

بیوفیلیم ها در صنایع غذایی و راه کارهای حذف آنها در سیستم های فرآوری غذایی

Biofilms in food industries and their removal methods in food processing systems

لیلا ناطقی^۱، امیر آهنگر بهان^{۲*}، عاطفه محمد قلی^۳

دریافت: ۱۴۰۰/۸/۵

پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

چکیده

بیوفیلیم یک اجتماع میکروبی پیچیده است که درون ماتریکس پلی ساکاریدی و یا پروتئینی محصور شده است. بیوفیلیم میتواند توسط میکروارگانیسم هایی مانند قارچها و باکتری ها ایجاد شود. هم باکتری های گرم مثبت و هم گرم منفی این توانایی را دارند. مقاومت باکتریایی ایجاد شده در فاز بیوفیلیم به مواد ضد میکروبی یک مسئله مهم جهانی است. بیوفیلیم باکتریایی از جنبه های مختلفی مانند بیماری های وابسته به عفونت های مزمن انسانی، عفونت اجسام خارجی مانند کاتترها، بیماری های دامی و گیاهی و همچنین در واحدهای فرآوری مواد غذایی دارای به دلیل انسداد و آلوده نمودن خطوط تولید با اهمیت است. برای میکروارگانیسمها، زندگی کردن در یک بیوفیلیم با مزایای خاصی همراه است. اجتماعات میکروبی معمولاً نسبت به استرس ها بسیار مقاومترند. فاکتورهای استرسزای بالقوه نظیر کمبود آب، افزایش یا کاهش pH محیط یا وجود مواد سمی برای میکروب، نظیر آنتی بیوتیک ها، آنتی میکروب ها یا فلزات سنگین را شامل میشوند. بیوفیلیم در مکان های مختلفی تشکیل میشود، ولی تشکیل آن در صنایع فرآوری مواد غذایی معمولاً باعث آسیب و کاهش راندمان میشود. علاوه بر فواید مختلف نظیر کاربرد در پاکسازی آلودگی های فلزات سنگین و همچنین ساخت سلول سوختی میکروبیال، دارای خطرات بسیاری نیز میباشد. این ساختارهای مقاوم باعث 80 درصد بیماریهای عفونی انسانی هستند که به دلیل مقاوم بودن و نبود راههای قطعی و سریع درمان در برابر این باکتریهای پاتوژن درصد بسیار بالایی را شامل میشود.

کلمات کلیدی: باکتری ها، بیوفیلیم، مکانیسم های ضد بیوفیلیمی، عفونت زایی

مقدمه

بیوفیلیم را میتوان یک اجتماع باکتریایی نامید که در آن باکتریها به یک سطح زنده یا غیرزنده اتصال داشته و در یک لایه خارج سلولی محصور شده اند (Donlan and Costerton, 2002). مراحل تشکیل بیوفیلیم در باکتری ها از یک مدل کلی پیروی میکند به این صورت که در اولین مرحله اتصال و استقرار میکروارگانیسم با سطح زنده یا غیر زنده اتفاق می افتد. اتصال اولیه با سطح غیر اختصاصی بوده و توسط پیوندهای آبگریزی، واندروالسی و الکترواستاتیک صورت میپذیرد. در این حالت وضعیت

^۱ دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۲ دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

^۳ نویسنده و مسئول مکاتبه: amir.behan1@gmail.com

میکروارگانسیم از فرم پلانکتونی به فرم ثابت تغییر مییابد. پس از اتصال اولیه، پروتئین های سطح میکروب متصل شونده به ماتریکس به صورت اختصاصی اتصال باکتری را به سطح قویتر میکنند. با تکثیر باکتری میکروکلنی باکتریایی تشکیل می شود و به دنبال آن ساختار سه بعدی که همان بیوفیلم بالغ است شکل میگیرد. این بیوفیلم بالغ پس از مدتی متلاشی شده اما سلول های باکتریایی آزاد شده میتوانند در مکان های دیگر ایجاد عفونت و کانون جدید بیوفیلمی نمایند (Watnick and Kolter, 2002). تشکیل بیوفیلم به وسیله تعاملات بین سلولی بین باکتریایی به نام سیستم حد نصاب شکل میگیرد. سیستم حد نصاب یک فرآیند وابسته به غلظت است که هم در باکتری های گرم مثبت و هم باکتری های گرم منفی وجود دارد در این سیستم باکتری ها به واسطه مولکول های کوچکی به نام مولکول های خودالفاگر با هم ارتباط برقرار میکنند. زمانی که تراکم باکتریایی در یک محیط به یک حد خاصی میرسد غلظت این مولکول های انتقال دهنده به حد آستانه رسیده و تغییرات وسیعی را در سطح بیان ژنی القا میکنند. این تغییرات در سطح بیان ژنی، فاکتورهای تهاجمی مختلفی از جمله بیوفیلم را در باکتری تحت تأثیر (القا یا سرکوب) قرار میدهد. تغییرات محیط پیرامون میکروارگانسیم باعث تبدیل شدن فرم پلانکتونی به فرم بیوفیلمی میشود. در گذر از فاز پلانکتونی به فاز بیوفیلمی بیان ژنی در سلول باکتریایی دستخوش تغییرات فراوانی میشود. مولکول های سطح سلول، مسیرهای متابولیسمی خاص و تولید فاکتورهای حدت به ماندگاری باکتری در شرایط بیوفیلم کمک میکنند (Klebensberger et al, 2009). در فاز بیوفیلمی باکتری در یک ماتریکس خارج سلولی خودساز محصور میشود. این ماتریکس 90 درصد حجم توده بیوفیلم را تشکیل میدهد. ماتریکس از پلیمرهای خارج سلولی، پروتئین های متصل شونده به کربوهیدرات، پپتی فلاژل، سایر فیبرهای چسبنده و DNA خارج سلولی تشکیل شده است. وظیفه این ماتریکس خارج سلولی، حفظ ساختار سه بعدی بیوفیلم میباشد (Kostakioti et al, 2013). مواد غذایی به دام افتاده درون ماتریکس تامین کننده نیاز غذایی باکتریها در بیوفیلم میباشد. آب نیز به واسطه خاصیت هیدروفیلی پلی ساکارید ماتریکس، برای حفظ حیات باکتری ها تامین میگردد. در پاسخ به تغییرات محیطی آنزیم هایی از باکتری محصور شده در بیوفیلم ترشح میشود که این آنزیم ها روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی تأثیر میگذارند. ترکیبات ماتریکس مسئول ایجاد حالت خشک شده و کاملاً مقاوم و مستحکم این ساختار میباشد. این خصوصیت به کنار هم قرار گرفتن سلول های باکتریایی کمک می کند. جهت ایجاد ارتباط بین سلولی مانند انتقال DNA که در فاز بیوفیلمی بسیار زیاد اتفاق میافتد، کنار هم قرار داشتن سلول های باکتریایی از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین این ماتریکس خارج سلولی باکتری را از گزند مواد شیمیایی ضدباکتریایی، ترکیبات اکسیدکننده و تأثیرات مخرب اشعه در امان نگه میدارد (Flemming and Wingender, 2010).

باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم

هم باکتریهای گرم مثبت و هم گرم منفی توانایی ایجاد بیوفیلم را دارند. از جمله مهمترین باکتری هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند میتوان باکتریهای گرم مثبت *انتروکوکوس فکالیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس*،

استرپتوکوکوسهای گروه ویریدانس و باکتریهای گرم منفی اشریشیا کلی، کلبسیلا پنومونیه، پروتئوس میرابیلیس و سودوموناس آئروژینوزا را نام برد. باکتری هایی که توانایی تشکیل بیوفیلم را دارند به دلیل مقاومت بالای آنها میتوانند عفونت ها مزمن مانند التهاب پایدار و آسیب بافتی ایجاد کنند. بیوفیلم باکتریایی ایجادشده در این حالت به درمان توسط آنتی بیوتیک های معمول مقاوم می باشد (Donland, 2001)

دلایل شکل گیری بیوفیلم

برای میکروارگانیسم ها، زندگی کردن در یک بیوفیلم با مزایای خاصی همراه است. اجتماعات میکروبی معمولاً نسبت به استرس ها بسیار مقاوم ترند. فاکتورهای استرسزای بالقوه نظیر کمبود آب، افزایش یا کاهش pH محیط یا وجود مواد سمی برای میکروب، نظیر آنتیبیوتیکها، آنتیمیکروبها یا فلزات سنگین را شامل میشوند. توجیحات بسیاری برای سختی و مقاومت بالای بیوفیلرها وجود دارد. برای مثال، لایه EPS که آنها را میپوشاند، به عنوان یک عامل فیزیکی در برابر عوامل ذکر شده عمل میکند. این لایه میتواند به کمبود آب کمک کند یا در برابر اشعه ی UV که میکروارگانیسم ها را تهدید میکند، مقاومت ایجاد کند. به علاوه، مواد مضر نظیر فلزات و آنتی بیوتیک ها با نزدیک شدن به EPS یا خنثی میشوند یا با اتصال به آن، از کار می افتند. به علاوه، این مواد پیش از رسیدن به سلول های عمقی تر بیوفیلم، غلظت اثرگذار خود را در مواجهه با سلول های سطحی از دست میدهند. با همه این اوصاف، برای برخی از آنتی بیوتیک ها امکان نفوذ به EPS و هجوم به لایه های مختلف بیوفیلم وجود دارد. در این جا نیز مکانیسم دفاعی دیگری به کار میآید وجود باکتری هایی که از نظر فیزیولوژیک به خواب رفته اند. همهی آنتی بیوتیک ها برای اثرگذاری، به فعالیت های سلولی میکروب ها نیازمند هستند. در صورتی که باکتری غیرفعال باشد، چیز زیادی برای آنتی بیوتیک باقی نمی ماند. یکی دیگر از روش های محافظت در برابر آنتیبیوتیک ها، وجود سلول های باکتری خاصی با نام پرسیستر است. این سلولها تقسیم نمیشوند و در برابر بسیاری از آنتی بیوتیک ها مقاومند. پرسیسترها با تولید موادی که ساختارهای هدف آنتی بیوتیک را هدف قرار میدهند، در برابر آنها مقاومت میکنند. در حالت کلی، میکروارگانیسم هایی که با یکدیگر تحت عنوان بیوفیلم زندگی میکنند، از وجود سلول های مختلف در اجتماع خود مزایایی کسب میکنند (محمدزاده شریفی، ۱۳۹۴).

مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلمی

عفونت های ایجادشده به وسیله بیوفیلم باکتریها اغلب مقاوم به درمان هستند. گزارش شده است که مقاومت باکتریایی در فاز بیوفیلم 1000 بار بیشتر از حالت پلانکتونی یا رشد آزاد همان باکتری میباشد (Costerton et al, 1999). چندین مکانیسم در ایجاد این مقاومت نقش دارند. اولین مکانیسم مربوط به ماتریکس میباشد که یک سد فیزیکیوشیمیایی در برابر نفوذ آنتی بیوتیک ها محسوب میشود (Ciofu et al, 2012). دومین فرضیه در رابطه با مقاومت باکتریایی در مرحله بیوفیلمی، مربوط به سطح فعالیت متابولیکی باکتری است. به این صورت که در قسمت های عمقی بیوفیلم به دلیل کمبود مواد مغذی در

دسترس، تکثیر و رشد باکتریایی متوقف میشود یا در سطح پایینی انجام میگردد که این حالت باعث ایجاد مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها میشود (Brown *et al*, 1988) غیر از مواد غذایی دسترسی باکتری ها در قسمت های زیرین بیوفیلم به اکسیژن کم میشود. این امر نیز منجر به کاهش رشد و تکثیر سلولی میشود. ایجاد حالت مقاومت ناشی از غیرفعال بودن باکتری در بیوفیلم، در مورد آنتی بیوتیک هایی که بر سلول در حال رشد و تقسیم اثر میگذارند از اهمیت بیشتری برخوردار است. چون که این نوع آنتی بیوتیک ها زمانی عمل میکنند که باکتری در فاز رشد و تقسیم باشد. بتالاکتام ها مانند پنسیلین جزو این دسته از آنتی بیوتیک ها محسوب میشوند (Walters *et al*, 2003). سومین فرضیه ایجاد مقاومت باکتریایی در حالت بیوفیلم مربوط به تغییرات ژنتیکی در شرایط مختلف میباشد به این صورت که فرکانس موتاسیون در فرم بیوفیلمی بسیار بیشتر از شکل پلانکتونی باکتری میباشد.

گزارش شده است که باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* در حالت بیوفیلم 501 مرتبه بیشتر از شکل پلانکتونی دچار موتاسیون میشود.

مضرات بیوفیلم ها

بیوفیلم ها بسته به ترکیب و محل ایجادشان می توانند سودمند یا زیان آور باشند. به عنوان مثال تشکیل آنها در لوله های آبخوری و شیردوشی ها علاوه بر خوردگی میکروبی و پوسیدگی تجهیزات، باعث انسداد و گرفتگی لوله ها، آلودگی دائم آب آشامیدنی و شیر خام به دلیل ورود میکروب ها و سموم آنها می شود. همچنین این بیوفیلم ها موجب کاهش اثر واکسن های دامی، اتلاف بخش قابل توجهی از ویتامین های قابل استفاده دام به دلیل جذب مقداری از آنها توسط میکروب های بیوفیلم ایجاد طم و بوی نامطبوع در آب و شیر و کاهش میل نوشیدن آب، خطر مسمومیت ناشی از تداخلات دارویی و فساد شیر می شوند. سرعت تشکیل بیوفیلم به عوامل متعدد چون، ویژگی های زیست شناختی میکروب مورد مطالعه، ساختار سطح استفاده شده، ترکیب و شرایط محیط کشت (دما و مواد مغذی) بستگی دارد. در حالت کلی، میکروارگانیسم هایی که با یکدیگر تحت عنوان بیوفیلم زندگی میکنند، از وجود سلول های مختلف در اجتماع خود مزایایی کسب میکنند (Dow, 1999).

تغییرات محیطی بر شکل گیری بایوفیلم ها

تغییرات محیط پیرامون میکروارگانیسم باعث تبدیل شدن فرم پلانکتونی به فرم بیوفیلمی میشود. در گذر از فاز پلانکتونی به فاز بیوفیلمی، بیانژن در سلول باکتریایی دستخوش تغییرات فراوانی میشود. مولکول های سطح سلول، مسیرهای متابولیسمی خاص و تولید فاکتورهای مختلف به ماندگاری باکتری در شرایط بیوفیلم کمک میکنند. در پاسخ به تغییرات محیطی، آنزیم هایی از باکتری محصور شده در بیوفیلم ترشح میشود که این آنزیم ها روی ترکیبات ماتریکس خارج سلولی تأثیر میگذارند. ترکیبات ماتریکس مسئول ایجاد حالت خشک شده و کاملاً مقاوم و مستحکم این ساختار میباشند. این خصوصیت به کنار هم

قرار گرفتن سلولهای باکتریایی کمک میکند. جهت ایجاد ارتباط بین سلولی مانند انتقال DNA که در فاز بیوفیلمی بسیار زیاد اتفاق می افتد، کنار هم قرار داشتن سلول های باکتریایی از اهمیت زیادی برخوردار است. همچنین این ماتریکس خارج سلولی باکتری را از گزند مواد شیمیایی ضدباکتریایی، ترکیبات اکسیدکننده و تأثیرات مخرب اشعه در امان نگه میدارد (Toyofuku *et al*, 2016).

ترکیبات ضد بیوفیلمی

پوشش سطحی و مهار ایجاد بیوفیلیم

از این گروه میتوان به پوشش ضد میکروبی اشاره کرد. پوشاندن سطح با آنتی بیوتیک ها، مواد بیوساید و ترکیبات یونی یکی از روش های مهار تشکیل بیوفیلیم میباشد. این روش با مهار اتصال باکتری با سطح و همچنین کشتن باکتری های متصل شده، از مراحل اولیه تشکیل بیوفیلیم ممانعت میکند. اما اثربخشی این روش برای مدت زمان محدودی (تا یک هفته) است، بعد از این مدت مواد ضد میکروبی کارایی خود را از دست داده یا اثر آنها بسیار کم میشود. راه دیگر مهار ایجاد بیوفیلیم، ایجاد تغییرات فیزیکی بر روی سطح است. تشکیل بیوفیلیم با اتصال اولیه باکتری به سطح انجام میگردد. میزان آبگریزی و بار الکتریکی سطح نقش مهمی در توانایی باکتری جهت تشکیل بیوفیلیم دارد بنابراین هر عاملی که باعث آبدوست کردن سطح شود تعامل باکتریایی با سطح و در نتیجه بیوفیلیم را کاهش میدهد (Okada *et al*, 2008).

مهارکنندگان سیستم حد نصاب بیوفیلیم

مراحل تشکیل بیوفیلیم تحت کنترل سیستم حد نصاب است. در این سیستم باکتریها برای تجمع خود و تشکیل بیوفیلیم به وسیله مواد شیمیایی مترشحه از خودشان با هم ارتباط برقرار میکنند. هر تکنیک یا ماده ای که در این فرآیند اختلال ایجاد کند را مهار کننده سیستم حد نصاب میگویند. یکی از راه کارهای مهار تشکیل بیوفیلیم تداخل در سیگنال بین باکتریها یا همان سیستم حد نصاب است. از جمله مواد شناخته شدهای که نقش QSI دارد ماده ای است به اسم furanones Bromated که اولین بار از جلبک قرمز *pulchra Delisea* به دست آمد. اما امروزه ساختارهای شبیه به آن به صورت مصنوعی سنتز میشود. این ماده از تشکیل بیوفیلیم در *استرپتوکوکوس های ویریدانس* مانند *استرپتوکوکوس موتانس* که در تشکیل بیوفیلیم و پلاک دندان اهمیت زیادی دارد با مهار QSi ممانعت میکند

(Brackman and Coenye, 2015)

باکتریوفاژها در مهار بیوفیلیم ها

استفاده از باکتریوفاژهای لیتیک میتوانند به عنوان یک روش جایگزین آنتی بیوتیک ها و یا مکمل آنها در درمان عفونت ها به کار برده شود باکتریوفاژها برای انسان مضر نیستند و برای باکتری میزبان کاملاً اختصاصی عمل میکنند. فاژها قادر به حذف بیوفیلیم در باکتری میزبان خود هستند. به عنوان مثال فاژ T4 میتواند درون بیوفیلیم تشکیل شده باکتری *اشریشیا کلی* تکثیر

یابد و با کشتن این باکتری ساختار فیزیکی بیوفیلیم را تخریب کند. بسیاری از فازها پلیمرهایی تولید میکنند که پلیمر خارج سلولی بیوفیلیم را تجزیه میکند. برای باکتری کلبسیلا *آئروژنز* فاز تجزیه کننده اگزوپلی ساکارید و کپسول شناسایی شده است. همچنین فاز لیزین یا اندولیزین جزو مواد ضدمیکروبی علیه باکتریهای گرم مثبت محسوب میشوند که به خاصیت ضد بیوفیلیمی فاز کمک میکنند. از جمله اشکالات استفاده از فاز به عنوان یک مکانیسم ضد بیوفیلیمی این است که ذرات فازی اختصاصی میزبان هستند، بنابراین طیف اثر محدودی دارند. همچنین ممکن است در باکتری ها مقاومت فازی ایجاد شود. یکی دیگر از معایب فاز این است که بعضی از فازها حامل ژن های مربوط به فاکتور تهاجم هستند که امکان انتقال این ژنها به باکتری درمان شده با فاز وجود دارد.

تخریب بیوفیلیم ها توسط آنزیم ها

از آنجایی که باکتریهای بیوفیلیم درون ماتریکس خارج سلولی محصور شدهاند، تخریب ماتریکس بیوفیلیم میتواند به عنوان روشی جهت تخریب بیوفیلیم تشکیل شده، مورد استفاده قرار گیرد. پروتئازها، گلیکوزیدازها و دئوکسی ریبونوکلیتازها از جمله این آنزیمها هستند B Dispersin یک آنزیم تجزیه کننده ماتریکس بیوفیلیم میباشد. این ماده یک گلیکوزیداز بوده که از باکتری *اکتینوباسیلوس اکتینومیسیت کومیتنس* به دست می آید. این آنزیم ماده پلی ان استیل گلوکزآمین که در ساختار ماتریکس بیوفیلیم اکثر باکتریها حضور دارد را تجزیه میکند. باکتری *سودوموناس آئروژینوزا* توانایی تولید پلی ساکارید آلژینات و همچنین آنزیم تجزیه کننده آلژینات را دارد. آلژینات جزء اصلی ساختار ماتریکس بیوفیلیم این باکتری است. مطالعات نشان میدهد افزایش وجود آنزیم تجزیه کننده آلژینات باعث حساسیت بیوفیلیم *سودوموناس آئروژینوزا* به آنتی بیوتیکها میشود. با افزودن آنزیم به محیط پیرامون باکتری و همچنین افزایش بیان ژن کدکننده آنزیم تجزیه کننده آلژینات میتوان به این هدف دست یافت (Meireles *et al*, 2016)

اهمیت مهار بیوفیلیم ها در صنایع غذایی

اخیرا استراتژی های کنترل میکروبی به منظور حذف کامل میکروارگانیسم های خطر زا بدون تاثیر بر کیفیت محصول، کافی به نظر نمیرسد. مشخص شده است ایمنی و افزایش طول عمر محصول تازه برش خورده به مرحله شستشو بستگی دارد. در حالیکه اثر ضدعفونی کننده ها بر محصول میتواند تنها باکتری ها را به میزان 2 لگاریتم کاهش دهد. میکروارگانیسم ها احتمالا توسط موقعیتشان در بافت گیاهی و یا بیوفیلیم های تولید شده محافظت میشوند. برش دادن، ضدعفونی کردن، شستشو با آب، حذف آب و بسته بندی همگی در صنعت تولید استفاده میشوند و به عنوان منبع اولیه آلودگی تماسی در نظر گرفته می شود. کنترل و مهار بیوفیلیم ها در صنایع غذایی به دلیل اتصال باکتری های پاتوژن و مولد فساد به سطوح در تماس با مواد غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است زیرا حتی بعد از CIP هم در خطوط تولید مواد غذایی ماندگاری دارند. که منجر به تلفات اقتصادی و آلودگی محصولات غذایی تولیدی و به طبع آن کاهش امنیت تغذیه ای محصولات می شوند

برای کنترل بیوفیلیم ها در خطوط تولید مواد غذایی پلاسمای سرد موثر ترین روش می باشد. عوامل موثر بر خاصیت ضد بیوفیلیمی پلاسمای سرد عبارت اند از نوع باکتری ضخامت و سطح بیوفیلیم ایجاد شده. در فرآیند از بین بردن بیوفیلیم ها توسط پلاسمای سرد، می تواند کمترین تاثیر را بر روی خصوصیات ارگانولپتیکی محصولات غذایی دانه باشد. این روش مانع از اکسیداسیون لیپیدها می شود. پلاسمای سرد با آسیب رساندن به DNA میکروبی و ساختارهای سطحی میکروب ها را از بین می برد. از طرفی قادر است میکروب های در حال رشد در بیوفیلیم ها یا زیست لایه های موجود را از بین ببرد (Kumarand Anand, 1998)

سطوح در تماس با ماده غذایی برای تشکیل بیوفیلیم

در جنس و گونه های مختلف باکتریایی، فاکتورهای خارجی بر میزان اتصال و تشکیل بیوفیلیم موثر است. مواد سازنده سطوح در تماس با ماده غذایی، در میزان اتصال و تشکیل بیوفیلیم موثر است. مهمترین موادی که در کشورهای در حال توسعه به منظور تولید سطوح در تماس با مواد غذایی استفاده میشود شامل استیل ضد زنگ، شیشه، پلی اورتان، رزین، تفلون، رزین نیتریل بونیل و چوب است.

روش های حذف بیوفیلیم ها در خطوط تولید مواد غذایی

از آنجایی که بیوفیلیم ها نگرانی عمده در حوزه صنایع غذایی محسوب میشوند، بسیاری از تحقیق ها به منظور کسب اطلاع بهتر از توسعه و گسترش آنها انجام شده است. اولین و مهم ترین اقدام، پیشگیری از تشکیل بیوفیلیم با استفاده از شستشوی مداوم و ضد عفونی کردن است که به سلول ها اجازه اتصال محکم به سطوح را نمی دهد. ضد عفونی کردن به موقع قبل از گسترش بیوفیلیم ضد عفونی کردن بیوفیلیم ها به کمک محلول های قوی جلوگیری از اتصال میکروب ها با استفاده از انتخاب مواد سطحی که اجازه اتصال را نمی دهند (Lequette et al, 2010). در صنایع غذایی ، باقیمانده ها در هر جایی وجود دارد که میتواند تجمع میکروارگانیسمها و تشکیل بیوفیلیم توسط آنها را تقویت نماید. بنابراین پاک کردن منظم به منظور پیشگیری از آلودگی فرآورده های غذایی ضروری است. فرآیند پاک کردن مناسب میتواند باعث حذف هر نوع باقیمانده غذا و دیگر ترکیباتی گردد که ممکن است رشد باکتری ها را تقویت و منجر به تولید بیوفیلیم توسط آنها گردد. محصولات شیمیایی متعددی در تمیز کردن میتوانند استفاده شوند از جمله سورفاکتانت ها و محصولات قلیایی همچنین به کمک کاهش کشش سطحی ، باقیمانده های غذا را حل کرده ، چربی ها را امولسیفیه و پروتئین ها را دناتوره میکنند. پاک کردن باید به طریقی صورت گیرد که بتواند ماتریکس EPS مرتبط با بیوفیلیم ها را تجزیه یا حل نماید به همین دلیل ضد عفونی کننده ها باید با سلولهای باکتری در تماس باشد.

شستشو در محل (CIP)

فرآیندی است که به سیستم اجازه میدهد بطور کامل بدون نیاز به باز کردن تجهیزات و یا استفاده از اپراتور، شستشو گردد. این مرحله شامل تزریق و پاشش سطوح و یا چرخش محلولهای ضد عفونی با تلاطم و سرعت جریان زیاد است. فاکتورهای متعددی وجود دارد که بر کارایی CIP موثر است از جمله جنس لایه بیوفیلم، ترکیبات شیمیایی پاک کننده، غلظت، زمان، دمای مورد استفاده، سرعت جریان محلول و ویژگی های سطحی پاک کننده.

شستشو با هیپوکلریت سدیم

هیپوکلریت سدیم ترکیب شیمیایی است که برای رنگبری یا ضد عفونی کردن استفاده میگردد و همچنین برای ضد عفونی کردن سطوح کاربرد دارد. گزارش های زیادی در ارتباط با موثر بودن این ماده ضد عفونی کننده در غیر فعال سازی بیو فیلم وجود دارد. هیپوکلریت سدیم در PH پایین نسبت به محیط قلیایی، تاثیر بیشتری دارد. گزارش شده است NaClO، ترکیب ضد میکروبی علیه بیوفیلم *استافیلوکوکوس اورئوس*، *پروتلا اینترمدیت*، *پیتو استریپتوکوکوس میروس*، *استریپتوکوکوس اینترمدیوس*، *فوزوباکتریوم نوکلئاتوم* و *انتروکوکوس فکالیس* می باشد.

شستشو با پراکسید هیدروژن

پراکسید هیدروژن یکی از پرکاربردترین ضد عفونی کننده هایی است که علت آن توانایی اکسیدکنندگی بر اساس تولید رادیکال های آزاد میباشد. این ماده بر ماتریکس بیوفیلم تاثیر میگذارد. علاوه بر این، مطالعات زیادی تاثیر این ماده را به عنوان یک ضد عفونی کننده علیه بیوفیلم بررسی کرده است. از نظر ایمنی، پراکسید هیدروژن یک محلول ایمن بوده که واکنش های آلرژیک را به دنبال نخواهد داشت.

ازن

ازن حاصل در معرض قرار دادن اتم های اکسیژن در برابر تخلیه الکتریکی با ولتاژ بالاست. ازن گازی آبی با بوی زیاد و دارای خواص اکسیدکنندگی قوی میباشد. این گاز یک عامل ضد میکروبی قوی است که میتواند علیه باکتری ها، قارچ ها، ویروس ها، پروتوزوا و اسپورهای باکتری و قارچ استفاده گردد. میکروارگانیسم ها از طریق تجزیه یا شکستن دیواره سلولی نابود میشوند که منجر به خروج محتوای سلولی می گردد. در مقایسه با دیگر عوامل ضد میکروبی، نابودی سلول یک مکانیزم غیرفعال سازی سریع است که نفوذ از طریق غشای سلولی اتفاق می افتد. به علت وقوع این مکانیزم، میکروارگانیسم قابلیت ایجاد مقاومت را پیدا نمی کند.

پراستیک اسید

این ماده توسط واکنش میان پراکسید هیدروژن و استیک اسید و یا اکسیداسیون استالدئید تولید میگردد. پراستیک اسید دارای بوی قوی و PH کم (2-8) بوده و معمولا در غلظت های بین 5 الی 15٪ تولید میشود و در تصفیه آب به عنوان ماده

ضد عفونی کننده کاربرد دارد. این ماده به علت قابلیت زیاد (در اکسید کردن) به عنوان یک ماده ضد میکروبی قوی کاربرد دارد. علاوه بر این، پراستیک اسید از طریق آنزیم های کاتالاز و پراکسیداز که پراکسید هیدروژن را تجزیه میکنند تخریب نمیشود. این ماده همچنین در غذا به ترکیبات ایمن و دوستدار محیط زیست (اسیداستیک، پراکسید هیدروژن) تجزیه میشود. به همین علت میتواند بدون شستشو استفاده گردد. پراستیک اسید در غلظت 5٪ میتواند بیوفیلیم لیستریا مونوسیتوزنر چسبیده به سطوح تولید را طی 24 ساعت به مقدار $\text{Log}5$ کاهش دهد.

فاژها

اولین کاربرد فاژها برای از بین بردن بیوفیلیم ها در ابتدای قرن بیستم در اروپای شمالی بود. بر خلاف مواد ضد میکروبی پایه ی شیمیایی که میتوانند باعث خوردگی شوند، فاژها جایگزین مناسبی برای این مواد هستند. بنابراین به عنوان یک روش کنترل بیوفیلیم پیشنهاد شده اند. مشخص شده است ترکیبات فاژ و سنتز آنها تاب سرعت رشد باکتری میزبان و میزان سنتز پروتئین آنها طی زمان آلودگی است. هر چند گزارش شده است حتی تحت شرایط محدود گلوکز، فاژ T4 میتواند بر بیوفیلیم های *E.coli* اثر بگذارد.

تکنولوژی هاردل

تکنولوژی هاردل، ترکیبی از دو یا چند تکنیک کنترل است که تاثیر بیشتری در نابودی بیوفیلیم ها دارد. هر چند به منظور رسیدن به تیمار مناسب ترکیب صحیح مورد نیاز است. ترکیب *Naclo* با UV نقش موثرتری در کاهش پاتوژن های مواد غذایی دارند (DeQueiroz and Day, 2007). فعالیت ضد میکروبی و اثر ترکیب *Naclo* و هیدروژن پراکسید را در نابودی و حذف بیوفیلیم های *سودوموناس آئروژینوزا* از سطوح بررسی شده است. نتایج کاهش قابل توجهی را در تعداد سلولها طی زمان کوتاه در معرض گذاری نشان داده است. اثر سینرژیستی تیمار ترکیبی هیدروژن پراکسید و UV موثر تر از استفاده 10 برابری از هیدروژن پراکسید به تنهایی بود. اثر هیدروژن پراکسید با افزایش دما، نیز افزایش می یابد. علاوه بر این، افزایش غلظت اسیدآلی میتواند باعث کارایی هیدروژن پراکسید گردد.

نانوذرات

تشکیل بیوفیلیم را میتوان با پوشاندن سطوح با نانوذرات مهار کرد این مهار بیوفیلیم میتواند ناشی از مهار چسبندگی باکتری به سطح یا خاصیت ضدباکتریایی نانوذره یا هر دوی آنها باشد. (Eshed et al, 2012). مطالعات نشان داده است که نانوذرات فلوراید منیزیم به واسطه ی خاصیت ضدباکتریایی خود، قادر به مهار تشکیل بیوفیلیم پاتوژن های مهم از جمله *شریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* میباشد. کاترهای پوشیده شده با این ماده به میزان زیادی به عفونت بیوفیلیمی ایجاد شده توسط این پاتوژنها مقاوم است. اثر نانوذرات نقره روی بیوفیلیم باکتریایی تعدادی از باکتریهای پاتوژن بررسی شده است. نتایج نشان داده که نانوذرات نقره باعث مهار بیوفیلیم باکتری های *سودوموناس آئروژینوزا*، *شیگال فلکسنری*، *استافیلوکوکوس اورئوس* و

استرپتوکوکوس پنومونیه میشود. همچنین نشان دادند که نانوذرات نقره باعث تشدید اثر کشندگی (اثر هم افزایی) آنتی بیوتیک های آمپیسیلین و وانکومایسین علیه باکتریهای گرم منفی و گرم مثبت میشود.

مشتقات گیاهی دارای خاصیت ضد بیوفیلمی

تلاش محققان جهت معرفی ترکیبات با خاصیت ضد بیوفیلمی منجر به شناخت ترکیبات گیاهی شده است که به صورت طبیعی گیاهان برای محافظت از خود در برابر استقرار باکتریایی از آنها استفاده میکنند. این ترکیبات که وزن مولکولی کمتر از 1 کیلو دالتون دارند را اصطلاحاً Parvome میگویند. (Parv به معنای کوچک و ome به معنای گروه). از جمله این ترکیبات میتوان آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، فالونوئید و کومارین ها، پپتیدها، گلیکوزیدها نوکلئوزیدها و پلی فنل ها را نام برد. ترکیبات گیاهی از راه های مختلفی میتوانند بیوفیلیم را مهار کنند گیاهانی که عصاره آنها برای باکتریها خاصیت کشندگی یا مهارکنندگی رشد دارد باعث مهار یا کاهش تشکیل بیوفیلیم باکتریایی میشود. اما برخی از ترکیبات گیاهی بدون کشتن یا مهار رشد باکتری روی بیوفیلیم تأثیر میگذارد. مزیت این ترکیبات این است که باکتریها به آنها مقاوم نمی شوند (Truchado *et al*, 2009). یکی دیگر از راهکارهای مهار بیوفیلیم و یا حذف آن، مهار پمپ های افلوکس میباشد. باکتریها جهت بیرون راندن مواد سمی و متابولیت های زائد از سیستم های پمپی مختلفی استفاده میکنند. پمپ های یک یا چند واحدی در دیواره سلولی باکتریها این عمل را انجام میدهند. حضور و فعالیت این پمپ ها باعث ایجاد مقاومت به ترکیبات شیمیایی مانند آنتی بیوتیک ها و به وجود آمدن سویه های مقاوم به میشود. در فاز بیوفیلمی به دلیل محصور چنددارو بودن باکتریها در ماتریکس خارج سلولی مواد زائد حاصل از سوخت و ساز باکتری تجمع پیدا میکند. باکتری به منظور رهایی از این مواد زائد پمپ های افلوکس خود را به شدت فعال میکند. مطالعات نشان میدهد که مهار این پمپ ها میتواند باعث تخریب بیوفیلیم تشکیل شده و افزایش حساسیت باکتری های بیوفیلیم به آنتی بیوتیک ها شود (Kvist *et al*, 2008).

نتیجه گیری

اصطلاح بیوفیلیم به اجتماعی از سلول ها گفته میشود که روی یک سطح تثبیت شده (جاندار یا غیرجاندار) و عموماً به وسیله یک ماتریکس از مواد پلیمری خارج سلولی با منشأ میکروبی احاطه شدهاند. توانایی باکتریها برای چسبیدن به سطوح مختلف، به ویژه در ارگانیزم های بیماریزا و پاتوژن که از این خاصیت برای شروع بیماری استفاده میکنند به عنوان یک پدیده مهم شناخته شده است. چسبیدن به سطح مزایای مهمی مثل حفاظت در مقابل عوامل ضد میکروبی، کسب صفات ژنتیکی جدید و در دسترس بودن مواد مغذی و عملیات متابولیکی دارد که سبب افزایش مقاومت و سازگاری باکتری در حالت بیوفیلمی میشود. بیوفیلیم در مکان های مختلفی تشکیل میشود، ولی تشکیل آن در صنایع معمولاً باعث آسیب و کاهش راندمان میشود. همانطور که مشاهده کردید علاوه بر فواید مختلف نظیر کاربرد در پاکسازی آلودگی های فلزات سنگین و همچنین ساخت سلول سوختی میکروبیال، دارای خطرات بسیاری نیز میباشد. این ساختارهای مقاوم باعث 80

درصد بیماریهای عفونی انسانی هستند که به دلیل مقاوم بودن و نبود راه های قطعی و سریع درمان در برابر این باکتریهای پاتوژن درصد بسیار بالایی را شامل میشود. علاوه بر این، رشد بیوفیلیم ها در قطعات به کار رفته در بدن انسان نظیر کاتترها و... نیز از خطرات دیگر این ساختارها میباشدند. گستردگی اثر بیوفیلیم ها از مواد بیجان تا ایجاد بیماری های مختلف در انسان و حیوانات، مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های رایج و معمول مورد استفاده در عفونت های ساده، توانایی بالقوه هر کدام از سلول های درون بیوفیلیم به ایجاد ساختار سه بعدی بیوفیلیم جدید و وجود ساختارها و سلول های تخصص یافته نظیر پرسیستر سبب شده است که بیوفیلیم یکی از چالش های جهانی در خطوط تولید و فرآوری مواد غذایی در دهه های اخیر شناخته شده و راه های کنترلی متعددی برای آن در نظر گرفته شود. امید است با پیشرفت روز افزون علم زیست شناسی، علاوه بر کشف راه های مطمئنتر جهت کنترل مشکلات ناشی از این باکتری ها، استفاده های بیوتکنولوژیکی مفیدی نیز از آنها صورت گیرد. علت اینکه امروزه تشکیل بیوفیلیمها در خطوط غذایی به یک نگرانی تبدیل شده است، این است که باکتریهای موجود در این ساختارها مقاومت شدیدی به آنتی بیوتیک ها و سایر مواد ضد عفونی کننده نشان میدهند و به سختی میتوان آنها را کنترل کرد. در حقیقت در مقایسه با باکتری منفرد، بیوفیلیم ها تا 1500 برابر به آنتی بیوتیک ها مقاومند که درمان عفونت های ناشی از آنان را به یک چالش اساسی تبدیل میکند.

References

منابع:

1. محمدزاده، شریفی، و آرام(2016). بیوفیلیم باکتریایی و مکانیسم های مهار آن با تکیه بر خواص ضد بیوفیلیمی ترکیبات گیاهی. فصلنامه علمی پژوهشی زیست شناسی جانوری تجربی. 5(1) 71-81.
2. Brackman, G., & Coenye, T. (2015). Quorum sensing inhibitors as anti-biofilm agents. *Current pharmaceutical design*, 1(12), 5-11
3. Brown, M. R., Allison, D. G., & Gilbert, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics a growth-rate related effect?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22(6), 777-087
4. Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
5. Ciofu, O., Mandsberg, L. F., Wang, H., & Høiby, N. (2012). Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 215-522
6. Donlan, RM.; Costerton, JW.; (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Review*; 15: 167-193.
7. Donlan, RM.; (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerg Infect Dis*; 7: 277-182
8. Dow, C. (1999). *Biofilms in the aquatic environment* (Vol. 242). C. W. Keevil, A. F. Godfree, & D. Holt (Eds.). Cambridge, UK: Royal society of chemistry.

9. **DeQueiroz, G. A., & Day, D. F. (2007).** Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *Journal of Applied Microbiology*, 103(4), 794-802.
10. **Flemming, HC.; Wingender, J.; (2010).** The biofilm matrix. *Nature Review Microbiology*; 8: 623-.336
11. **Eshed, M., Lellouche, J., Matalon, S., Gedanken, A., & Banin, E. (2012).** Sonochemical coatings of ZnO and CuO nanoparticles inhibit *Streptococcus mutans* biofilm formation on teeth model. *Langmuir*, 28(33), 12288-12295.
12. **Klebensberger, J.; Birkenmaier, A.; Geffers, R.; Kjelleberg, S.; Philipp, B.; (2009).** SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiology*; 11: 3073-3086.
13. **Kostakioti, M.; Hadjifrangiskou, M.; Hultgren, SJ.; (2013).** Bacterial biofilms: development, dispersal and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 3: 1-23.
14. **Kvist, M., Hancock, V., & Klemm, P. (2008).** Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 7376-7382.
15. **Kumar, C. G., & Anand, S. K. (1998).** Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology*, 42(1-2), 9-27.
16. **Lequette, Y., Boels, G., Clarisse, M., & Faille, C. (2010).** Using enzymes to remove biofilms of bacterial isolates sampled in the food-industry. *Biofouling*, 26(4), 421-431.
17. **Meireles, A., Borges, A., Giaouris, E., & Simões, M. (2016).** The current knowledge on the application of antibiofilm enzymes in the food industry. *Food Research International*, 86, 140-146.
18. **Okada, A., Nikaido, T., Ikeda, M., Okada, K., Yamauchi, J., Foxton, R. M., ... & Matin, K. (2008).** Inhibition of biofilm formation using newly developed coating materials with self-cleaning properties. *Dental Materials Journal*, 27(4), 565-572.
19. **Truchado, P., López-Gálvez, F., Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., & Allende, A. (2009).** Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food chemistry*, 115(4), 1337-4431
20. **Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016).** Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 80(1), 7-12
21. **Watnick, P.; Kolter, R.; (2000).** Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology*; 182: 2675-.9762
22. **Walters III, M. C., Roe, F., Bugnicourt, A., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2003).** Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(1), 317-.323

Biofilms in food industries and their removal methods in food processing systems

Leila Nateghi⁴, Amir Ahangar Bahan^{5*}, Atefeh Mohammad Gholi⁵

Received: 2021/10/27

Accepted: 2022/01/04

ABSTRACT

Biofilm is a complex microbial community enclosed in a polysaccharide or protein matrix. Biofilm can be created by microorganisms such as fungi and bacteria. Both Gram-positive and Gram-negative bacteria have this ability. Bacterial resistance developed in the biofilm phase to antimicrobial agents is an important global issue. Bacterial biofilm is important in various aspects such as diseases related to chronic human infections, infection of foreign bodies such as catheters, animal and plant diseases, and also in food processing units due to blocking and contaminating production lines. For microorganisms, living in a biofilm has certain advantages. Microbial communities are usually very resistant to stress. Potential stress factors such as lack of water, increase or decrease in pH of the environment or the presence of toxic substances for microbes, such as antibiotics, antimicrobials or heavy metals, are included. Biofilm is formed in different places, but its formation in food processing industries usually causes damage and reduced efficiency. In addition to various benefits, such as the use in cleaning heavy metal pollution and the construction of microbial fuel cells, it also has many risks. These resistant structures cause 80% of human infectious diseases, which includes a very high percentage due to their resistance and lack of definitive and quick treatment methods against these pathogenic bacteria.

Key words: bacteria, biofilm, anti-biofilm mechanisms, infectivity

⁴ Associate Professor, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

⁵ PhD student, Department of Food Science and Industry, Faculty of Agriculture, Varamin Pishva Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*Corresponding author: Email:amir.behan1@gmail.com