مطالعه تشکیل بیوفیلم توسط باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} بر روی سطوح استیل زنگ نزن و لاستیک تماسی با شیر

دکتر محمد حسین موثق غازانی*[۱]، دکتر گیتی کریم[۲]، دکتر علیرضا احمد زاده[۳]

چکیده

بیوفیلم مجموعه ای از سلول های زنده باکتریایی می باشد که به سطوح و همدیگر متصل می شوند. تشکیل بیوفیلم توسط میکروارگانیسم های بیماریزا با منشا غذایی و مولد فساد بر روی سطوح تماسی با غذا در کارخانجات فرآوری مواد غذایی از نظر بهداشت عمومی و ایجاد آلودگی تقاطعی اهمیت فراوانی دارد. برای مطالعه ۱۶ سطح از استیل زنگ نزن و لاستیک جداگانه استفاده گردید. باکتری اشریشیا کلی به ظرف حاوی شیر استریلیزه و سطح مربوطه منتقل گردید. میانگین تعداد باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} در بیوفیلم حاصله بر روی سطح استیل زنگ نزن و لاستیک به ترتیب ۰/۲۷ ±۹/۵۶ و۰/۱۵ ±۹/۱۰ $Log\ CFU/cm^2$ بود. تفاوت معنی داری بین تعداد باکتری شرکت کننده در بیوفیلم حاصله بر روی دو نوع سطح مشاهده نگردید($P>0/05$). بر اساس نتایج این تحقیق باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} توانایی تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح تماسی با غذا شامل استیل زنگ نزن و لاستیک را دارد. با توجه به بررسی و جستجوی گروه، به نظر می رسد که این مطالعه برای اولین بار انجام می گیرد.

واژگان کلیدی: *بیوفیلم، اشریشیا کلی، استیل زنگ نزن، لاستیک*

مقدمه

بیوفیلم (زیست لایه) مجموعه ای از سلول های زنده باکتریایی می باشد که به سطوح متصل می شوند. اتصال میکروارگانیسم به مواد غذایی و سطوح تماسی با غذا مشکلات بهداشتی و زیان های اقتصادی ناشی از فساد مواد غذایی را بدنبال دارد. امروزه بیوفیلم ها مورد توجه دانشمندان در رشته های مختلف نظیر پزشکی، محیط زیست،فرآوری مواد غذایی و... قرار گرفته اند. بیوفیلم ها

Biofilm formation of Escherichia coli O_{111} on milk contact stainless steel and rubber surfaces

Movassagh Ghazani , M.H.[1*], Karim ,G.[2], Ahmadzadeh, A.R.[3]

1-Graduated of Food Hygiene, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran ,Iran (Movassagh2@yahoo.com)*

2-Department of Food Hygiene, Faculty of Specialized Veterinary Sciences, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

3-Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Shabestar Branch, Iran

A biofilm can be defined as a sessile bacterial community of cells that live attached to each other and to surfaces. Attachment and biofilm formation by food-borne pathogens and spoilage microorganisms on food contact surfaces in processing plants are a public health and cross-contamination concern. For this study 16 stainless steel chips and 16 rubber chips were used. E.coli strain was added to the beakers with UHT milk and the samples. The biofilm of Escherichia coli O_{111} was formed with a mean cell density of 9.56± 0.27, 9.10± 0.15 log CFU/cm^2 on stainless steel and rubber respectively.There was no significant difference ($p>0.05$) between bacterial counts of two type of surfaces. It can be concluded that Escherichia coli O_{111} can survive on milk contact surfaces, forming biofilm. This is the first report, as far as we are aware, of biofilm formation by Escherichia coli O_{111}on milk contact stainless steel and rubber surfaces.

Key words: *Biofilm, Escherichia coli, stainless steel, rubber*

*۱- دانش آموخته دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی،دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایرانMovassagh2@yahoo.com

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران

۳- دانشکده کشاورزی ، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شبستر، ایران

در کارخانجات فرآوری مواد غذایی یکی از علل فساد مواد غذایی می باشند. بیوفیلم هایی که حاوی باکتری های بیماریزا نظیر سالمونلا (۴، ۱۰، ۱۱و۲۱)، کلبسیلا (۱۱و۱۷)، سودوموناس(۲)، کمپیلوباکتر و اشریشیا کلی سروتیپ $O_{157}:H_7$ (۲۱) و لیستریا می باشند (۱۳و۱۹). توسط محققین گزارش شده اند. چنین بیوفیلم هایی یکی از منابع آلودگی مواد غذایی می باشند که در سطوح تماسی با غذا تشکیل شده و مشکل ساز هستند. امکان تشکیل بیوفیلم در هر سطحی که در محیط حاوی باکتری ها قرار گیرد، وجود دارد. در مکان های فرآوری مواد غذایی، باکتری ها همراه با سایر مولکول های آلی و غیر آلی نظیر پروتئین های گوشت و شیر جذب سطوح شده و شرایط ایجاد بیوفیلم را فراهم می کنند. این مولکول های آلی، غیر آلی و میکروارگانیسم ها از طریق انتشار و یا جریان متلاطم مایع، بر روی سطوح منتقل می شوند.این مطالعه جهت بررسی توانایی باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} در تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح تماسی با شیر شامل استیل زنگ نزن و لاستیک انجام گرفت.

مواد و روش کار

۱) باکتری مورد مطالعه

جهت انجام مطالعه از باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} (PTCC1270) مورد تائید پژوهشکده علمی و صنعتی ایران استفاده گردید.

۲) تشکیل بیوفیلم

برای مطالعه از دو نوع سطح رایج در صنایع لبنی شامل استیل زنگ نزن و لاستیک استفاده گردید. ابتدا سطوح استیل زنگ نزن ($4\ cm^2$) با استون بخوبی شستشو داده می شد و سپس در داخل محلول اسید کلریدریک ۵ نرمال بمدت ۱۵ دقیقه قرار می گرفت و سپس با محلول پاک کننده شستشو داده می شد و در نهایت با آب دیونیزه آبکشی نهائی انجام می گرفت. سطوح لاستیک ($4\ cm^2$) با محلول پاک کننده شستشو داده می شد. برای مطالعه ۱۶ سطح از هر نوع مورد استفاده قرار می گرفت.

ابتدا دو سطح از هر نوع در داخل بشری به گنجایش ۱۰۰۰ میلی لیتر حاوی ۲۰۰ میلی لیتر شیر استریلیزه (۳٪ چربی، صنایع غذایی میهن) قرار می گرفت. باکتری اشریشیا کلی در محیط TSB بمدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد قرار می گرفت و ۲ میلی لیتر از محیط کشت فوق به بشر حاوی سطوح و شیر منتقل می شد.

بعد از گرمخانه گذاری بمدت ۴۸ ساعت در ۳۰ درجه سانتی گراد سطوح بصورت سترون خارج شده و با محلول نمکی بافر فسفات(pH= ۷/۴) جهت حذف باکتری های غیر متصل به سطح شستشو داده می شد (۱۹) و دوباره در داخل بشر حاوی شیر استریلیزه قرار داده می شد. این عمل تا ۱۰ روز انجام می گرفت تا در نهایت بیوفیلم بر روی سطوح تشکیل گردد.

۳)شمارش باکتری

جهت شمارش باکتری در بیوفیلم تشکیل شده، سطوح با سرم فیزیولوژی سترون شستشو داده می شد و سطوح مورد نظر سواب کشی می شدند و باکتری ها به روش استاندارد شمارش می شدند.

آنالیز آماری

در این مطالعه جهت آنالیز های آماری از برنامه SPSS ویرایش ۱۱ استفاده گردیده است.جهت بررسی از آزمون t استفاده گردید.

نتایج

میانگین تعداد باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} در بیوفیلم حاصله بر روی سطح استیل زنگ نزن و لاستیک به ترتیب ۰/۲۷ ±۹/۵۶ و۰/۱۵ ±۹/۱۰ Log CFU/cm^2 بود(جداول ۱ و۲).

جدول۱- میانگین تعداد باکتری بر روی سطوح تماسی با شیر(بر حسب $Log\ CFU/cm^2$)

نوع سطح	تعداد سطوح	میانگین	انحراف معیار	میانگین خطای استاندارد
استیل زنگ نزن	۱۶	۹/۵۶	۱/۱۱	۰/۲۷
لاستیک	۱۶	۹/۱۰	۰/۶۳	۰/۱۵

جدول۲- نتایج آزمون t بین تراکم باکتری بر روی دو نوع سطح تماسی با شیر

نوع سطح	t	P value
استیل زنگ نزن و لاستیک	۱/۴۲۰^{ns}	۰/۱۶۶

ns : معنی دار نیست

بحث

باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} بر روی هر دو نوع سطح مورد مطالعه ایجاد بیوفیلم می نماید. در واقع تراکم باکتری در هر سانتی متر از سطح استیل زنگ نزن نسبت به لاستیک بیشتر بود ولی اختلاف معنی داری مشاهده نگردید ($P>0/05$). مطالعه فوق نشان داد که باکتری اشریشیا کلی سروتیپ O_{111} با شرکت در بیوفیلم ها می تواند در صنایع لبنی مشکل ساز باشد و باکتری را نمی توان به راحتی از سطح حذف نمود. در صنایع غذایی، اتصال میکروارگانیسم ها منجر به تشکیل بیوفیلم هایی می شود که ممکن است مضر و فسادزا باشند. مهمترین اطلاعات جمع آوری شده در این مورد مربوط به شبیه سازی تشکیل این بیوفیلم ها و ضد عفونی تجهیزات(۳و۱۲)و میکروفلور موجود در هوا(۲۰) معمولا مهمترین منابع آلودگی شیر و فرآورده های آن می باشند. معمولا سیستم شستشوی درجا(CIP) در کارخانجات شیر مورد استفاده قرار می گیرد(۵و۶). با وجود این محدودیت های روش شستشوی درجا باعث احتباس میکروارگانیسم ها بر روی سطوح شده ومنجر به تشکیل بیوفیلم می گردند(۱۴، ۱۵و۱۶). در گذشته مطالعات فراوانی بر روی جنبه های مختلف بیوفیلم ها صورت گرفته است. با وجود این با توجه به نمونه برداری و شمارش باکتری ها از سطوح مختلف تماسی با غذا و فرآورده های شیر و محیطی ، اطلاعات عملی کمی در دسترس می باشد. مطالعه آنها می باشد. با وجود این ، تحت شرایط مناسب، امکان ایجاد بیوفیلم وجود دارد.اتصال باکتری به سطح بستگی به خود باکتری، نوع سطح و محیط احاطه کننده آن دارد. اسکن میکروسکوپ الکترونی نشان داده است که میکروب های بیماریزا با منشا غذایی و فساد زا در بیوفیلم های تشکیل شده بر روی سطوح استیل زنگ نزن، آلومینیوم، شیشه ،لاستیک، تفلون و نایلون در کارخانجات صنایع غذایی تجمع می یابند (۱، ۳، ۸و۱۸). در سال ۱۹۹۳ یک محقق نشان داد که شیر و ترکیبات آن نظیر کازئین و بتالاکتوگلوبولین اثر مهاری در احتباس باکتری لیستریا مونوسایتوژنز و سالمونلا تایفی مریوم بر روی سطوح دارند(۷). در صنایع لبنی، عدم شستشوی مناسب و مطالعات مربوط به اتصال میکروارگانیسم ها در مراحل پروسس مواد غذایی باید در شرایط مشابه انجام گیرد. چنین مطالعاتی به درک بهتر موضوع کمک می نماید و خطرات ناشی از عوامل مولد فساد و پاتوژن را کاهش می دهد. همچنین باید آنالیزهایی از نظر میکروبیولوژیکی بر روی مراحل نظافت و شستشو انجام گیرد.

تشکر و سپاسگزاری

بدینوسیله از آقای مهندس جلیل دلگری شرف کارشناس آزمایشگاه میکروبیولوژی و خانم دکتر ویرجینیا دیبل که در

انجام این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی بعمل می آید.

فهرست منابع

1. Blackman, I.C. and Frank, J.F. (1996): Growth of Listeria monocytogenes as a biofilm on various food-processing surfaces. J. Food Prot. 59: 827–831.
2. Brown, M.L., Henry, C.A. and Gauthier, J.J. (1995): Relation between Glycocalyx and Povidone-Iodine resistance in Pseudomonas aeruginosa (ATCC 27853) biofilms. Appl. Env. Microbiol. 61 (1): 187–193.
3. Czechowski, M.H. and Banner, M. (1990): Control of biofilms in breweries through cleaning and sanitizing. Tech. Q. Masters Brew. Assoc. Am. 29: 86–88.
4. Dhir, V.K. and Dodd, C.E.R. (1995): Susceptibility of suspended and surface attached Salmonella enteritidis to biocides at elevated temperatures. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1731–1738.
5. Dunsmore, D.G. (1981): Bacteriological control of food equipment surfaces by cleaning systems. I. Detergent effects. J. Food Prot. 44: 15–20.
6. Dunsmore, D.G., Twomey, A., Whittlestone, W.G. and Morgan, H.W. (1981): Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: a review. J. Food Prot. 44: 220–240.
7. Helke, D.M., Somers, E.B. and Wong, A.C.L. (1993): Attachment of Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium to stain less steel and Buna-N in the presence of milk and milk components. J. Food Prot. 56: 479–484.
8. Herald, P.J. and Zottola, E.A. (1988): Scanning electron microscopic examination of Yersinia enterocolitica attached to stainless steel at elevated temperature and pH values. J. Food Prot. 51: 445–448.
9. Herald, P.J. and Zottola, E.A. (1988): Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel surfaces at various temperatures and pH values. J. Food Prot. 53: 1549–1552, 1562.
10. Humphery, T.J., Slater, E., McAlpine, K., Rowbury, R.J. and Gilbert, R.J. (1995): Salmonella enteritidis Phage type 4 isolated more tolerant of heat, acid or hydrogen peroxide also survive longer on surfaces. Appl. Env. Microbiol. 61 (8): 3161–3164.
11. Jones, K. and Bradshaw, S.B. (1996): Biofilm formation by the Enterobacteriaceae:A comparison between Salmonella en teritidis, E. coli and a Nitrogen fixing strain of Klebsiella pneumoniae. J. Appl. Bacteriol. 80: 458–464.
12. Koutzayiotis, C. (1992): Bacterial biofilms in milk pipelines. South African J. Dairy Sci. 24: 19–22.
13. Mafu, A.A., Roy, D., Gonlet, J. and Magny, P. (1990): Attachment of Listeria monocytogenes to stainless steel, glass, polypropylene, rubber surfaces after short contact times. J. Food. Prot. 53: 742–746.
14. Mattila, T., Manninen, A. and Kylasiurola, A.L. (1990). Effect of cleaning-in-place disinfectants on wild bacterial strains isolated from a milking line. J. Dairy Sci. 57: 33–39.
15. Maxcy, R.B. (1964): Potential microbial contaminants from dairy equipment with automated circulation cleaning. J. Milk Food Technol. 27: 135–139.
16. Maxcy, R.B. (1969): Residual microorganisms in cleaned-in-place systems for handling milk. J. Milk Food Technol. 32: 140–143.
17. Morin, P., Camper, A., Jones, W., Gatel, D. and Goldman, J. (1996): Colonization and disinfection of biofilms hosting coliform colonized carbon fines. Appl. Env. Microbiol. 62 (12): 4428– 4432.
18. Notermans, S., Dormans, J.A.M.A. and Mead, G.C. (1991): Contribu tion of surface attachment to the establishment of microorganisms in food processing plants: A review. Biofouling 5: 1–16.
19. Ren, T.J. and Frank, J.F. (1993): Susceptibility of starved palnktonic and biofilm Listeria monocytogenes to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate counts. J. Food. Prot. 56: 573–576.
20. Schroder, M.J.A. (1984): Origins and levels of post pasteurization contamination of milk in the dairy and their effect on keeping quality. J.

Dairy Res. 51: 59–67.
21. Somers, E.B., Schoeni, S.L. and Wong, A.C.L. (1994): Effect of Trisodium phosphate on biofilm and planktonic cells of Campylobacter jejuni,E. coli O157:H7, Listeria monocytogenes and Salmonella typhimurium. Int. J. Food. Microbiol. 22 :269–276.