هر فالكون يك عدد كوپن استريل قرار داده و فالكون را به مدت ۷ روز در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

اثرات فاژ بر بیوفیلیم:

در فواصل هر دو روز یکبار تا روز ۷، کوپن‌ها از داخل برات برداشته و به یک برات گوشت تازه بدون باکتری انتقال داد شد (۱۳). در روز اول (۲۴ ساعت پس از تلقیح) و روز ۷، کوپن از فالكون بیرون آورده و پس از شستشو در پیتون واتر ۱/۱ درصد حاوی ۰/۸۵ کلرید سدیم در معرض استوک فاژ با ۳ غلظت متفاوت (۱۰^۴، ۱۰^۶ و ۱۰^۸ پلاگ در هر میلی لیتر) در دو زمان تماس (۱۰ و ۲۰ دقیقه) قرار داده شد. در مرحله بعد کوپن‌ها پس از شستشو مجدد در پیتون سالین واتر، جهت تعیین اثرات فاژ بر بیوفیلیم تشکیل شده، شمارش باکتریایی سطحی کوپن با استفاده از روش سواب برداری، رقت سازی و روش پخش خطی^۳ در محیط کشت آگار لوریبارتانی تعیین گردید. نمونه کنترل بدون تیمار فاژ نیز آماده و تعداد باکتری روی آن شمارش شد. بنزوالکانیوم کلراید با دوز ۲۰۰ ppm، به عنوان کنترل مثبت و جهت مقایسه استفاده گردید (۱۳).

تمامی آزمایشات، در حداقل سه تکرار انجام گردید. اطلاعات به دست آمده، توسط نرم افزار GraphPad (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تحلیل واریانس با روش ANOVA و تست Newman-Keuls post در سطح معنی دار $P < 0/05$ صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تأثیر باکتریوفاژ در سه غلظت ۱۰^۴، ۱۰^۶ و ۱۰^۸ پلاگ در هر میلی لیتر^۴ (شکل ۱) در دو زمان تماس ۱۰ و ۲۰ دقیقه و در سه دمای انکوباسیون ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی گراد بر روی بیوفیلیم یک و ۷ روزه سالمونلا تیفی موریوم تشکیل شده بر روی سطح استیل زنگ نزن در مقایسه با تأثیر بنزوالکانیوم روی بیوفیلیم مذکور در قالب شکل‌های شماره ۴-۲ و جدول ۱ آورده شده است.



شد. از بین پلیت‌ها، پلیتی که پلاگ‌های فاژ باهم ادغام نشده و به صورت کاملاً جدا نیز نیستند (بین آن‌ها مرزی از باکتری وجود دارد) انتخاب شد. در این مرحله تیتراژ به روش شمارش تعداد پلاگ نیز مشخص شد که حدود ۱۰^{۱۰} پلاگ در هر میلی لیتر بود، سپس ۵ میلی لیتر SM بافر روی پلیت ریخته شد و پلیت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۷ درجه سانتی گراد با دور ۵۰ در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس مایع روی پلیت جمع-آوری و مایع جمع شده در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر شد. محلول فاژی حاصل به میزان ۵۰ درصد حجمی/حجمی با گلیسرول استریل مخلوط و در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد زیر صفر نگهداری شد (۱۰).

تهیه‌ی محلول بنزوالکانیوم کلراید:

برای مقایسه اثرات ضدبیوفیلیمی فاژ با ضدعفونی کننده‌های معمول، از غلظت ۱ ppm^۱ بنزوالکانیوم کلراید^۲ ساخت شرکت شیمی دارویی آفاق استفاده شد. محلول پس از تهیه از فیلتر ۰/۲۰ میکرونی عبور داده و به صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه‌ی برات گوشت مرغ:

برای تهیه برات گوشت، گوشت تازه مرغ کشتار روز از بازار تهیه شد و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل و سپس سریعاً چرخ شد. محلول ۲۰ درصد از گوشت در آب مقطر تهیه گردید و محلول با استفاده از همزن، همگن شد. محلول همگن سپس به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و پس از اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه، مورد استفاده قرار گرفت (۱۱).

تشکیل بیوفیلیم بر سطح استیل زنگ نزن:

کوپن‌ها از جنس استیل زنگ نزن و در اندازه ۱×۱۰×۲۰ میلی-متر تهیه شدند. جهت تمیز کردن کوپن‌ها، از روش والریانو استفاده شد (۱۲). ابتدا کوپن‌ها، در داخل استون خالص به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار داده و سپس با آب مقطر چندین بار شستشو داده شدند. سپس به مدت یک ساعت در داخل سود ۱ درصد قرار داده شد و مجدداً با آب مقطر چندین بار شستشو داده شدند. مرحله بعدی، شستشو با الکل ۷۰ درصد بود. سپس، کوپن‌ها در فور با دمای ۷۰ درجه سانتی گراد خشک و جهت انجام عمل استریلیزاسیون، اتوکلاو گردید و تا زمان استفاده در ظروف استریل نگهداری شدند.

برای تشکیل بیوفیلیم، ابتدا در میکرو تیوپ‌های ۵ میلی لیتری، ۴/۵ میلی لیتر برات گوشت اضافه و سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری قبلاً تهیه شده، اضافه تا مقدار باکتری به ۱۰^۷ باکتری در هر

³ Track

⁴ Plaque forming units per milliliter (PFU/ml)

¹ Parts-per-million

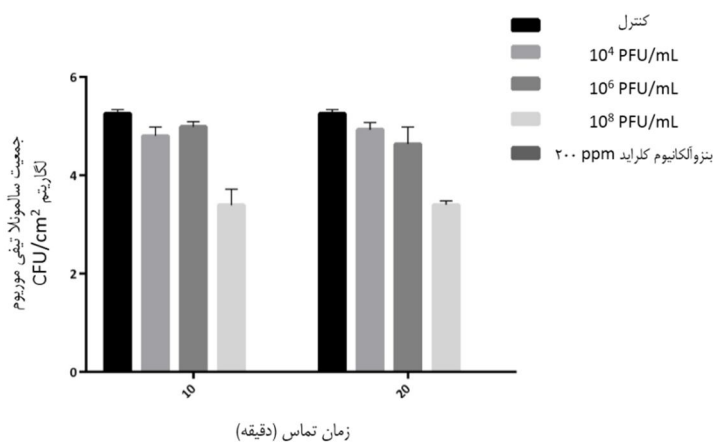
² Benzalkonium chloride

به سایر غلظت‌های باکتریوفاژ سبب کاهش تقریباً یک سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری شد. در شکل شماره ۳، نتایج اثرات باکتریوفاژ و بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی-موریوم تشکیل شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آورده شده است. نتایج حاکی از اثرات معنی‌دار بنزوالکانیوم کلراید بر روی بیوفیلیم بود ($P \leq 0.05$) که هم در زمان تماس ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه اثر آن سبب نابودی تمام باکتری‌ها شده است. اثرات میزان 10^8 باکتریوفاژ هم در ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه نسبت به سایر غلظت‌های باکتریوفاژ معنی‌دار بود ($P \leq 0.05$) و سبب کاهش تقریباً یک سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری شد.

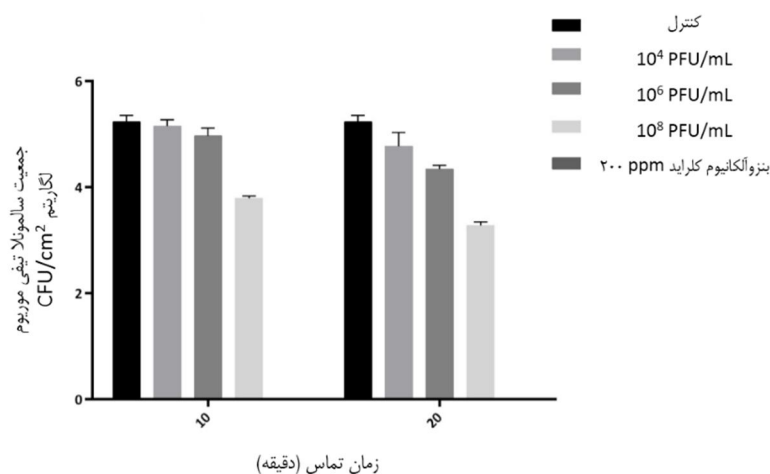
شکل (۱): نمونه پلاگ منفرد فاژ STP38 متعلق به خانواده

میرووریده

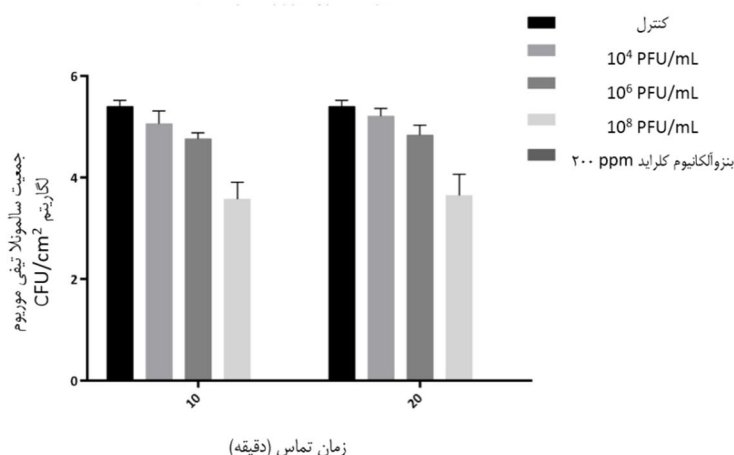
مطابق شکل شماره ۲، در مقایسه تأثیر باکتریوفاژ و بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی موریوم تشکیل شده در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، تیمار با بنزوالکانیوم کلراید نسبت به نمونه کنترل در ۱۰ و ۲۰ دقیقه باعث نابودی تمام بیوفیلیم شده است. تیمار با باکتریوفاژ در غلظت 10^4 پلاگ در هر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱۰ و ۲۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P \leq 0.05$) و این میزان کم‌تر از 0.5 سیکل لگاریتمی بود، میزان تیمار با باکتریوفاژ در غلظت 10^8 هم در ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه نسبت



شکل (۲): اثرات سه غلظت مختلف باکتریوفاژ (پلاگ در هر میلی‌لیتر) و بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی موریوم تشکیل شده در برات گوشت مرغ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد. در این نمودار، بنزوالکانیوم کلراید باعث حذف کامل جمعیت باکتری گردید.



شکل (۳): اثرات سه غلظت مختلف باکتریوفاژ (پلاگ در هر میلی‌لیتر) و بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی موریوم تشکیل شده در برات گوشت مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. در این نمودار، بنزوالکانیوم کلراید باعث حذف کامل جمعیت باکتری گردید.



شکل (۴): اثرات سه غلظت مختلف باکتریوفاژ (پلاگ در هر میلی‌لیتر) و بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در برات گوشت مرغ در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد. در این نمودار، بنزوالکانیوم کلراید باعث حذف کامل جمعیت باکتری گردید.

باکتری نسبت به نمونه کنترل‌شده است که در ۲۰ دقیقه نسبت به ۱۰ دقیقه این اختلاف معنی‌دار است ($P \leq 0/05$).

بحث و نتیجه‌گیری

شکل‌گیری بیوفیلم یک پدیده پیچیده می‌باشد که تحت تأثیر چندین عامل است از جمله ویژگی فیزیکی-شیمیایی سطح سلول و سطحی که بیوفیلم روی آن تشکیل می‌شود و همچنین محیط پیرامون سطح. سطح سلول باکتریایی وجه مشترکی بین باکتری و محیط اطرافش می‌باشد که دقیقاً روی شکل‌گیری بیوفیلم مؤثر می‌باشد. اتصال باکتری به سطوح یا سلول‌های دیگر یک پروسه فیزیکی-شیمیایی می‌باشد که تحت تأثیر نیروهای مختلف از جمله: واندروالسی، الکتروستاتیک، هیدروفوبیک/هیدروفیلیک و برهم‌کنش اسمتیک است (۱۳). چندین ساختار از بیوفیلم بیرون آمده یا روی آن را می‌پوشاند همانند: تاژک، فیمبریا، پیلی، سطح لیپوپلی-ساکاریدی و غیره. ویژگی‌های شکل فیزیکی-شیمیایی باکتری بین سطوح باکتری و سطوح چسبنده دخالت می‌کند و در نهایت شکل بیوفیلم و ویژگی‌های آن را مشخص می‌کند (۱۴). این ساختارها ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی از جمله: pH و دما قرار گیرند برای مثال بیان مژه و چسبیدن به سطح پلاستیکی از طریق تولید انتروتوکسین اش‌ریشیا کولای به بیشترین سطح خودش در ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد می‌رسد. بیان اجتماع فیمبریا در باکتری‌های سالمونلا تیفی‌موریوم و آئروموناس ورونی که از غذا جدا شده‌اند تحت تأثیر دما (به ترتیب ۲۰ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند (۱۳). گزارش‌شده که تشکیل بیوفیلم گونه‌های لیستریا، سالمونلا و

نتایج حاصل از تیمار و کشت بیوفیلم ۷ روزه سالمونلا تیفی‌موریوم در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ نشان داده شده است. در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد، بنزوالکانیوم کلراید، در هر زمان تماس ۱۰ و ۲۰ دقیقه، اثر آن سبب از بین رفتن تمام بیوفیلم شده است. میزان تیمار با باکتریوفاژ در غلظت ۱۰^۸ در ۱۰ و ۲۰ دقیقه نسبت به سایر غلظت‌های باکتریوفاژ اختلاف معنی‌داری در کاهش تعداد باکتری نسبت به گروه کنترل نشان داد ($P \leq 0/05$). تیمار با بنزوالکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷ روزه باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، اختلافی بیشتر از ۴ سیکل لگاریتمی با نمونه کنترل دارد. میزان تیمار با باکتریوفاژ در غلظت ۱۰^۸ در ۲۰ دقیقه نسبت به ۱۰ دقیقه در کاهش تعداد باکتری نسبت به نمونه کنترل اختلاف معنی‌داری نشان می‌دهد ($P \leq 0/05$). بنزوالکانیوم کلراید، اثر معنی‌داری بر بیوفیلم بیوفیلم ۷ روزه باکتری سالمونلا تیفی‌موریوم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد ($P \leq 0/05$) و باکتری در آن رشد نکرده است و اختلاف آن با نمونه کنترل حدوداً ۵ سیکل لگاریتمی است. همچنین اثر باکتریوفاژ در غلظت ۱۰^۸ بر روی بیوفیلم هم در ۲۰ دقیقه و هم ۱۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل نشان می‌دهد ($P \leq 0/05$). تیمارهای در تماس با بنزوالکانیوم کلراید ۲۰۰ ppm رشد نکرده‌اند که نشان‌دهنده تأثیر عالی این ماده بر روی بیوفیلم سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد می‌باشد؛ و تأثیر آن بیشتر از ۶ سیکل لگاریتمی است. همچنین میزان تیمار با باکتریوفاژ در هر سه غلظت سبب کاهش تعداد

سیکل لگاریتمی گونه‌های مختلف سالمونلا می‌شود درحالی که در بیوفیلیم ۳ روزه این میزان ۲/۵۲ سیکل لگاریتمی بود (۱۸). مقاومت تشکیل بیوفیلیم لیستریا مونوسی‌توزنز را در شرایط فرآوری مواد غذایی در برابر عوامل مختلف مطابق با اصول بهداشتی مورد مطالعه قرار دادند و گزارش دادند که میزان بقای بیوفیلیم ۸ و ۱۲ روزه به‌طور قابل توجهی بالاتر از بیوفیلیم ۴ روزه بود؛ بنابراین نتایج نشان می‌دهد که سن بیوفیلیم جنبه مهمی است که به هنگام ارزیابی نیاز داریم که اثر ضد عفونی را در نظر بگیریم (۱۹). مطالعات زیادی در خصوص کاربرد فاژ در کنترل باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی انجام شده است. ولی گزارش‌های کمی در خصوص کاربرد فاژ در کنترل بیوفیلیم این عوامل در مدل‌های غذایی صورت گرفته است. پدیده حذف و کنترل بیوفیلیم با استفاده از فاژ، فرآیندی پیچیده است که فقط توسط فاژهای لیتیک امکان‌پذیر است. شکست در استفاده از فاژ در کنترل بیوفیلیم، می‌تواند ناشی از عدم توانایی فاژ به نفوذ در بخش‌های زیرین بیوفیلیم و یا غیرفعال شدن فاژ توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در ماتریس بیوفیلیم باشد (۲۰). مکانیسم‌های مختلفی برای اثربخشی فاز بر بیوفیلیم بیان شده است. گفته شده است که ژنوم بسیاری از فاژها حاوی ژن‌های آنزیم‌هایی هستند که توانایی تخریب مواد موجود در ماتریس بیوفیلیم را دارا هستند. این آنزیم‌ها اغلب محلول در آب بوده و پس از آزاد شدن از فاژ بر دیواره سلول باکتری اثر می‌گذارند و یا باعث تخریب لایه پلی‌ساکاریدی بیوفیلیم می‌گردند. فاژها همچنین باعث آزاد شدن DNA نیز می‌گردند، پدیده‌هایی که می‌تواند بر ساختار ماتریس بیوفیلیم نیز اثرگذار باشد. البته در دم برخی فاژها از جمله T4 آنزیم‌هایی وجود دارد که به نفوذ فاژ به داخل باکتری کمک می‌کند که این نیز کمک مهمی در تخریب ماتریس بیوفیلیم دارد (۶). اثربخشی فاژ بر بیوفیلیم تحت تأثیر عوامل مختلفی است. یکی از این عوامل میزان فاژ مورد استفاده است. اسپری فاژ لیتیک سالمونلا در میزان 10^9 پلاگ در میلی‌لیتر در گوشت طیور، باعث کاهش ۱/۵ سیکل لگاریتمی در تعداد سالمونلا تیپ‌موریوم گردید (۲۱). در مطالعه‌ای لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات استفاده از کلی‌فاژ ECP4 بر بیوفیلیم باکتری /شیشیا کلی در آب کلم و سبزی‌های مورد مطالعه قرار دادند. استفاده از این فاژ در غلظت 10^8 پلاگ در هر میلی‌لیتر باعث کاهش ۷-۸ سیکل لگاریتمی باکتری گردید و بعد از سه ساعت هیچ بیوفیلیم شناسایی نگردید (۲۲). لیاو و همکاران در سال ۲۰۱۲ نیز اثر باکترِوفاژ بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم سودوموناس آئروژینوزا در کاتتر اداری را بررسی نمودند. نتایج مطالعه نشان داد که استفاده از فاژ به میزان 10^8 پلاگ در هر میلی‌لیتر با زمان تماس ۲۴ ساعت باعث کاهش ۴ سیکل لگاریتمی در جمعیت توده بیوفیلیم ۷۲ ساعته گردید (۲۳). در مطالعه چمبر و همکاران در سال ۲۰۱۳، نقش

استافیلوکوکوس اورئوس به‌شدت تحت تأثیر طیف دمایی گسترده از ۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۱۳). در بعضی مطالعات شکل-گیری بیوفیلیم با افزایش دما، افزایش پیدا می‌کند (رابطه مستقیم بین افزایش دما و شکل‌گیری بیوفیلیم) و در موارد دیگر در دمای کم‌تر از حد مطلوب افزایش تولید بیوفیلیم مشاهده شده است (۱۵). در مقایسه با دما، میزان اطلاعاتی که در مورد اثرات pH در شکل-گیری بیوفیلیم داریم بسیار کم است (۱۳). در این مطالعه باکتری سالمونلا انتخاب شد، چون یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی می‌باشد که بیش از ۹۵ درصد عفونت‌های ناشی از مواد غذایی و عامل ۳۰ درصد از مرگ‌ومیر، ناشی از آن می‌باشد. در میان ۳۰۰۰ سرور سالمونلا، بیشترین سروتایپ جدا شده سالمونلا تیپ‌موریوم می‌باشد که حدود ۳۵ درصد آن از انسان جدا شده است. چندین مطالعه در مورد شکل‌گیری بیوفیلیم توسط سالمونلا تیپ‌موریوم در سطوح مختلف گزارش شده است؛ اما این اطلاعات در مورد تأثیر عوامل رشد بر روی چسبیدن باکتری بسیار محدود است. چسبیدن باکتری تحت تأثیر عواملی مثل بار الکتریکی سطوح، میزان هیدروفوبیستی بانرژی آزاد سطح مثل سطوح استیل زنگ نزن و شیشه که بیشتر هیدروفیلیک هستند. این سطوح نسبت به سطوح تفلون و نایلون اجازه بیشتری به باکتری می‌دهند که اتصال و شکل-گیری بهتری داشته باشند (۱۳). دما یکی از فاکتورهای بسیار مهم در تشکیل بیوفیلیم است. متابولیسم تغذیه‌ای مربوط به باکتری مستقیماً به حضور آنزیم‌ها وابسته است. از آنجایی که کنترل میزان واکنش آنزیم‌ها به دما وابسته است به همین خاطر شکل‌گیری بیوفیلیم به حضور و واکنش آنزیم‌ها وابسته است که آنزیم‌ها سبب پیشرفت و توسعه سیستم بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی باکتری می‌گردد و به جرأت می‌توان گفت که دما نقش بسیار مهمی در توسعه و تکامل بیوفیلیم دارد (۱۶). اثر دما بر روی چسبندگی گونه‌های لیستریا به گستردگی مورد مطالعه قرار گرفته است با این حال نتایج گزارش شده به نظر ناقص می‌رسد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که چسبندگی لیستریا مونوسی‌توزنز به‌شدت تحت تأثیر دمای رشد می‌باشد. به همین دلیل، میزان چسبندگی روی استیل ضدزنگ و پلاستیک در دماهای ۱۰، ۳۰، ۴۵ درجه سانتی‌گراد با افزایش دما افزایش می‌یابد (۱۳). در گزارشی دیگر آمده است که چسبندگی لیستریا مونوسی‌توزنز روی استیل ضدزنگ در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (۱۷). سن بیوفیلیم یک عامل مهم است که مقاومت آن را در برابر ضد عفونی‌کننده‌های مختلف بیشتر می‌کند. یک اجماع عمومی است که باکتری‌های موجود در بیوفیلیم پس از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش سن بیوفیلیم، بقا آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۷). اثر ترکیب چهارتایی آمونیوم بر بیوفیلیم ۴ روزه باعث کاهش ۰/۳۸

۲۰ روزه نیز مؤثر است. فاژها توانایی تولید پلی ساکارید دپلیمرز دارد که توانایی تجزیه ماتریس آگزوپلی ساکاریدی بیوفیلم را دارد (۵). در مطالعه‌ی حاضر که اثر باکتریوفاژ بر روی بیوفیلم سالمونلاتایفی موریوم در محیط گوشت مرغ انجام گرفت نتایج نشان داد که باکتریوفاژ اثری بر روی بیوفیلم سالمونلا نداشته و تنها اندکی کاهش رشد در بیوفیلم یک‌روزه دیده شده است که آن هم به دلیل نابالغی بیوفیلم و آگزوپلی ساکارید جوان است. مدت‌زمان برخورد فاژ با بیوفیلم هم اثری روی کاهش بیوفیلم نداشته و در زمان ۱۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه نتایج مشابه بوده است. در مجموع می‌توان گفت که استفاده به‌تنهایی فاژ مورد استفاده در این مطالعه اثربخشی لازم روی هر دو بیوفیلم ۱ و ۷ روزه نداشته و نیاز است استفاده از روش‌های ترکیبی دیگر همراه با استفاده از فاژ و یا استفاده از کوکتل از چندین فاژ در این زمینه مورد بررسی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به خاطر تأمین بودجه اجرای این تحقیق کمال تشکر و قدردانی به‌عمل می‌آید.

References:

1. Moretro T, Heir E, Nesse LL, Vestby LK, Langsrud S. Control of Salmonella in food related environments by chemical disinfection. *Food Res Int* 2012; 45(2):532-44.
2. Srey S, Jahid IK, Ha SD. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 2013; 31: 572-85.
3. Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, et al. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. *Int J Food Microbiol* 2011; 149:262-8.
4. Takahashi H, Suda T, Tanaka Y, Kimura B. Cellular hydrophobicity of *Listeria monocytogenes* involves initial attachment and biofilm formation on the surface of polyvinyl chloride. *Lett Appl Microbiol* 2010; 50:618-25.
5. Harper D, Parracho H, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, et al. Bacteriophages and biofilms. *Antibiotics* 2014; 3:270-84.
6. Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Choriantopoulos N, Langsrud S, Møretro T, Habimana O, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Sci* 2014; 97:298-309.
7. Habimana O, Heir E, Langsrud S, Asli AW, Moretro T. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in biofilms formed by an *Acinetobacter calcoaceticus* isolate from meat-processing environments. *Appl Environ Microbiol* 2010;76(13):4557-9.

¹ multiplicity of infection

8. Paulson, DS. Applied biomedical microbiology: a biofilms approach. Boca Raton: CRC Press; 2010. p.164.
9. Tran PL, Hamood AN, de Souza A, Schultz G, Liesenfeld B, Mehta D, et al. A study on the ability of quaternary ammonium groups attached to a polyurethane foam wound dressing, to inhibit bacterial attachment and biofilm formation. *Wound Repair Regen* 2014; 23(1):74-81.
10. Clokie MR, Kropinski AM. Bacteriophages [Internet]. Springer; 2008 [cited 2017 Jun 15]. Available from: <http://link.springer.com/content/pdf/10.1007/978-1-60327-565-1.pdf>.
11. Shin-Hee K, Cheng-I. Biofilm Formation by multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. *J Food Protect* 2007; 70:22-9.
12. Valeriano C, de Oliveira TLC, de Carvalho SM, Cardoso MdG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control* 2012; 25:673-80.
13. Duong NNH. Formation of *Salmonella* Typhimurium biofilm under various growth conditions and its sensitivity to industrial sanitizers. (Dissertation). Singapore: National University of Singapore; 2012.
14. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol* 2010; 109: 1117-31.
15. Rode TM, Langsrud S, Holck A, Møretø T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 372-83.
16. Garrettet TR, Bhakoo M, Zhang, Z. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Prog Nat Sci* 2008; 18:1049-56.
17. Norwood DE, Gilmour A. The differential adherence capabilities of two *Listeria monocytogenes* strains in monoculture and multispecies biofilms as a function of temperature. *Lett Appl Microbiol* 2001; 33: 320-24.
18. Ramesh N, Joseph SW, Carr LE, Douglass LW, Wheaton FW. Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry Sci* 2002; 81: 904-10.
19. Belessi CE, Gounadaki A, Psomas AN, Skandamis P. Efficiency of different sanitation methods on *Listeria monocytogenes* biofilms formed under various environmental conditions. *Int J Food Microbiol* 2001; 145: 46-52.
20. Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. *J Ind Microbiol* 1996; 16:331-41.
21. Sukumaran AT, Nannapaneni R, Kiess A, Sharma CS. Reduction of *Salmonella* on chicken meat and chicken skin by combined or sequential application of lytic bacteriophage with chemical antimicrobials. *Int J Food Microbiol* 2015; 207: 8-15.
22. Lee YD, Kim JY, Park JH. Characteristics of coliphage ECP4 and potential use as a sanitizing agent for biocontrol of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Control* 2013; 34:255-60.
23. Liao KS, Lehman SM, Tweardy DJ, Donlan RM, Trautner BW. Bacteriophages are synergistic with bacterial interference for the prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on urinary catheters. *J Appl Microbiol* 2012; 113:1530-9.

24. Chhibber S, Nag D, Bansal S. Inhibiting biofilm formation by *Klebsiella pneumoniae* B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. *BMC Microbiol* 2013; 13(1):174.
25. Montañez-Izquierdo VY, Salas-Vázquez DI, Rodríguez-Jerez JJ. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling *Listeria monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces. *Food Control* 2012; 23(2):470-7.

EFFECT OF GROWTH TEMPERATURE AND BIOFILM AGE ON THE RESISTANCE OF SALMONELLA TYPHIMURIUM BIOFILMS TO BACTERIOPHAGE

Rebwar Mohammadi¹, Mehran Moradi^{2*}, Hossein Tajik^{3*}, Hadi Ghaseemahdi⁴, Rojan Modaresi⁵, Surur Khalili Sadaghiani⁶

Received: 11 Feb, 2017; Accepted: 25 Apr, 2017

Abstract

Background & Aims: *Salmonella* Typhimurium is among the most important food-borne disease. This study was conducted to investigate the anti-biofilm effect of the *S. Typhimurium* phage against *Salmonella* formed in chicken meat model.

Materials & Methods: The effects of different phage concentrations (10^4 , 10^6 and 10^8 PFU/mL) with two contact times (10 and 20 min) on one and 7 days old biofilm adhered to stainless steel coupon in chicken broth at 15, 8 and 4 °C were evaluated.

Results: The results showed that the bacteria had an ability to adhere to the coupons and form biofilm in chicken broth, the biofilm levels were significantly ($0.05 \geq P$) higher at 15 °C for 7 days. Increasing the phage concentrations, resulted in no significant biofilm removal properties and the activity was not influenced by the phage contact times. The anti-biofilm activity was influenced by the age of biofilm, in this case, one day-old biofilm was more sensitive than 7 days old.

Conclusion: From the study it can be concluded, that in chicken model, the phage exhibited biofilm removal activity on *Salmonella* only at high concentrations, then the use of a combination of methods to control biofilm is recommended.

Keywords: Bacteriophage, *Salmonella* Typhimurium, Biofilm, Chicken

Address: Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Tel: (+98) 4431942633

Email: m.moradi@urmia.ac.ir

SOURCE: URMIA MED J 2017; 28(3): 181 ISSN: 1027-3727

¹ Graduate in Veterinary Medicine (D.V.M), Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

² Assiatnat Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran (Corresponding Author)

³ Professor, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁴ Ph.D Student, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁵ Ph.D Student, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

⁶ Ph.D in Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran