مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سوم، شماره۲، تابستان ۱۳۸۷ ، صفحات ۸۴-۸۱

مقاله کوتاه

تشکیل بیوفیلم *Salmonella enteritidis* روی سطوح مختلف در صنایع غذایی

منیژه مهدوی[۱]، روحا کسری کرمانشاهی [۲]، محمد جلالی [۳]

۱- نویسنده مسئول : کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
پست الکترونیکی: Gmahdavi2002@yahoo.com
۲- استاد گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۳- استادیار، گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

تاریخ دریافت: ۸۶/۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۸۷/۷/۳

چکیده

سابقه و هدف: سالمونلا اینتریتیدیس (Salmonella enteritidis) یک باکتری مهم عامل عفونت‌های غذایی است. این باکتری در محیط، بسیار مقاوم است و هنوز علت اصلی بسیاری از عفونت‌های گاستروانیتریتی انسان به شمار می‌رود. سالمونلا اینتریتیدیس روی بسیاری از سطوح در تماس با مواد غذایی بیوفیلم تشکیل می‌دهد. تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها روی چنین سطوحی به عنوان یک منبع بالقوه آلودگی در نظر گرفته می‌شود که امکان انتقال باکتری‌ها و شیوع بیماری‌ها را افزایش می‌دهد. در تحقیق حاضر، تشکیل بیوفیلم سویه ایرانی سالمونلا اینتریتیدیس روی سطوح مختلف در تماس با مواد غذایی و پزشکی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ابتدا هیدروفوبیسیتی سطح سلول سالمونلا اینتریتیدیس (RITCC 1624) با روش MATH (Microbial Adhesion to Hydrocarbon) تعیین شد. سپس بیوفیلم آن بر سطوح استیل(Type 304 no 2B) ، پلی‌اتیلن و شیشه در مدت زمان‌های ۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۰ ساعت تشکیل و با روش Drop plate شمارش شد.

یافته ها: نتایج نشان داد که سالمونلا اینتریتیدیس با هیدروفوبیسیتی ۷۳٪ توانایی تشکیل بیوفیلم روی سه سطح ذکر شده را دارد. میزان تشکیل بیوفیلم در مدت زمان ۲ ساعت روی سطح شیشه‌ای و استیل با اختلاف معنی‌داری (P<۰/۰۵) بیشتر از سطح پلی‌اتیلن بود و با افزایش زمان به ۲۰ ساعت، تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف معنی‌دار نبود(P>۰/۰۵). همچنین بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا روی سه سطح، در حد واسط فاز مایع و هوا بود.

نتیجه‌گیری: تشکیل بیوفیلم سالمونلا روی چنین سطوحی، امکان انتقال این باکتری را افزایش می‌دهد که از نظر بهداشتی و انتقال بیماری، بسیار حائز اهمیت است.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، سالمونلا اینتریتیدیس، هیدروفوبیسیتی

• مقدمه

سالمونلا اینتریتیدیس اغلب از طریق مواد غذایی آلوده به انسان منتقل و باعث ایجاد بیماری می‌شود. ابتلا به سالمونلوزیس غیر تیفوئیدی در آمریکا ۱/۴ میلیون نفر در سال گزارش شده است که بیش از ۹۵٪ از این موارد، بیماری‌های با منشاء غذایی هستند. ۳۰٪ از این عفونت‌های غذایی منجر به مرگ می‌شوند. مطالعات مختلف، توانایی بالای این باکتری را برای اتصال و تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف نشان داده‌اند (۲، ۱).

بیوفیلم، گروهی از سلول‌های میکروبی است که با شبکه‌ای از کانال‌های داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی‌ساکاریدی خارج سلولی به نام مادهٔ پلیمریک خارج سلولی در ارتباط هستند (۳). در صنایع غذایی، اتصال باکتری‌های پاتوژن و فاسد کنندهٔ مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرایندهای تولید و بسته‌بندی آنها و سرانجام، تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی، می‌تواند منبع

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-01]

بالقوهٔ آلودگی محصولات و فراورده‌های غذایی و انتقال بیماری‌ها باشد(۴).

رشد باکتری‌ها به حالت بیوفیلم روی سطوح، انتقال آنها را آسان‌تر و از بین بردنشان را مشکل می‌کند. زیرا سلول‌های بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های آزاد، در مقابل بیوسایدها و ضدعفونی‌کننده‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. از آنجا که اطلاعات اندکی در رابطه با تشکیل بیوفیلم سالمونلا روی سطوح در تماس با فراورده‌های غذایی یا پزشکی در کشورمان وجود داشت، هدف از این تحقیق، بررسی تشکیل بیوفیلم سالمونلا اینتریتیدیس (RITCC 1624) با منشاء غذایی روی سطوح مختلف بود. سطوح به کار رفته در این پژوهش در صنایع غذایی و پزشکی مطرح هستند و مطالعهٔ روند چسبندگی سالمونلا روی آنها به کنترل عفونت کمک فراوانی می‌کند.

• مواد و روش‌ها

سنجش هیدروفوبیسیتی سطح سلول‌ها: در آزمایش اتصال باکتری‌ها به هیدروکربن اکتان (۵) کشت فعال سالمونلا اینتریتیدیس (RITCC 1624) برای جمع‌آوری سلول‌های باکتریایی سانتریفوژ شد (با دور ۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه). سپس به سلول‌های ته‌نشین شده، بافر فسفات اضافه شد. کدورت سوسپانسیون میکروبی به استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند رسانده شد. در مرحلهٔ بعد، جذب نوری اولیه آن در ۶۴۰ نانومتر خوانده شد. سپس ۰/۵ml از هیدروکربن اکتان به کووت اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه توسط دستگاه ورتکس با دور متوسط مخلوط شد. بعد از جدا شدن دو فاز آبی و آلی از هم، جذب نوری فاز آبی (ثانویه) در طول موج ۶۴۰ نانومتر خوانده شد. نسبت سلول‌هایی که از فاز آبی خارج شدند، از فرمول زیر محاسبه شد(۶):

درصد سلول‌های متصل به هیدروکربن =(A1-A2)/A1×۱۰۰

A1= Initial OD, A2= Final OD, λ=۶۴۰ nm

تشکیل بیوفیلم روی سطوح: ابتدا باکتری به کدورت معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند رسانده شد و ۱ml از آن به ارلن حاوی ۵۰ml محیط تریپتیکاز سوی براث و ۲ اسلاید شیشه‌ای که با اتانول ۹۶٪ تمیز و ضد عفونی شده بودند، اضافه شد. سپس ارلن‌ها در دمای آزمایشگاه و روی شیکر با دور ۱۰۰ و مدت زمان‌های۲، ۴، ۸، ۱۶ و ۲۰ ساعت قرار داده شدند. مراحل تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح استیل و پلی‌اتیلن نیز به همین صورت بود(۷).

استریلیزاسیون سطوح: برای استریل کردن سطوح استیل(Type 304 no 2B)، کوپن‌های استیل در استن قرار گرفتند تا لکه گریس یا روغن از روی آنها پاک شود. سپس در یک شویندهٔ قلیایی غوطه‌ور شده و با آب مقطر، شستشو و اتوکلاو شدند(۸). سطوح پلی‌اتیلن در شویندهٔ قلیایی غوطه‌ور شدند و حدود نیم ساعت در زیر اشعهٔ UV قرار گرفتند. اسلایدهای شیشه‌ای نیز با اتانول ۹۶٪ ضدعفونی و سپس اتوکلاو شدند.

شمارش باکتری‌های بیوفیلم: برای شمارش باکتری‌ها از روش Drop plate استفاده شد(۹). به این ترتیب از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده، سری رقت تهیه شد. برای تهیهٔ این سوسپانسیون، سواب کشیده شده به سطحی که بیوفیلم باکتری تشکیل شده بود، در آب مقطر ورتکس شد. سپس ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون (با رقت مشخص) برداشته و در یک قسمت از چهار قسمت پلیت‌های نوترینت آگار پخش شد. این عمل، پنج مرتبه برای یک رقت مشخص انجام شد. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای C° ۳۵ انکوبه شدند و سپس تنها رقتی که تعداد کلنی در آن در هر قطره بین ۳ تا ۳۰ کلونی بود، انتخاب و شمارش شد. با توجه به فرمول زیر تعداد باکتری‌ها در واحد سطح محاسبه شد:

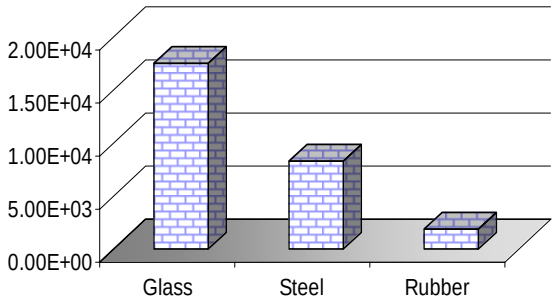
$$\text{Log}(\text{CFU/cm}^2) = \text{Log}\{(\text{CFU میانگین/حجم قطره}) \times (\text{۱۰}^{\text{رقت مورد نظر}})(\text{۱۰ml / سطح مورد نظر } \text{cm}^2)\}$$

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-01]

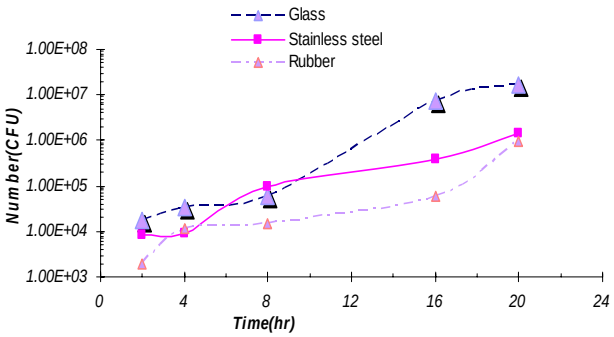
• یافته‌ها

هیدروفوبیسیتی سالمونلا اینتریتیدیس با آزمون MATH، ۷۳٪ به دست آمد. آزمون‌های تشکیل بیوفیلم نشان داد که این باکتری روی هر سه سطح، بیوفیلم تشکیل داده است، البته میزان آن روی سطح شیشه و سپس استیل زنگ نزن و پلی‌اتیلن با اختلاف معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر بود (شکل ۱). میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا روی هر سه سطح در ساعت‌های اولیه ۴ و ۸ ساعت به علت رشد کُند آن بسیار کم بود ولی در زمان‌های ۱۶ و ۲۰ ساعت با افزایش رشد، بالاتر رفت(شکل ۲).

میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا اینتریتیدیس در ساعت‌های متفاوت روی سطح شیشه‌ای استیل و پلی‌اتیلن اختلاف معنی‌داری نداشت (شکل ۲). اتصال سالمونلا اینتریتیدیس در تماس کوتاه ۲ ساعته روی هر سه سطح معنی‌دار بود، اما در مدت زمان‌های طولانی‌تر ۴، ۸، ۱۶ و ۲۰ ساعت، اختلاف معنی‌داری نداشت. بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا در حد واسط فاز مایع و هوا بود.



شکل۱- مقایسهٔ تشکیل بیوفیلم سالمونلا اینتریتیدیس روی سطوح مختلف



شکل۲- مقایسهٔ تشکیل بیوفیلم سالمونلا اینتریتیدیس روی سطوح مختلف در زمان‌های متفاوت

• بحث

باکتری مورد نظر با اختلاف معنی‌داری بیوفیلم بیشتری روی سطح استیل زنگ نزن نسبت به سطح پلاستیکی تشکیل داد ($P<0/05$) (شکل ۱). این نتیجه، به این دلیل، مهم است که جنس اکثر سطوح تماس با غذا در دستگاه‌های فراوری مواد غذایی از جنس استیل زنگ‌نزن است. در تحقیق حاضر، اتصال S. enteritidis به سطوح استیل بعد از ۲ ساعت به طور معنی‌داری بیشتر از پلی‌اتیلن بود (شکل‌های ۱ و ۲). Sinde و Carballo(۲۰۰۰) با مطالعه روی سالمونلا و لیستریا نشان دادند که به غیر از هیدروفوبیسیتی سطحی باکتری‌ها عوامل دیگری نیز در اتصال باکتری‌ها به سطوح نقش دارد(۱۰). آنها مشاهده کردند که سالمونلا با هیدروفوبیسیتی بالاتر از لیستریا، توانایی تشکیل بیوفیلم کمتری روی سطوح دارد. در این تحقیق، هیدروفوبیسیتی بسیار بالای این باکتری (۷۳٪) از دلایل تمایل زیاد این سویهٔ ایرانی برای تشکیل بیوفیلم روی سطوح است. در این مطالعه، سویهٔ سالمونلا اینتریتیدیسِ مورد استفاده با هیدروفوبیسیتی ۷۳٪ روی سطح شیشه‌ای نسبت به استیل و پلی‌اتیلن، قدرت تشکیل بیوفیلم بیشتری از خود نشان داد و از آنجا که سطوح شیشه‌ای و استیل نسبت به سطوح پلی‌اتیلن، هیدروفیل‌ترهستند، می‌توان به نقش مهم جاذبهٔ ناشی از هیدروفوبیسیتی سطح باکتری و سطح هیدروفیل در تشکیل بیوفیلم پی برد. همچنین، هیدروفوبیسیتی بالای بین سطح باکتری و سطح شیشه‌ای با ایجاد نیروی دافعه از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-01]

اتصال باکتری و درنهایت، تشکیل بیوفیلم روی این سطح جلوگیری می‌کند. بنابراین، با توجه به نتایج این تحقیق، پدیده‌های اتصال و تشکیل بیوفیلم باکتریایی از یک عامل تأثیر نمی‌پذیرند، به طوری که هیدروفوبیسیتی بالا برای تشکیل بیوفیلم لازم هست، اما کافی نیست.

Giaouris نشان داد که رشد باکتری‌ها روی سطوح، در حد فاصل فاز مایع-هوا بیشتر از باکتری‌های غوطه‌ور در فاز مایع است و فاز مایع- هوا تشکیل بیوفیلم و میزان اتصال بیشتری است(۲). در این پژوهش، نیز بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم باکتری مورد آزمایش روی سطوح مختلف در همین فاز مشاهده شد. هوازی بودن باکتری‌های موردنظر، در دسترس بودن مواد غذایی و ایده‌آل بودن شرایط در این فاز برای تشکیل بیوفیلم می‌تواند از دلایل این موضوع باشد. با توجه به این نتایج، در صورت حضور سالمونلا در محیط‌های در ارتباط با مواد غذایی یا مراکز درمانی، تشکیل بیوفیلم اجتناب‌ناپذیر است.

نتایج این تحقیق به خوبی نشان داد که باکتری بیماری‌زای غذایی سالمونلا اینتریتیدیس روی سطوحی که به فراوانی در محیط‌های غذایی استفاده می‌شود، توانایی تشکیل بیوفیلم دارد. به کارگیری پروتکل دقیق و عملی شستشو و ضدعفونی در این مراکز، علاوه بر پایش مداوم جهت حضور بیوفیلم‌ها، ضروری به نظر می‌رسد.

• References

1. Austin JW, Sanders G, Kay W, Collinson SK. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. FEMS Microbiol Lett 1998; 162: 295-301.
2. Giaouris ED, Nychas GJ. The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. J Food Microbiol 2006; 23, 747-752.
3. Chmielewski RAN, Frank JF. Biofilm formation and control in food processing facilities. J Food sci 2003; 2: 22-32.
4. Bryers JD. BiofilmsII: process analysis and application. New York , John Wiley and Sons; 2000; 327-360.
5. Mozes N, Rouxhet PG. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. J Microbial Methods 1987; 6: 99– 112.
6. Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 1980; 9: 29–33.
7. Bos R, Mei HC, Busscher HJ. Physico-Chemistry of initial microbial adhesive interactions-its mechanisms and methods for study. FEMS miccrobiol Lett 1999; 23: 179-230.
8. Beresford MR, Andrew PW, Shama G. *Listeria monocytogenes* adheres to many materials found in food processing environments. J Appl Environ Microbiol 2001; 90: 1000-1005.
9. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J Microbiol Methods 2001; 44: 121–129.
10. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* spp. and *L.monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. J Food microbial Methods 2000; 17: 439-447.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-09-01]