

Study of a Mathematical Model of Biocide Effect on a Biofilm Isolated from a Cooling System Using the Microtiter Plate

Shahryar Shakeri¹,
Roha Kasra Kermanshahi²,
Gity Emtiazi²

بررسی مدل ریاضی تأثیر بیوساید بر بیوفیلم جدا شده از سیستم خنک کننده به روش میکروتیتر پلیت

شهریار شاکری^۱ روحا کسری کرمانشاهی^۲

گیتی امتیازی^۲

(دریافت ۸۴/۱/۲۰ پذیرش ۸۴/۴/۱۷)

چکیده

Abstract

Bacterial colonization on metal surfaces and their metabolic activities lead to biocorrosion. In fact, any agent removing the biofilm or decreasing its thickness is capable of preventing biocorrosion. Biocides make up one such agent. These agents can control bacterial biofilms, remove these structures, or kill cells within them. The object of this research is to study the thermodynamic model of biocide penetration into the biofilm using the microtiter plate test. First, the biofilm bacteria were isolated to form a mix-bacterial biofilm. The biocide effect on the mix-biofilm was then determined using the microtiter plate test. Results from this test were compared with those from a thermodynamic model and it was revealed that the effects of oxidizing biocides such as sodium hypochlorite and hydrogen peroxide are in good agreement with the results from the model. The results indicated that increased biocide concentration leads to the removal of the biofilm or to the kill-off of the cells within it. However, in the case of non-oxidizing biocides such as sulfathiazol, glutaraldehyde, and alkyl dimethyl ammonium chloride, the efficiency results did not agree well with the results from the thermodynamic model such that increased biocide concentration did not remove the biofilm nor did it kill off the cells within it.

Key words: Biofilm, Corrosion, Biocides, Microtiter Plate, Thermodynamic Model.

حضور فیزیکی سلولهای باکتری بر روی فلزات و سطح آنها و فعالیت‌های متابولیکی آنها می‌تواند سبب خوردگی میکروبی شود. در حقیقت، هر عاملی که بتواند ضخامت بیوفیلم را کاهش دهد و یا آن را حذف کند، می‌تواند خوردگی را نیز کاهش دهد. بیوسایدها یکی از این عوامل هستند که می‌توانند بیوفیلم را کنترل کنند. این مواد می‌توانند به داخل بیوفیلم نفوذ کنند و در نتیجه سبب حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای درون آن شوند. هدف این تحقیق بررسی مدل ریاضی ترمودینامیکی نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت می‌باشد. در این تحقیق بعد از جداسازی باکتریهای بیوفیلم، بیوفیلم مخلوط تشکیل شد و سپس اثر بیوسایدها بر روی آن توسط روش میکروتیتر پلیت بررسی شد. در نهایت مقایسه نتایج حاصل از این روش با مدل ریاضی نشان داد که اثر بیوسایدهای اکسید کننده مثل هیپوکلریت سدیم و هیدروژن پراکساید بر روی بیوفیلم با این مدل سازگاری دارد. یعنی با افزایش غلظت بیوساید میزان حذف بیوفیلم و کشته شدن سلولهای درون آن افزایش می‌یابد. ولی کارایی بیوسایدهای غیر اکسیدکننده مثل سولفاتیازول، گلوآرالدهید و آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید با این مدل سازگاری ندارد و با افزایش غلظت این بیوساید ها هیچ تغییری در حذف بیوفیلم و یا کشته شدن سلولها مشاهده نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، خوردگی، بیوساید، میکروتیتر پلیت،

مدل ترمودینامیک.

- 1- Graduate Student of Microbiology, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan
- 2- Professors of Microbiology, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
- ۲- استاد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

حضور فیزیکی سلولهای باکتری بر روی فلزات و سطح آنها و فعالیتهای متابولیکی آنها می تواند سبب خوردگی میکروبی شود. ضخامت بیوفیلم سبب ایجاد یک سری نقاط بی هوازی در کف بیوفیلم می شود که فاقد اکسیژن می باشند [۱]. در نتیجه غلظتهای متفاوت اکسیژن در دو محل بر روی سطح فلز می تواند سبب تفاوت در پتانسیل الکتریکی و نهایتاً منجر به خوردگی شود [۲]. همچنین بعضی از باکتریهای بیوفیلم قادرند مواد شیمیایی خورنده مثل اسید و گاز هیدروژن را در طول متابولیسم خود تولید کنند. نواحی غیرهوازی در بیوفیلم نیز می توانند دارای باکتریهای احیاء کننده سولفات باشند. این گروه از باکتریها، سولفات را به سولفید هیدروژن احیاء می کنند که فلزات را می خورد [۳]. موضوع جدیدی که در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است، میکروارگانیسمهای ایجاد کننده بیوفیلم می باشد که کنترل آنها در حقیقت کنترل تمام باکتریها و حتی فرصت ندادن به زیانی است که از سوی باکتریهای احیاء کننده سولفات به سیستم وارد می شود [۴]. در حقیقت، هر عاملی که بتواند ضخامت بیوفیلم را کاهش دهد و یا آن را حذف کند، می تواند نواحی بی هوازی ای که سبب خوردگی می شوند را نیز کاهش دهد. یک نمونه از تیمار شیمیایی به کار برده شده برای جلوگیری و کنترل تشکیل بیوفیلم و عواقب ناشی از آن، استفاده از بیوسایدها می باشد. بیوسایدها مواد خالص یا ترکیبات مخلوطی هستند که قادرند میکروارگانیسمها را بکشند یا رشد آنها را مهار کنند [۵]. این مواد می توانند به داخل بیوفیلم باکتری نفوذ کنند و در نتیجه سبب حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای درون آن شوند. کارایی یا بازده یک بیوساید بستگی به نوع میکروارگانیسم و شرایط راه اندازی سیستم مورد نظر دارد [۶]. بنابراین بررسی نفوذ بیوسایدها به داخل بیوفیلم و اثرات آنها بسیار با اهمیت می باشد. اما باید توجه داشت که بعضی بیوسایدها می توانند به داخل بیوفیلم نفوذ کنند، ولی اثر کمی در حذف بیوفیلم و کشتن سلولهای درون آن دارند. هدف این تحقیق بررسی مدل ترمودینامیکی نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت و مقایسه نتایج حاصل از این روش با این مدل ریاضی می باشد.

۱-۲- بیوسایدهای آزمایش شده در این تحقیق

در این تحقیق، اثر سه نوع بیوساید زیر با غلظتهای متفاوت برای نفوذ به داخل بیوفیلم مخلوط باکتریها توسط روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است که اساس انتخاب غلظتهای مورد استفاده با توجه به مراجع متعدد می باشد.

بیوسایدها به این قرارند:

بیوسایدهای اکسید کننده مثل سدیم هیپوکلریت در غلظت های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و هیدروژن پراکساید در غلظت های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام؛

بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل گلو تار آلدهید در غلظت های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی پی ام و سولفاتیزول در غلظت های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ پی پی ام؛

بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی مثل آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلراید (ABDAC) در غلظت های ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ پی پی ام.

۲-۲- نمونه برداری، جداسازی و شناسایی باکتریها

در این تحقیق نمونه برداری به دو صورت انجام شد:

الف- از قسمت های مختلف سیستم خنک کننده کارخانه پلی اکریل اصفهان که در شکل ۱ نشان داده شده است، نمونه های آب و همچنین تا حد امکان نمونه های بیوفیلم برداشته و به داخل ظروف نمونه برداری انتقال داده شد؛

ب- در نوع دوم نمونه برداری، کوپنهای فلزی در مسیر جریان آب سیستم خنک کننده (محل های نشان داده شده در شکل ۱) قرار گرفت. بعد از گذشت مدت ۴۰ روز، این کوپنها از مسیر جریان خارج و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

برای جداسازی باکتریها بعد از تهیه سوسپانسیون از نمونه های نوع اول، سریال رقت تهیه شد و روی محیط نوترینت آگار کشت صورت گرفت. در مورد کوپنها، بعد از شست و شوی آنها با آب مقطر استریل، بیوفیلم سطح کوپنها به وسیله یک اسپاتول تحت شرایط استریل در ۱۰ میلی لیتر بافر استریل قرار گرفت و سوسپانسیون تهیه شد و بعد از تهیه سریال رقت، کشت صورت گرفت. این

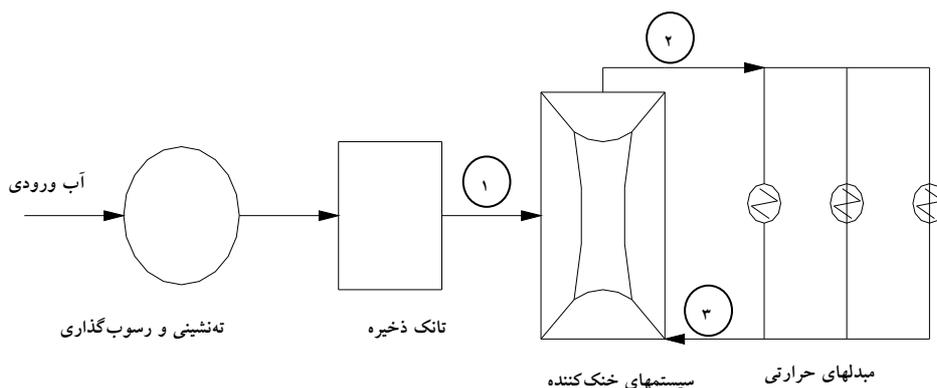
برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتریهای جدا شده، یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته^۱ از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی براث^۲ در دمای ۳۰°C تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محلیت

محیطها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان، جداسازی باکتریها و شناسایی آنها صورت گرفت [۷].

۲-۳- مقایسه بین قدرت باکتریهای جداسازی شده برای تشکیل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت

^۱ Overnight Culture

^۲ TSB



شکل ۱- نمایی از سیستم خنک کننده و محلهای نمونه برداری

میکروبی از چاهکها خارج شد و هر چاهک، سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. همچنین پلیتها به منظور حذف سلولهای پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده شد. سپس باکتریهای متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانل ۹۶٪ تثبیت شد. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهکها تخلیه شد و پلیتها در یک محل در آزمایشگاه به منظور خشک شدن قرار گرفت. بعد از خشک شدن، پلیتها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویوله ۲٪ که برای رنگ آمیزی گرم مورد استفاده قرار می گیرد، رنگ آمیزی و سپس رنگهای اضافی از طریق قرار دادن پلیتها در مسیر جریان آب لوله شهری شسته شد. این رنگ برای سنجش میزان بیوفیلم بسیار مناسب است و همچنین می تواند برای سنجش اثرات بیوسایدها بر روی بیوفیلم مورد استفاده قرار گیرد.

بعد از شستن رنگهای اضافی، پلیتها در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شدند. پس از خشک شدن پلیتها، بیوفیلها به صورت حلقه های ارغوانی رنگی بر روی دیواره چاهکها قابل مشاهده بود. سپس سنجش کمی تولید بیوفیلم به وسیله اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک

کشت به ۱۰ میلی لیتر از محیط تریپتیکاز سوی براث استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق خواندن جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم گردید. این عمل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل میلتون روی^۳ صورت گرفت. کدورت سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک فارلند و حاوی بیش از ۱۰^۸ باکتری در هر میلی لیتر بود. سپس از این سوسپانسیون، ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکروپلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکروپلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شد که به این ترتیب در هر چاهک نزدیک به ۲۵×۱۰^۶ CFU/well باکتری وجود داشت. چاهکهای شاهد، تنها حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث استریل می باشند. جنس میکروپلیت های ۹۶ چاهکی، پلی استیرن^۴ می باشد و ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر است. سپس سطح پلیتها پوشانده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰°C صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون

^۳ Milton Roy

^۴ Polystyrene

دقیقه رنگ شد. از آن جا که کریستال ویوله رنگی است که می‌تواند کل بیوفیلیم^۴ را رنگ کند، یک رنگ مناسب برای سنجش حذف بیوفیلیم محسوب می‌شود.

بعد از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه، چاهکها با آب شیر شسته شدند و سپس با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ پر شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و بعد از این مدت به شدت تکان داده شد و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. سپس سنجش کارایی بیوساید در حذف بیوفیلیم یا درصد کاهش^۵ بیوفیلیم از طریق جذب نوری چاهکهای تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطه^۱ محاسبه شد [۹]:

$$(1) \quad \text{کاهش} = \frac{[(C-B)-(T-B)]}{(C-B)} \times 100 = \text{درصد}$$

کاهش

که در آن:

C: میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل

B: میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد

T: میانگین جذب نوری چاهکهای تیمار شده

باید توجه داشت که حذف ناقص بیوفیلیم توسط بیوسایدها، سبب می‌شود که قسمت مانده بیوفیلیم روی سطوح، که هنوز تعدادی از سلولهای زنده را دارا می‌باشد، مجدداً رشد کند و در نتیجه بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی بیوفیلیم به حالت اولیه خود برگردد و ساختمان خود را تعمیر کند و دوباره سبب آلودگی سیستم شود. از این رو توجه به این نکته که بعد از اثر عوامل ضد میکروبی چه میزان و یا چه تعداد از سلولهای درون بیوفیلیم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند، ضروری است. در نتیجه دوباره آزمایش میکروپلیت همانند روش بالا انجام شد. ولی در نهایت به جای کاربرد کریستال ویوله از یک رنگ تنفسی به نام ۲، ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید یا TTC استفاده شد. TTC محلول در آب می‌باشد و پتانسیل ردوکس آن در حدود ۰/۰۸۷- است و می‌تواند به عنوان یک پذیرنده الکترون برای

۳۳٪ به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری (OD)^۱ رنگ کریستال ویوله موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (استات فاکس ۲۱۰۰)^۲ خوانده شد. در نهایت، دسته بندی باکتریها برای تشکیل بیوفیلیم بر اساس جذب نوری بیوفیلیم باکتری صورت گرفت [۸].

۲-۴- روش انجام آزمایش میکروتیتر پلیت برای تعیین اثر بیوسایدها در نفوذ به داخل بیوفیلیم مخلوط باکتریها و حذف بیوفیلیم و یا کشتن سلولهای درون آن

برای سنجش اثر عوامل ضد میکروبی بر روی حذف بیوفیلیم مخلوط و یا کشتن سلولهای درون آن، بعد از آماده سازی کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته و فعال سازی باکتریها، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله‌ها تهیه شد. سپس از هر سوسپانسیون به مقدار ۱ mL، به ۵۰ mL تریپتیکاز سوی برات استریل تلقیح شد و سپس تمام چاهکها در یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۵۰ میکرولیتر از این محلول پر شد (CFU/well^۳ ۱۰×۲۵). بعد از تلقیح، سطح پلیتها پوشانده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد صورت گرفت. سپس عوامل ضد میکروبی بعد از خارج کردن محتویات چاهکها و شست و شوی آنها مورد استفاده قرار گرفت. (تعداد نمونه‌ها در این آزمایش برابر ۸ می‌باشد).

تمام این عوامل ضد باکتریایی به مدت یک ساعت روی بیوفیلیم اثر داده شد. همچنین ۸ چاهک در یک ستون میکروپلیت، یک تیمار مشابه دریافت کردند. به دلیل احتمال تراکم بالای سلولهای بیوفیلیم، در خشتی کردن عوامل ضد میکروبی که با این حجم (۲۵۰ میکرولیتر) به کار رفته اند، هر بیست دقیقه یک بار این عوامل با عوامل تازه جایگزین^۳ شدند. علاوه بر این، ستونهای تیمار شده، ستونهای کنترل (حاوی بیوفیلیم و بدون تیمار) و همچنین ستونهای شاهد (حاوی محیط برات استریل) در هر پلیت، در نظر گرفته شد. بعد از گذشت یک ساعت، عوامل ضد میکروبی به وسیله شستن چاهکها خارج شدند و سپس چاهکها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵

^۴ . Mass of Biofilm

^۵ . Percentage Reduction

^۱ Optical Density

^۲ ELISA Reader (Stat Fax-2100)

^۳ . Refresh

در این تحقیق باکتری‌های g^+ (به نسبت ۳۰٪) و g^- (به نسبت ۷۰٪) در بیوفیلم شناسایی شدند. جداسازی جنسهای میکروکوکوس، باسیلوس، آکینوباسیلوس، برانهاملا و آسیتوباکتر صورت گرفت. نتایج حاصل از روش میکروتیتر پلیت برای مقایسه بین قدرت باکتریهای ایزوله شده برای تشکیل بیوفیلم (شکل ۲)، نشان می‌دهد که بیوفیلم مخلوط باکتریهای جداسازی شده (جذب نوری بیوفیلم نزدیک به ۱/۴ می باشد)، بیشترین توانایی را در تشکیل از خود نشان داده است. در نتیجه بیوفیلم مخلوط انتخاب و اثر بیوسایدها بر روی آن توسط روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت.

۲-۳- نتایج مربوط به اثر بیوساید ها روی بیوفیلم مخلوط باکتریها

شکل ۳-الف اثر بیوساید هیپوکلریت سدیم را روی بیوفیلم مخلوط باکتریها (سویه های آسیتوباکتر، باسیلوس و میکروکوکوس با هم) را نشان می‌دهد. ستونهای CV، اثر حذفی و

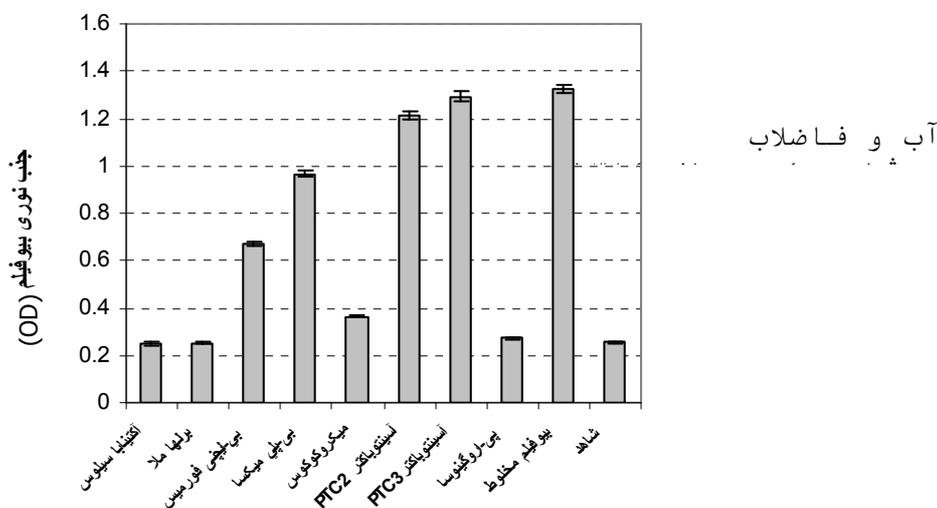
هیدروژنازهای متفاوت عمل کنند. تقریباً تمام میکروارگانیسمها توانایی احیاء TTC را به تری فینیل فورمازان یا TPF دارند که با توجه به رنگ قرمزی که در حین احیاء ایجاد می‌شود، می‌توان از روی خواندن جذب نوری این رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محاسبه کارایی بیوسایدها در کشتن سلولهای درون بیوفیلم، با توجه به فرمول بالا مشخص کرد که چه میزان از سلول های درون بیوفیلم توسط بیوساید کشته شده اند [۸].

۲-۵- آنالیزهای آماری

اختلاف بین میانگینهای به دست آمده در آزمایشهای بالا، توسط آزمون ویلکاکسون برای نمونه‌های مستقل (داده‌های مربوط به نمودار CV و TTC) و زوج شده (داده‌های مربوط به یک نمودار) با درجه اطمینان ۰/۰۵ و احتمال ۹۵٪ محاسبه شد.

۳- نتایج

۳-۱- باکتریهای جداسازی شده از بیوفیلم



شکل ۲- مقایسه بین قدرت باکتریهای ایزوله شده برای تشکیل بیوفیلم از طریق روش میکروتیتر پلیت

بیوفیلم موفق نیست. با افزایش غلظت بیوساید به ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام توانایی حذف بیوفیلم از ۶۶٪ تا ۸۳٪ افزایش می‌یابد. در این دو غلظت بیوساید هیپوکلریت سدیم نزدیک به ۱۰۰٪ از سلولهای درون بیوفیلم را کشته است. شکل ۳-ب اثر بیوساید هیدروژن پراکساید روی بیوفیلم مخلوط را نشان می‌دهد. H_2O_2 در دو غلظت پایین

ستونهای TTC، اثر کشندگی بیوسایدها را نشان می‌دهند. در غلظت ۱ و ۱۰ پی پی ام از این بیوساید به ترتیب ۴۱٪ و ۵۹٪ از بیوفیلم حذف شده است. این در حالی است که در این دو غلظت هیچ اختلاف معنی‌داری بین داده‌های حاصل از حذف بیوفیلم و کشتن سلولهای درون بیوفیلم وجود ندارد. بیوساید در این دو غلظت در کشتن سلولهای درون

در نهایت اثر آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلراید روی بیوفیلیم مخلوط باکتریها در شکل ۳-ه نشان داده شده است. در غلظت ۴۰۰ پی پی ام از این بیوساید نزدیک به ۱۶٪ از بیوفیلیم مخلوط حذف شده است. اما در سه غلظت بالاتر میانگین حذف بیوفیلیم نزدیک به ۳۰٪ می باشد. یعنی با افزایش غلظت بیوساید اثر حذفی آن افزایش چندانی پیدا نکرده است. اثر این بیوساید در کشتن سلولهای درون بیوفیلیم در دو غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام به ترتیب ۵۶٪ و ۸۹٪ می باشد. ولی اثر کشندگی این بیوساید در دو غلظت بالاتر به ۱۰۰٪ می رسد.

۴- بحث

۴-۱- بررسی مدل نفوذ بیوساید به درون بیوفیلیم

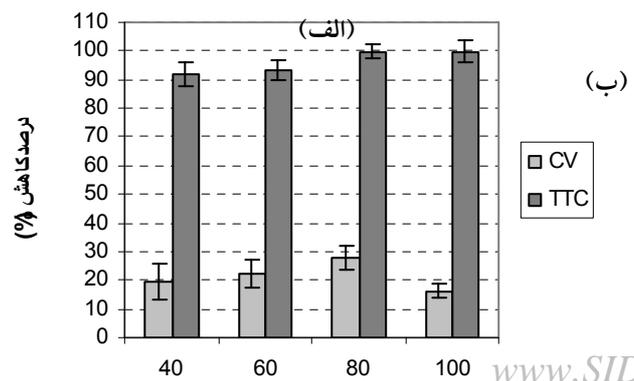
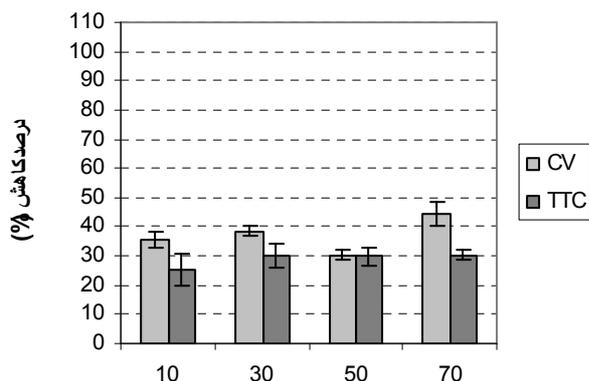
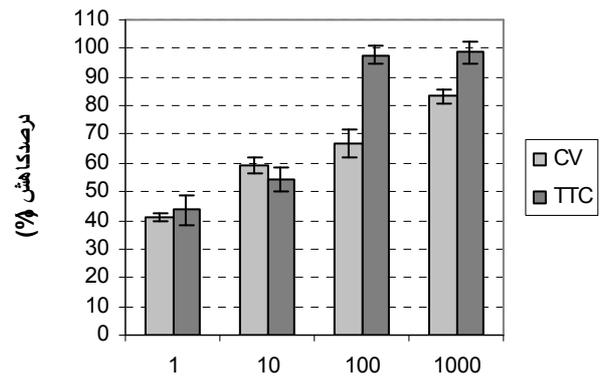
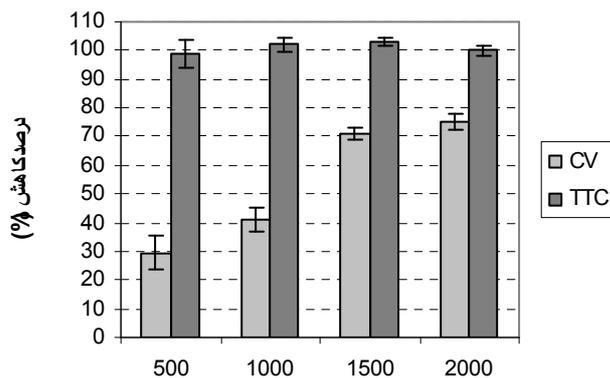
در این بحث سعی خواهد شد تا برای اولین بار به بررسی مدل نفوذ بیوساید به زیر بیوفیلیم باکتری پرداخته شود. به همین دلیل نظرات موافق و مخالف سایر محققین برای این مدل وجود ندارد. تمام توضیحات در مورد این مدل بر اساس مرجع [۱] می باشد و تنها هدف از این بحث بررسی و مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با مدل مذکور می باشد.

فرض می شود که تمامی شرایط لازم برای تشکیل یک بیوفیلیم باکتری موجود باشد و سرعت سیال نیز در سیستم کمتر از ۱/۵ متر

خود بین ۲۹٪ تا ۴۰٪ از بیوفیلیم مخلوط را حذف کرده است. این در حالی است که با افزایش غلظت بیوساید به ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام میزان حذف بیوفیلیم تا ۸۰٪ افزایش پیدا کرده است. قابل توجه است که در کمترین غلظت این بیوساید، تمام سلولهای درون بیوفیلیم کشته شده اند.

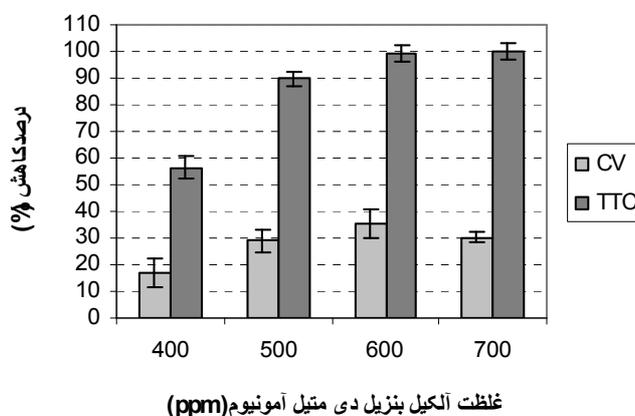
شکل ۳-ج اثر گلو تار آلدهید روی بیوفیلیم مخلوط باکتریها را نشان می دهد. با توجه به نمودار، اثر حذفی این بیوساید روی بیوفیلیم مخلوط بسیار ناچیز و نزدیک به ۲۰٪ برای اکثر غلظتهای مورد استفاده می باشد و با افزایش غلظت بیوساید هیچ تغییری در اثر حذفی آن دیده نمی شود. اما قدرت کشندگی این بیوساید روی سلولهای درون بیوفیلیم در کمترین غلظت مورد استفاده نزدیک به ۱۰۰٪ می باشد.

شکل ۳-د اثر بیوساید سولفاتیا زول روی بیوفیلیم مخلوط باکتریها را نشان می دهد. در غلظتهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ پی پی ام از این بیوساید، نزدیک به ۳۰٪ از بیوفیلیم مخلوط حذف شده است. در غلظت ۷۰ پی پی ام، این توانایی حذف بیوفیلیم به ۴۴٪ افزایش یافته است. اما با توجه به نمودارهای مربوط به کشتن سلولهای درون بیوفیلیم و حذف آن توسط بیوساید و عدم اختلاف معنی دار بین داده ها، مشخص می شود که این بیوساید در حذف بیوفیلیم و کشتن سلولهای درون بیوفیلیم ناموفق است.



(ج)

(د)



(ه)

شکل ۳- اثر حذفی (ستونهای CV) و کشندگی (ستونهای TTC) بر روی بیوفیلم مخلوط باکتری‌ها

CV: رنگ کریستال ویوله که بیانگر میزان حذف بیوفیلم توسط بیوساید می باشد

TTC: رنگ تری فنیل تترازولیوم کلرید که بیانگر میزان کشندگی سلول های درون بیوفیلم توسط بیوساید می باشد

بیوساید بستگی به فعالیت بیوساید دارد. زیرا اگر بیوساید به قدر کافی فعال باشد، به مرور زمان، تمامی بیوساید به داخل بیوفیلم وارد می شود.

بنابراین با توجه به رابطه فوق می توان گفت که با ثابت بودن مقدار C_s (مقدار مؤثر بیوساید روی بیوفیلم) تنها با افزایش زمان، میزان $C(h, t)$ (میزان بیوساید در زیر بیوفیلم) افزایش می یابد. برای مثال، اگر برای هیپوکلریت سدیم فرض شود که میزان بیوساید لازم برای حذف کامل بیوفیلم ۱۰۰ پی پی ام باشد، و همچنین فرض شود که بعد از گذشت زمان t_1 از اثر بیوساید روی بیوفیلم، ۲۰ پی پی ام و از گذشت زمان t_2 ، ۸۰ پی پی ام از

بر ثانیه باشد. همچنین بر اساس قانون دوم فیک داریم:

(۲)

$$C(h, t) = C_s [1 - \text{erf}(h / 2\sqrt{dt})]$$

که در آن:

erf: تابع خطا

C_s : مقدار بیوساید مؤثر برای حذف بیوفیلم

$C(h, t)$: مقدار بیوساید اندازه گیری شده در زیر بیوفیلم

d : ضریب نفوذ بیوساید به زیر بیوفیلم

h : ارتفاع بیوفیلم

t : زمان اثر بیوساید روی بیوفیلم

مقدار C_s در این تحقیق در آزمایشگاه و با استفاده از تکنیک میکروپلیت محاسبه شد. همچنین d برای هر

در مورد گلو تار آلد هید مطابق شکل ۳-ج، می توان گفت که این بیوساید حتی در غلظت های بالای خود نسبت به غلظت های پایین تر، اثر حذفی خوبی ندارد (میانگین اثر حذفی این بیوساید بین ۲۰٪ تا ۳۰٪ می باشد). ولی این بیوساید در کمترین غلظت خود تمام سلول های درون بیوفیلم را می کشد [۱۰].

از شکل ۳-د مشخص است که با افزایش غلظت سولفات تیا زول که در مدت زمان یک ساعت روی بیوفیلم اثر داده شده بود، هیچ افزایشی در توانایی این بیوساید برای حذف بیوفیلم و همچنین کشتن سلول های درون آن مشاهده نشد. در مورد آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید مطابق شکل ۳-ه، نیز با افزایش غلظت آن تنها ۳۰٪ از بیوفیلم در بالاترین غلظت بیوساید حذف شده است که اثر حذفی مناسبی نمی باشد. ولی اثر کشندگی بیوساید با افزایش غلظت، افزایش می یابد [۱۱].

۵- نتیجه گیری

می توان با توجه به توضیحات داده شده، منطبق استفاده از مقادیر بالای بیوساید های اکسید کننده را برای حذف بیوفیلم درک نمود. با توجه به مدل و بدون افزایش زمان، با تزریق مقدار زیاد بیوسایدی که توانایی خوبی در حذف بیوفیلم دارد، مقدار بیشتری از آن به زیر بیوفیلم نفوذ می کند تا در موقعی که تزریق بیوساید به سیستم با مقادیر اندک صورت پذیرد. در این تحقیق، با افزایش غلظت بیوساید های اکسید کننده مثل هیپوکلریت سدیم و هیدروژن پراکساید میزان حذف بیوفیلم نیز افزایش پیدا می کند. این بیوسایدها در کنترل و حذف بیوفیلم بسیار مؤثر می باشند. اما این مورد در رابطه با بیوساید های غیر اکسید کننده مثل گلو تار آلد هید، سولفات تیا زول و بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی مثل آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید دیده نشد و تنها اثر کشندگی بعضی از این بیوساید ها روی بیوفیلم افزایش پیدا کرد.

به طور کلی، در کنترل بیوفیلم توسط بیوسایدهای غیر اکسید کننده باید به این نکته توجه داشت که این بیوسایدها در غلظت های مورد آزمایش در این تحقیق توانایی حذف بیوفیلم را ندارند. در حقیقت تیمار بیوفیلم با این بیوسایدها سبب حذف ناقص بیوفیلم می شود و در نتیجه با توجه به نسبت رشد بالای سلولها، بیوفیلمی که به طور ناقص

بیوساید به داخل بیوفیلم نفوذ کرده است، با حل معادله (۲) برای زمان های t_1 و t_2 خواهیم داشت:

$$t_2 = 26t_1$$

یعنی این که برای نفوذ ۸۰ پی پی ام از بیوساید به داخل بیوفیلم، نیاز به گذشت زمان بسیار زیادی می باشد) که این زمان ۲۶ برابر زمان لازم برای نفوذ ۲۰ پی پی ام از این بیوساید به داخل بیوفیلم می باشد). بنابراین می توان در واحد زمان (با توجه به مدل)، با تزریق مقدار زیاد بیوساید، باعث شد تا مقادیر بیشتری از بیوساید به داخل بیوفیلم نفوذ کند تا در موقعی که تزریق بیوساید با مقادیر اندک صورت پذیرفت به راندمان مورد نظر دست یافت. همچنین با توجه به فرمول می توان ذکر کرد که نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم، علاوه بر زمان، به عوامل دیگری از جمله ضریب نفوذ بیوساید و ارتفاع بیوفیلم یا ضخامت آن نیز بستگی دارد.

در این تحقیق، تمام بیوسایدهای مورد استفاده در غلظت های مختلف، تنها در مدت زمان یک ساعت روی بیوفیلم اثر شدند [۹]. با توجه به شکل ۳-الف، مشخص می شود که هیپوکلریت سدیم بیشتر در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام موفق به حذف قسمت زیادی از بیوفیلم باکتریها شده است. در دو غلظت ۱ و ۱۰ پی پی ام از این بیوساید، با مدت زمان اثر یک ساعت روی بیوفیلم، میزان حذف بیوفیلم پایین می باشد. با مقایسه این نتایج با مدل فوق، می توان ذکر کرد که غلظت های بالای هیپوکلریت سدیم نسبت به غلظت های پایین آن و با مدت زمان اثر یکسان روی بیوفیلم، کارایی بسیار بالایی در حذف بیوفیلم دارند و در مدت زمان یک ساعت میزان بیشتری از بیوساید در غلظت های بالاتر به زیر بیوفیلم نفوذ کرده است و سبب حذف بیوفیلم شده است. همچنین با افزایش غلظت بیوساید قدرت کشندگی آن نیز افزایش پیدا می کند. در مورد هیدروژن پراکساید مطابق شکل ۳-ب، می توان این گونه ذکر کرد که افزایش غلظت این بیوساید در مدت زمان اثر یک ساعت، اثر حذفی بیوساید روی بیوفیلم مخلوط باکتریها را بالا برده است. همچنین غلظت های پایین این بیوساید کارایی بسیار عالی در کشتن سلول های بیوفیلم دارند.

حذف شده است، دوباره رشد کرده و به حالت اولیه خود برمی‌گردد. در نهایت، می‌توان بیان نمود که این مدل برای بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل گلووتارآلدهید، سولفاتیاژول و آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید صدق نمی‌کند و تنها می‌توان آن را به بیوسایدهای اکسید کننده مثل هیپوکلریت سدیم و هیدروژن پراکساید نسبت داد.

۱- جواهر دشتی، ر. (۱۳۷۸). "خوردگی میکروبی"، انتشارات بهروزان، تهران، ۱۷۰ صفحه.

- 2- Danese, P. N., Pratt, L. A., and Kolter, R. (2001). "Biofilm formation as a developmental process." *J. Methods in Enzymol*, 336, 19– 26.
- 3- Costerton, J. W., and Lashen, E. S. (1984). "Influence of biofilm on efficiency of biocides on corrosion- causing bacteria." *J. Material Performance*, 23, 13-18.
- 4- Alasri, A., Roques, C., Cabassud, C., Michel, G., and Aptel, P. (1992). "Effects of different biocides on a mixed biofilm produced on a tygon tube and on ultrafiltration membranes." *J. Spectra*, 168, 21– 24.
- 5- Beer, D. D., Srinivasan, R., et al. (1994). "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection." *J. Applied Environmental Microbiology*, 60, 4339–4344.
- 6- Cochran, W. L., et al. (2000). "Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to hydrogen peroxide and monochloramine." *J. Applied Microbiology*, 88, 22- 30.
- 7- Krieg, N. R., et al. (1998). *Bergeys manual of determinative for bacteriology*, Williams and Wilkins, New York.
- 8- Stewart, S. P., Zilver, N., Hamilton, A. M., and Pitts, B. (2003). "A microtiter plate screening method for biofilm disinfection and removal." *J. Microbiology Methods*, 54, 269-276.
- 9- Green, P. N. (1993). " Efficiency of biocides on laboratory generated *Legionella* biofilms." *J. Letter Applied Microbiology*, 17, 158– 161.
- 10- Huang, C. T., Yu, F. P., McFeters, G. A., and Stewart, P. S. (1995). "Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection." *J. Applied Environmental Microbiology*, 61(6), 2252– 2256.
- 11- Ludensky, M. (2003). "Control and monitoring of biofilms in industrial applications." *J. International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 255- 263.