Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

مقاله پژوهشی

اثرات دمای رشد و سن بیوفیلم در مقاومت بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم* 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 میکروارگانیسم‌های مهم بیماری‌زا مواد غذایی می‌باشد. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات فاژ *سالمونلا تیفی‌موریوم* بر بیوفیلم سالمونلا در مدل غذایی گوشت مرغ بود.

مواد و روش کار: بیوفیلم روی سطح استیل ضدزنگ و در ۳ دمای انکوباسیون ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد تشکیل شد و اثرات فاژ در سه غلظت 10^4، 10^6، 10^8 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 بیوفیلم روی استیل ضدزنگ در محیط گوشت مرغ را دارد و میزان آن تحت تأثیر دمای انکوباسیون و سن بیوفیلم است، به‌طوری‌که در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد و ۷ روز، بیشترین تراکم بیوفیلمی را نشان داد. اثرات فاژ بر بیوفیلم نیز نشان داد که افزایش غلظت فاژ، اثرات معنی‌داری در از بین بردن بیوفیلم ندارد و زمان تماس فاژ و باکتری نیز اثری معنی‌داری ندارد. اثرات فاژ بر بیوفیلم تحت تأثیر سن بیوفیلم است، به‌طوری‌که بیشترین اثر فاژ، بر بیوفیلم یک روزه مشاهده گردید و بیوفیلم ۷ روزه مقاومت نسبی نسبت به فاژ نشان داد.

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

کلیدواژه‌ها: باکتریوفاژ، سالمونلا تیفی‌موریوم، بیوفیلم، 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 غیرقابل‌کنترل می‌شود که سروتیپ‌های مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک در این‌گونه در طبیعت گردش پیدا می‌کنند. در جنس سالمونلا بیش از ۲۳۰۰ سروتیپ شناسایی‌شده است ولی *سالمونلا تیفی‌موریوم و سالمونلا انتریدیدیس* 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).

بیوفیلم، پدیده تجمع میکروارگانیسم‌ها در سطوح زنده (ازجمله 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(نویسنده‌ی 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.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

ایمنی و کیفیت محصول غذایی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. باکتری-های مختلفی ازجمله جنس *سالمونلا، لیستریا، اشریشیا، باسیلوس، استافیلوکوکوس و سودوموناس* توانایی تشکیل بیوفیلم در محیط فرآوری غذا را دارا هستند (۲). اتصال میکروارگانیسم و تشکیل بیوفیلم 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 می-دهد (۳). شرایط محیطی مؤثر در تشکیل بیوفیلم نیز شامل pH، دما، اسمولاریته، میزان O_2، محتوای تغذیه‌ای و حضور سایر باکتری‌ها است (۴). تداخل تمامی این خصوصیات در تشکیل بیوفیلم باکتری مؤثر است. معمولاً میکروارگانیسم‌هایی با قابلیت تشکیل بیوفیلم نسبت به ترکیبات ضدمیکروبی مقاوم هستند، لذا برای کاهش و یا از بین بردن بیوفیلم 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 موردتوجه قرارگرفته 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، روش-های فعلی پاک‌سازی و ضدعفونی معایبی همچون سمیت و مقاومت به ترکیبات ضدمیکروبی را به دنبال دارد (۶ و ۷). بنابراین تلاش برای یافتن ترکیبات جدید برای کنترل و پیشگیری از بیوفیلم، زمینه تحقیقاتی مهمی در این زمینه بشمار می‌رود.

استراتژی‌های مختلف برای کنترل و ریشه‌کنی بیوفیلم پیشنهادشده 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 بیوفیلم مطرح می‌باشد که می‌توان به‌منظور کاهش و یا حذف بیوفیلم از غذا و سطوح در تماس با غذای 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 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 بیوفیلم باکتری‌ها است (۹). امروزه مطالعات زیادی در زمینه کنترل بیوفیلم‌ها توسط مواد ضدعفونی‌کننده با پایه طبیعی ازجمله اسانس‌ها و استفاده از باکتریوفاژها به‌عنوان عوامل طبیعی و جایگزین برای مواد ضدعفونی-کننده شیمیایی انجام‌شده است (۵). هدف این مطالعه بررسی اثر تیمار حرارتی ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در تشکیل بیوفیلم *سالمونلا* در مدل غذایی براث 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 بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریم* در مدل گوشت مرغ و ارزیابی اثر سن بیوفیلم یک و ۷ روزه *سالمونلا تیفی‌موریم* در اثربخشی فاژ در مدل گوشت مرغ می‌باشد.

مواد و روش کار

تهیه و آماده‌سازی باکتری:

باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* 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 براث انجام شد. جهت تعیین غلظت از روش تعیین جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیله‌ی اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

تهیه‌ی استوک فاژ:

باکتری به روش احیای ۲ مرحله‌ای آماده گردید. فاژ STP38 لیتیک متعلق به خانواده *میروویریده* 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[1] رقت سازی گردید و سپس به‌روش کشت دولایه کشت داده شد. پس از بستن لایه رویی، پلیت‌ها به‌صورت وارونه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری

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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

شد. از بین پلیت‌ها، پلیتی که پلاگ‌های فاژ باهم ادغام نشده و به‌صورت کاملاً جدا نیز نیستند (بین آن‌ها مرزی از باکتری وجود دارد) انتخاب شد. در این مرحله تیتر فاژ به روش شمارش تعداد پلاگ نیز مشخص شد که حدود 10^{10} پلاگ در هر میلی‌لیتر بود، سپس ۵ میلی‌لیتر SM بافر روی پلیت ریخته شد و پلیت در انکوباتور شیکردار در دمای ۱۷ درجه سانتی گرد با دور ۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس مایع روی پلیت جمع-آوری و مایع جمع شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد زیر صفر نگهداری شد (۱۰).

تهیه‌ی محلول بنزوآلکانیوم کلراید:

برای مقایسه اثرات ضدبیوفیلمی فاژ با ضدعفونی‌کننده‌های معمول، از غلظت ppm[1] ۲۰۰ بنزوآلکانیوم کلراید[2] ساخت شرکت شیمی دارویی آفاق استفاده شد. محلول پس از تهیه از فیلتر ۰/۲۰ میکرونی عبور داده و به‌صورت تازه مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه‌ی براث گوشت مرغ:

برای تهیه براث 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 سانتریفیوژ شد. مایع رویی جدا و پس از اتوکلاو به مدت ۱۵ دقیقه، مورداستفاده قرار گرفت (۱۱).

تشکیل بیوفیلم بر سطح استیل زنگ نزن:

کوپن‌ها از جنس استیل زنگ نزن و در اندازه ۲۰×۱۰×۱ میلی-متر تهیه شدند. جهت تمیز کردن کوپن‌ها، از روش والریانو استفاده شد (۱۲). ابتدا کوپن‌ها، در داخل استون خالص به‌مدت 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 مجداً با آب مقطر چندین بار شستشو داده شدند. مرحله بعدی، شستشو با الکل ۷۰ درصد بود. سپس، کوپن‌ها در فور با دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد خشک و جهت انجام عمل استرلیزاسیون، اتوکلاو گردید و تا زمان استفاده در ظروف استریل نگهداری شدند.

برای تشکیل بیوفیلم، ابتدا در میکرو تیوپ‌های ۵ میلی‌لیتری، ۴/۵ میلی‌لیتر براث گوشت اضافه و سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری قبلاً تهیه‌شده، اضافه تا مقدار باکتری به 10^{7} باکتری در هر میلی‌لیتر برسد. سپس در هر فالکون یک عدد کوپن استریل قرار داده و فالکون را به مدت ۷ روز در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

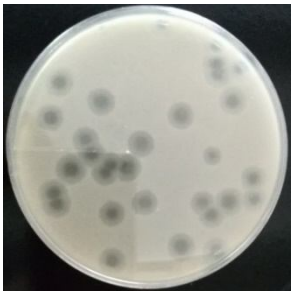
اثرات فاژ بر بیوفیلم:

در فواصل هر دو روز یک‌بار تا روز ۷، کوپن‌ها از داخل براث برداشته و به یک براث گوشت تازه بدون باکتری انتقال داد شد (۱۳). در روز اول (۲۴ ساعت پس از تلقیح) و روز ۷، کوپن از فالکون بیرون آورده و پس از شستشو در پپتون واتر ۰/۱ درصد حاوی ۰/۸۵ کلرید سدیم در معرض استوک فاژ با ۳ غلظت متفاوت (10^{4}، 10^{6} و 10^{8} پلاگ در هر میلی‌لیتر) در دو زمان تماس (۱۰ و ۲۰ دقیقه) قرار داده شد. در مرحله بعد کوپن‌ها پس از شستشو مجدد در پپتون سالین واتر، جهت تعیین اثرات فاژ بر بیوفیلم تشکیل‌شده، شمارش باکتریایی سطحی کوپن با استفاده از روش سوآب‌برداری، رقت سازی و روش پخش خطی[3] در محیط کشت آگار لوریابرتانی تعیین گردید. نمونه کنترل بدون تیمار فاژ نیز آماده و تعداد باکتری روی آن شمارش شد. بنزآلکانیوم کلراید با دوز ppm ۲۰۰، به‌عنوان کنترل مثبت و جهت مقایسه استفاده گردید (۱۳).

تمامی آزمایشات، در حداقل سه تکرار انجام گردید. اطلاعات به‌دست آمده، توسط نرم‌افزار GraphPad (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) مورد تجزیه‌وتحلیل قرار گرفت. تحلیل واریانس با روش ANOVA و تست Newman-Keuls post در سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ صورت گرفت.

یافته‌ها

نتایج حاصل از تأثیر باکتریوفاژ در سه غلظت 10^{4}، 10^{6} و 10^{8} پلاگ در هر میلی‌لیتر[4] (شکل ۱) در دو زمان تماس ۱۰ و ۲۰ دقیقه و در سه دمای انکوباسیون ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد بر روی بیوفیلم یک و ۷ روزه *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده بر روی سطح استیل زنگ نزن در مقایسه با تأثیر بنزآلکانیوم روی بیوفیلم مذکور در قالب شکل‌های شماره ۴-۲ و جدول ۱ آورده شده است.



[1] Parts-per-million

[2] Benzalkonium chloride

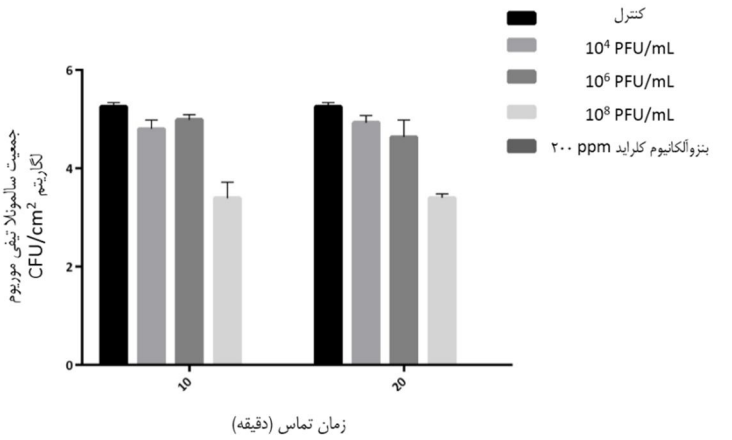
[3] Track

[4] Plaqe forming units per milliliter (PFU/ml)

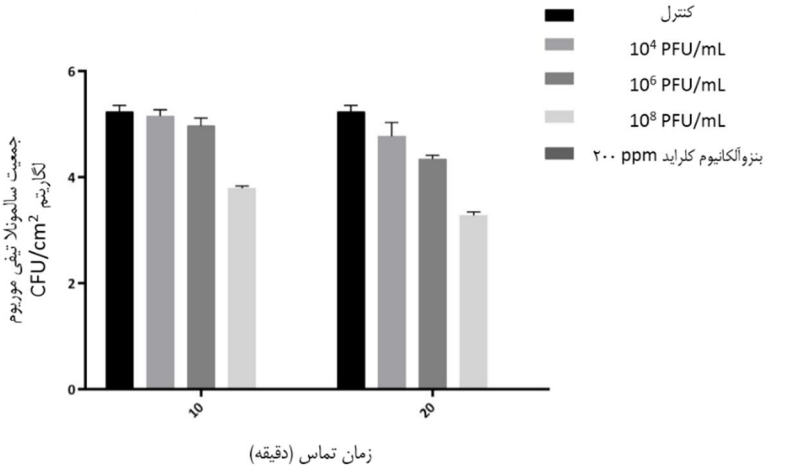
Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

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

مطابق شکل شماره ۲، در مقایسه تأثیر باکتریوفاژ و بنزآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه سالمونلا تیفی موریوم تشکیل‌شده در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد، تیمار با بنزوآلکانیوم کلراید نسبت به نمونه کنترل در ۱۰ و ۲۰ دقیقه باعث نابودی تمام بیوفیلم شده است. تیمار با باکتریوفاژ در غلظت $۱۰^{۴}$ پلاک در هر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱۰ و ۲۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری را نشان نداد ($P \leq ۰/۰۵$) و این میزان کم‌تر از ۰/۵ سیکل لگاریتمی بود، میزان تیمار با باکتریوفاژ در غلظت $۱۰^{۸}$ هم در ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه نسبت به سایر غلظت‌های باکتریوفاژ سبب کاهش تقریباً یک سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری شد. در شکل شماره ۳، نتایج اثرات باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه *سالمونلا تیفی-موریوم* تشکیل‌شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد آورده شده است. نتایج حاکی از اثرات معنی‌دار بنزآلکانیوم کلراید بر روی بیوفیلم بود ($P \leq ۰/۰۵$) که هم در زمان تماس ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه اثر آن سبب نابودی تمام باکتری‌ها شده است. اثرات میزان $۱۰^{۸}$ باکتریوفاژ هم در ۱۰ دقیقه و هم در ۲۰ دقیقه نسبت به سایر غلظت‌های باکتریوفاژ معنی‌دار بود ($P \leq ۰/۰۵$) و سبب کاهش تقریباً یک سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری شد.

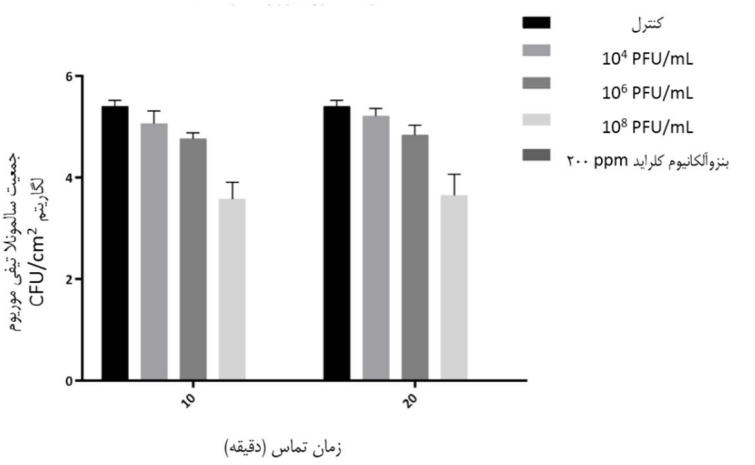


شکل (۲): اثرات سه غلظت مختلف باکتریوفاژ (پلاک در هر میلی‌لیتر) و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در براث گوشت مرغ در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد. در این نمودار، بنزوآلکانیوم کلراید باعث حذف کامل جمعیت باکتری گردید.



شکل (۳): اثرات سه غلظت مختلف باکتریوفاژ (پلاک در هر میلی‌لیتر) و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در براث گوشت مرغ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. در این نمودار، بنزوآلکانیوم کلراید باعث حذف کامل جمعیت باکتری گردید.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018



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

نتایج حاصل از تیمار و کشت بیوفیلم ۷ روزه *سالمونلا تیفی موریوم* در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سانتی‌گراد در جدول ۱ نشان داده‌شده است. در دمای ۸ درجه سانتی‌گراد، بنزآلکانیوم 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 ($P \leq ۰/۰۵$). تیمار با بنزوآلکانیوم 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 ($P \leq ۰/۰۵$). بنزآلکانیوم کلراید، اثر معنی‌داری بر بیوفیلم بیوفیلم ۷ روزه باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نشان داد ($P \leq ۰/۰۵$) 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 ($P \leq ۰/۰۵$). تیمارهای در تماس با بنزوآلکانیوم کلراید ۲۰۰ ppm رشد نکرده‌اند که نشان‌دهنده‌ی 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 باکتری نسبت به نمونه کنترل‌شده است که در ۲۰ دقیقه نسبت به ۱۰ دقیقه این اختلاف معنی‌دار است ($P \leq ۰/۰۵$).

بحث و نتیجه‌گیری

شکل‌گیری بیوفیلم یک پدیده پیچیده می‌باشد که تحت تأثیر چندین عامل است ازجمله 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 ازجمله: 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 درنهایت شکل بیوفیلم و ویژگی‌های آن را مشخص می‌کند (۱۴). این ساختارها ممکن است تحت تأثیر عوامل محیطی ازجمله: 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 جداشده‌اند تحت تأثیر دما (به‌ترتیب ۲۰ و ۲۸ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفتند (۱۳). گزارش‌شده که تشکیل بیوفیلم گونه‌های *لیستریا*، *سالمونلا* و

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

استافیلوکوکوس اورئوس به‌شدت تحت تأثیر طیف دمایی گسترده از ۴ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۱۳). در بعضی مطالعات شکل-گیری بیوفیلم با افزایش دما، افزایش پیدا می‌کند (رابطه مستقیم بین افزایش دما و شکل‌گیری بیوفیلم) و در موارد دیگر در دمای کم‌تر از حد مطلوب افزایش تولید بیوفیلم مشاهده‌شده است (۱۵). در مقایسه با دما، میزان اطلاعاتی که در مورد اثرات pH در شکل-گیری بیوفیلم 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 سروار *سالمونلا*، بیشترین سروتایپ جداشده *سالمونلا تیفی‌موریوم* می‌باشد که حدود ۳۵ درصد آن از انسان جداشده است. چندین مطالعه در مورد شکل‌گیری بیوفیلم توسط *سالمونلا تایفی-موریوم* در سطوح مختلف گزارش‌شده 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 باانرژی 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 بیوفیلم است. متابولیسم تغذیه‌ای مربوط به باکتری مستقیماً به حضور آنزیم‌ها وابسته است. ازآنجایی‌که کنترل میزان واکنش آنزیم‌ها به دما وابسته است به همین خاطر شکل‌گیری بیوفیلم به حضور و واکنش آنزیم‌ها وابسته است که آنزیم‌ها سبب پیشرفت و توسعه سیستم بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی باکتری می-گردد و به جرأت می‌توان گفت که دما نقش بسیار مهمی در توسعه و تکامل بیوفیلم دارد (۱۶). اثر دما بر روی چسبندگی گونه‌های *لیستریا* به گستردگی موردمطالعه قرارگرفته است با این‌حال نتایج گزارش‌شده به نظر ناقص می‌رسد. گزارش‌ها نشان می‌دهد که چسبندگی *لیستریا مونوسیتوژنز* به‌شدت تحت تأثیر دمای رشد می-باشد. 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 مونوسیتوژنز* روی استیل ضدزنگ در دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد بیشتر از ۴ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد است (۱۷). سن بیوفیلم یک عامل مهم است که مقاومت آن را در برابر ضدعفونی‌کننده‌های مختلف بیشتر می‌کند. یک اجماع عمومی است که باکتری‌های موجود در بیوفیلم پس از قرار گرفتن در معرض آنتی‌بیوتیک‌ها با افزایش سن بیوفیلم، بقا آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۷). اثر ترکیب چهارتایی آمونیوم بر بیوفیلم ۴ روزه باعث کاهش ۰/۳۸ سیکل لگاریتمی گونه‌های مختلف *سالمونلا* می‌شود درحالی‌که در بیوفیلم ۳ روزه این میزان ۲/۵۲ سیکل لگاریتمی بود (۱۸). مقاومت تشکیل بیوفیلم *لیستریا مونوسیتوژنز* را در شرایط فرآوری مواد غذایی در برابر عوامل مختلف مطابق با اصول بهداشتی موردمطالعه قراردادند و گزارش دادند که میزان بقای بیوفیلم ۸ و ۱۲ روزه به‌طور قابل‌توجهی بالاتر از بیوفیلم ۴ روزه بود؛ بنابراین نتایج نشان می‌دهد که سن بیوفیلم جنبه مهمی است که به هنگام ارزیابی نیاز داریم که اثر ضدعفونی را در نظر بگیریم (۱۹). مطالعات زیادی در خصوص کاربرد فاژ در کنترل باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی انجام‌شده است. ولی گزارش‌های کمی در خصوص کاربرد فاژ در کنترل بیوفیلم این عوامل در مدل‌های غذایی صورت گرفته است. پدیده حذف و کنترل بیوفیلم با استفاده از فاژ، فرآیندی پیچیده است که فقط توسط فاژهای لیتیک امکان‌پذیر است. شکست در استفاده از فاژ در کنترل بیوفیلم، می‌تواند ناشی از عدم توانایی فاژ به نفوذ در بخش-های زیرین بیوفیلم و یا غیرفعال شدن فاژ توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در ماتریس بیوفیلم باشد (۲۰). مکانیسم‌های مختلفی برای اثربخشی فاز بر بیوفیلم بیان‌شده است. گفته‌شده است که ژنوم بسیاری از فاژها حاوی ژن‌های آنزیم‌هایی هستند که توانایی تخریب مواد موجود در ماتریس بیوفیلم 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 بیوفیلم می‌گردند. فاژها همچنین باعث آزاد شدن DNA نیز می‌گردد، پدیده‌هایی که می‌تواند بر ساختار ماتریس بیوفیلم نیز اثرگذار باشد. البته در دم برخی فاژها ازجمله T4 آنزیم‌هایی وجود دارد که به نفوذ فاژ به داخل باکتری کمک می‌کند که این نیز کمک مهمی در تخریب ماتریس بیوفیلم دارد (۶). اثربخشی فاژ بر بیوفیلم 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 تیفی‌موریوم* گردید (۲۱). در مطالعه‌ای لی و همکاران در سال ۲۰۱۳ اثرات استفاده از کلی‌فاژ ECP4 بر بیوفیلم باکتری *اشریشیا کلی* در آب کلم و سبزی‌های موردمطالعه قراردادند. 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 بیوفیلم شناسایی نگردید (۲۲). لیاو و همکاران در سال۲۰۱۲ نیز اثر باکتروفاژ بر جلوگیری از تشکیل بیوفیلم *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 بیوفیلم ۷۲ ساعته گردید (۲۳). در مطالعه چیبر و همکاران در سال ۲۰۱۳، نقش

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

آنتاگونیستی آهن بر اثربخشی باکتریوفاژ بر علیه بیوفیلم باکتری *کلبسیلا پنومونیا* بررسی شد، نتایج نشان داد که بعضی از ترکیبات ازجمله آهن، کبالت و روی اثر آنتاگونیستی بر علیه اثر فاژ بر بیوفیلم دارند. مثلاً در فرآورده گوشتی میزان آهن بسیار بالاست که می‌تواند یکی از دلایل اثر نداشتن فاژ باشد. مکانیسم این اثر تاکنون مشخص نشده است (آهن بر تشکیل بیوفیلم هم اثر مهاری دارد) (۲۴).

عوامل مختلفی در توانایی فاژ در حذف باکتری متصل به این سطوح دارد. در بین آن‌ها، نسبت فاژ به ویروس یا شاخص تعدد عفونت (MOI[1]) یک فاکتور اساسی است. هر چقدر میزان فاژ زیاد باشد، اثربخشی فاژ بر بیوفیلم نیز افزایش نشان می‌یابد. اثر استفاده از سه میزان از فاژ شناخته شده P100(PFU/ml $۱۰^{۵}$،$۱۰^{۶}$،$۱۰^{۷}$،$۱۰^{۸}$) بر بیوفیلم لیستریا منوسیتوژنز ۷۲ ساعته تشکیل شده روی سطح استیل زنگ نزن موردمطالعه قرار گرفته است (۲۵). کاهش مشخصی در میزان توده بیوفیلم به میزان ۵/۲۹ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع استیل در ۸ ساعت اول بعد از مواجهه فاژ و بیوفیلم مشاهد گردید. حتی بالا رفتن سن بیوفیلم، باعث کاهش حساسیت باکتری نسبت به فاژ نمی‌گردد. به‌طوری که فاژ شناخته شده F116، حتی بر بیوفیلم سودوموناس هیدروژنیزا ۲۰ روزه نیز مؤثر است. فاژها توانایی تولید پلی ساکارید دِپلیمراز دارد که توانایی تجزیه ماتریس اگزوپلی ساکاریدی بیوفیلم را دارد (۵). در مطالعه‌ی حاضر که اثر باکتریوفاژ بر روی بیوفیلم *سالمونلاتایفی‌موریوم* 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 دیده‌شده است که آن‌هم به دلیل نابالغی بیوفیلم و اگزوپلی 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. درمجموع می‌توان گفت که استفاده به‌تنهایی فاژ مورداستفاده 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 موردبررسی 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, Chorianopoulos N, Langsrud S, Møretrø 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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

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; 70:22-9٠.
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, Møretrø 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 Microbial 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.

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

Original Article

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

Rebwar Mohammadi[1], Mehran Moradi[2*], Hossein Tajik[3*], Hadi Ghasemmahdi[4], Rojan Modaresi[5], Surur Khalili Sadaghiani[6]

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

Downloaded from umj.umsu.ac.ir at 10:42 +0330 on Friday January 19th 2018

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*