

## بررسی اثر ضد عفونی کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌های مختلف

منیژه مهدوی\*، روحا کسری کرمانشاهی\*\* و محمد جلالی\*\*\*

\* کارشناس ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه اصفهان

\*\* گروه زیست‌شناسی دانشگاه الزهراء

\*\*\* گروه میکروبیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

### چکیده

**سابقه و هدف:** بیوفیلم عبارت است از تجمع میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای ما بین آنها که به یک سطح متصل شده‌اند. بیوفیلم‌ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد پلیمریک خارج سلولی مانعی در برابر نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌گردند. بیوفیلم با عوامل کنترلی مانند حرارت، خشک کردن، پاک‌کننده‌ها و شوینده‌ها به سادگی از بین نمی‌روند و بر روی سطوح در تماس با مواد غذایی باقی می‌ماند. در نتیجه احتمال زنده ماندن باکتری‌های بیماریزا و فاسد کننده و سپس آلودگی و انتقال بیماری‌های ناشی از غذا بیشتر می‌گردد.

**مواد و روش‌ها:** اثر حذفی و کشندگی ضد عفونی کننده‌های معمول مورد استفاده در صنایع غذایی و مراکز عفونی بر بیوفیلم باکتری‌های بیماریزا مانند *Salmonella enteritidis*، *Listeria monocytogenes* و *Staphylococcus aureus* و محیطی کارخانه فراورده گوشتی با روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. در مورد سنجش میزان حذف بیوفیلم باکتری‌ها از رنگ کریستال ویوله و در مورد اثر کشندگی از رنگ تنفسی TTC استفاده گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان داد که بیوفیلم باکتری‌ها به اثر ضد عفونی کننده‌ها مقاومت نشان می‌دهند، گرچه بعضی از آنها مانند هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن بیشترین درصد حذف بیوفیلم و گلو تار آلدهید، بیشترین اثر کشندگی را نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** بنابراین کارایی ضد عفونی کننده‌ها بسته به نوع بیوفیلم باکتری‌ها بر حسب گونه، ساختار و شرایط محیطی متفاوت است. این مسأله اهمیت انتخاب ضد عفونی کننده مناسب را در صنایع و مراکز بهداشتی برای جلوگیری و در نتیجه کنترل تشکیل بیوفیلم نشان می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** اتصال، بیوفیلم، ضد عفونی کننده، میکروتیتر پلیت.

## The Assessment of Disinfectants on Various Bacterial Biofilms

M.Mahdavi\*, R. Kasra Kermanshahi\*\*, M. Jalali\*\*\*

\*M.Sc. Biology Department, The University of Isfahan

\*\* Biology Department, University of Al-Zahra

\*\*\* Department of Nutrition, School of Health, Medical Sciences, University of Isfahan

### Abstract

Biofilm is a functional consortium of microorganisms attached to the surface and is embedded in the extracellular polymeric substances (EPS) produced by the microorganisms. The biofilm consists of microbial cell clusters with a network of internal channels or voids in the extracellular polysaccharide and glycoprotein matrix (EPS). Biofilms, due to special structure and EPS, are more resistant to antimicrobial agents. Thus control measurement such as heating, drying and detergents can not eliminate them. Biofilms even with cleaning and disinfecting methods can remain on various surfaces which may assist the survival of pathogenic and spoilage bacteria in the food processing environment, a contributing factor in foodborne disease outbreaks. In this study biofilm elimination potential and bactericidal effect of current food industry and clinical disinfectants on biofilm of pathogenic bacteria such as *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* and environmental bacteria from meat processing factory were assessed by microtiter plate method. Biofilm elimination potential and bactericidal effect were assessed by crystal violet and TTC stain, respectively. Results indicated that bacterial biofilms are resistant to disinfectants. However, Hypochlorite Sodium, Propanol and Peroxide Hydrogen had the most Biofilm elimination and Glutaraldehyde had the most bactericidal effect on biofilms. Thus, efficiency of disinfectants based on strain, structure and environmental condition is different. This indicates the importance of appropriate choice of disinfectants in industries and hygiene centers for prevention and control of biofilm formation.

**Keywords:** Adhesion, Biofilm, Disinfectant, Microtiter plate method.

### مقدمه

پلی ساکارید، پروتئین، فسفولیپید، تیکوییک اسید و دیگر مواد پلی مریک هیدراته با ۸۵ تا ۹۵ درصد آب تشکیل شده است و نقش انتقال مواد غذایی، اتصال به سطوح و افزایش مقاومت به عوامل باکتری کش را دارد (۳). بیوفیلم در سیستم های آب صنعتی، تجهیزات پزشکی و صنایع غذایی تشکیل می گردد (۴).

در صنایع غذایی اتصال باکتری های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرایندهای تولید و بسته بندی آنها و نهایتاً تشکیل بیوفیلم های میکروبی، می تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فراورده های غذایی و انتقال بیماریها

میکروارگانیسم ها قادرند به سطوح مختلف چسبیده و در مدت کوتاهی رشد و تکثیر نموده و توده ای به نام بیوفیلم (Biofilm) تشکیل دهند. بیوفیلم می تواند در شرایط مناسب توسط اغلب میکروارگانیسم ها از جمله میکروارگانیسم های بیماریزا و فاسدکننده مواد غذایی تشکیل شود (۱ و ۲). در حقیقت بیوفیلم، گروهی از سلول های میکروبی است که با شبکه ای از کانالهای داخلی در ماتریکس گلیکوپروتئینی و پلی ساکاریدی خارج سلولی به نام ماده پلی مریک خارج سلولی در ارتباط هستند. ماده پلی مریک خارج سلولی از

باشد (۵، ۶ و ۷). همچنین تشکیل بیوفیلم بر روی وسایل، تجهیزات و دستگاههای پزشکی باعث آلودگی و در نتیجه انتقال عفونتهای بیمارستانی می‌گردد (۸ و ۹). میکروارگانیسم‌ها در نتیجه تماس با سطوح آلوده به راحتی می‌توانند انتقال یابند. رشد باکتری‌ها به حالت بیوفیلم بر روی سطوح، شستشو و از بین بردنشان را مشکل می‌کند، زیرا سلول‌های بیوفیلم در مقایسه با سلول‌های آزاد، به عوامل باکتری‌کش و ضد عفونی کننده‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. در این حالت باید برای انتخاب مناسب ضد عفونی کننده جانب احتیاط را رعایت کرد، زیرا گاهی اوقات عوامل شوینده و ضد عفونی کننده بر روی سطوح در تماس با مواد غذایی باقی می‌مانند و مواد غذایی را آلوده می‌کنند (۱۰).

با توجه به این که در ایران اطلاعات اندکی در رابطه با کنترل تشکیل بیوفیلم باکتری‌ها بر روی سطوح در تماس با فراورده‌های غذایی یا پزشکی و مقاومت آنها به عوامل ضد عفونی کننده وجود داشت، هدف از این تحقیق بررسی اثر ضد عفونی کننده‌های متفاوت مورد استفاده در صنایع غذایی یا پزشکی بر سالمونلا اینترتیدیس (RITCC 1624)، لیستریا مونوسیتوزنز (RITCC 1293 4a serotype) و باکتری‌های جداسازی شده از محیط کارخانه فراورده گوشتی بود. نتایج این تحقیق در کنترل بیوفیلم‌ها حایز اهمیت است.

## مواد و روش‌ها

### باکتری‌ها و محیط‌های کشت مورد استفاده

باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق برای بررسی اثر ضد عفونی کننده‌ها، لیستریا مونوسیتوزنز سرو تیپ 4a RITCC 1293 و سالمونلا اینترتیدیس (RITCC 1624) تهیه شده از انستیتو رازی و نیز تعدادی از باکتری‌های جداسازی شده از کارخانه فراورده گوشتی (۱۳) شامل استافیلوکوکوس اورئوس از سطح اسلایسر، باسیلوس سوبتیلیس و استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس از سطح چرخ گوشت و باسیلوس سوبتیلیس از هوای کارخانه بودند.

باکتری‌های لیستریا مونوسیتوزنز، سالمونلا اینترتیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب بر روی محیط کشت‌های اختصاصی (Merck) PALCAM، و (Merck) XLD و بردپارکر (Merck) همراه با ساپلیمتهای مربوط جهت اطمینان از خالص بودن، کشت و سپس در یخچال نگهداری شدند.

کارآیی ضد عفونی کننده‌ها معمولاً به حضور مواد آلی مزاحم، pH، دما، غلظت و مدت زمان تماس بستگی دارد ضد عفونی کننده‌ها باید مؤثر و ایمن بوده و استفاده از آنها آسان باشد، آثار آنها بر روی سطوح باقی نمانند و به راحتی شسته شوند، اثر سمی نداشته باشند و یا بر کیفیت محصولات تأثیر نامطلوب نگذارند (۱۱).

در کل کنترل و حذف بیوفیلم‌ها در محیط‌های صنعتی، غذایی و تجهیزات پزشکی که حضور جمعیت‌های میکروبی مشکل‌زاست، یکی از بحث‌برانگیزترین موضوعات می‌باشد. در صنایع غذایی می‌توان بیوفیلم‌ها را با به کارگیری استراتژی‌های متفاوت شبیه روش‌های فیزیکی و شیمیایی از بین برد. علاوه بر این در سال‌های اخیر از روش‌های بیولوژیک برای کنترل باکتری‌ها استفاده می‌شود (۱۲).

## تهیه مواد ضد عفونی کننده با رقت های مورد نظر

برای تهیه رقت از بیوسایدهای مایع، اطلاعات لازم از روی دستورالعمل های شرکت سازنده، جمع آوری و میزان غلظت مورد نیاز با توجه به رابطه های ذکر شده ذیل به دست آمد.

$$C2 = A \text{ mg/lit} \times g/1000\text{mg} = B \text{ g/lit}$$

$$V1 = C2V2/C1$$

$$C2 = A = \text{میزان غلظت مورد نیاز}$$

$$d = (\text{دانسیته})$$

درصد بیوساید روی بطری = a

غلظت گرم در لیتر بیوساید درون بطری  $C1 = 1 \text{ ad}$

ضد عفونی کننده های مورد آزمایش این تحقیق در کارخانه های غذایی برای ضد عفونی سطوح به کار می روند. همچنین در این تحقیق از همان دامنه غلظت های ضد عفونی کننده که در کارخانه های غذایی مجاز بود، استفاده گردید. در جدول ۱ رقت های نهایی تهیه شده از ضد عفونی کننده ها آورده شده است (۵).

جدول ۱. میزان غلظت ضد عفونی کننده های مورد استفاده در این تحقیق

غلظت مورد استفاده (ppm)	نوع ضد عفونی کننده
۱۰۰ و ۱۰	هیپو کلریت سدیم
۲۰۰۰ و ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰	پروپانل
۲۰۰۰ و ۱۵۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰	آب اکسیژنه
۱۰۰ و ۸۰، ۶۰، ۴۰	گلو تار آلدهید

تمام این عوامل ضد عفونی به مدت یک ساعت بکار رفت و نیز هر ۲۰ دقیقه یک بار عوض شدند. علاوه بر این، ستون های تیمار شده، ستون های کنترل (حاوی بیوفیلیم و بدون تیمار) و همچنین ستون های شاهد (حاوی محیط برات استریل) در هر پلیت وجود داشتند. بعد از گذشت یک ساعت، عوامل ضد میکروبی بوسیله شستن چاهک ها خارج شدند و چاهک ها با ۲۰۰ میکرو لیتر کریستال ویوله ۲٪ به مدت ۵ دقیقه رنگ شدند. چاهک ها با آب شیر شسته و با ۲۰۰ میکرو لیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳٪ پر شدند. سپس پلیت ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ °C انکوبه و بعد از این مدت

تعیین توانایی عوامل ضد میکروبی در حذف بیوفیلیم برای سنجش اثر عوامل ضد میکروبی روی حذف بیوفیلیم در آزمایش میکرو تیتیر پلیت، بعد از آماده سازی کشت باکتری ۱۸ تا ۲۰ ساعته، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله ها تهیه شد. این سوسپانسیون به نسبت یک به ۱۰۰ در تریپتیکاز سوی برات استریل رقیق گردید و تمام چاهک ها در یک پلیت ۹۶ خانه ای با ۲۵۰ میکرو لیتر از این محیط پر شدند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند و فوراً عوامل ضد عفونی پس از خارج کردن محتویات چاهک ها و شستشوی آنها به کار رفتند.

### آنالیزهای آماری

اختلاف بین داده‌ها، با آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه‌ای Tukey-Kramer توسط نرم‌افزار Excel و Minitab مورد بررسی قرار گرفت. در آنالیزهای آماری اعدادی که دارای P value کمتر از ۰/۰۵ داشتند، معنی‌دار در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

بعد از سه بار تکرار آزمایش‌های بررسی اثر ضد عفونی کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها نتایج زیر به دست آمد. اثر حذفی هیپوکلریت سدیم، گلو تارآلدئید، آب اکسیژنه و پروپانل بر بیوفیلم باکتری‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری نشان نداد و اثر آن بر همه باکتری‌ها یکسان بود ( $P > 0/05$ ). تنها میزان کشته شدن بیوفیلم سلول‌های باکتریایی متفاوت در غلظت ۱۰۰ ppm هیپوکلریت سدیم اختلاف معنی‌دار نشان داد ( $P < 0/05$ ) و در مورد سایر ضد عفونی کننده‌ها این میزان یکسان بود ( $P > 0/05$ ). در غلظت ۱۰۰ ppm هیپوکلریت سدیم بیشترین تأثیر کشندگی بترتیب بر باکتری‌های *Listeria monocytogenes* (۷۵/۷٪)، *Bacillus subtilis* (۶۲/۵٪)، *Staphylococcus aureus* (۵۰٪)، *Salmonella enteritidis* (۴۶٪) و *Staph. Epidermidis* (۳۴٪) بود ( $P < 0/05$ ).

در این تحقیق بیشترین مقاومت به اثر ضد عفونی کننده‌ها به بیوفیلم باکتری‌های *B. subtilis* و *Staph. epidermidis* تعلق داشت، زیرا میزان حذف و کشته شدن بیوفیلم این باکتری‌ها در اثر غلظت‌های متفاوت ضد عفونی کننده‌های به کار رفته اختلاف معنی‌داری نشان

به شدت تکان داده شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت گردید. در آخر سنجش کارایی بیوساید یا درصد کاهش بیوفیلم<sup>۱</sup> از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به فرمول زیر محاسبه شد (۱۴):

$$\text{Reduction Percent} = \left[ \frac{(C - B) - (T - B)}{(C - B)} \right] \times 100$$

C = میانگین جذب نوری چاهک‌های کنترل

B = میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد

T = میانگین جذب نوری چاهک‌های تیمار شده

### روش تعیین میزان اثر کشندگی عوامل ضد میکروبی بر بیوفیلم‌ها

برای سنجش اثر عوامل ضد میکروبی در کشتن سلول‌های بیوفیلم، روش آزمایش دقیقاً مشابه با آزمایش تعیین پتانسیل حذف بیوفیلم بود، اما در آخرین مرحله به جای استفاده از رنگ کریستال ویوله، از رنگ TTC با غلظت ۰/۲٪ استفاده گردید. همچنین مدت زمان انکوباسیون میکروپلیت‌ها با این رنگ نزدیک به ۲ ساعت، در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد و تاریکی بود. در نهایت بعد از شستشوی چاهک‌ها و استفاده از اسیداستیک گلاسیال ۳۳٪ جذب نوری چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر خوانده شد. نحوه محاسبه درصد کاهش یا کارایی بیوسایدها نیز همانند روش قبلی انجام شد (۱۵، ۱۶).

جدول، بیشترین میزان اثر ضد عفونی کننده و در بالاترین غلظت آن بر باکتری مورد آزمایش می باشد.

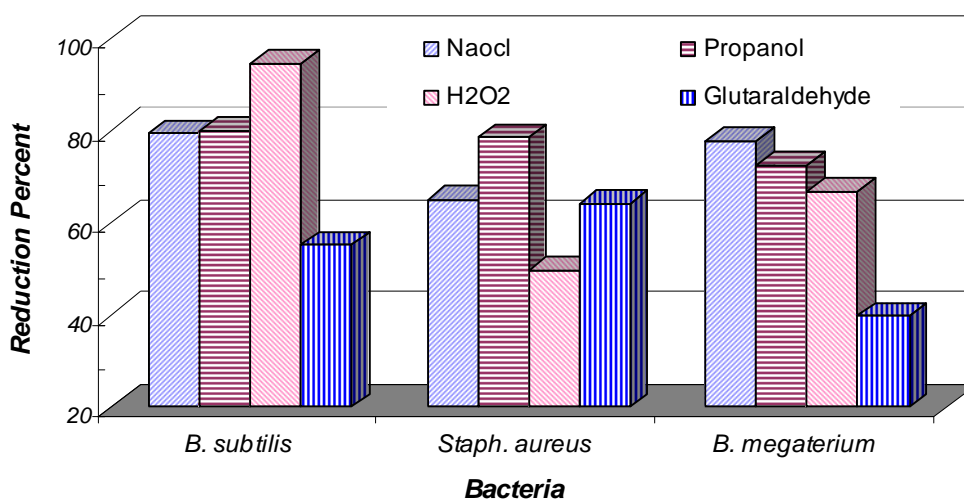
نداد ( $P > 0.05$ ). نتایج اختلاف معنی دار اثر حذفی و کشندگی ضد عفونی کننده ها بر سایر باکتری ها در جدول ۲ آمده است. توجه به این نکته که عدد ذکر شده در این

جدول ۲. نتایج اختلاف معنی دار اثر حذفی و کشندگی غلظت های متفاوت ضد عفونی کننده ها بر بیوفیلیم باکتری ها

باکتری	هیپوکلریت سدیم (%)		گلو تار آلدهید (%)		آب اکسیژنه (%)		پروپانل (%)	
	کشتا، گرم	حالتی، گرم	کشتا، گرم	حالتی، گرم	کشتا، گرم	حالتی، گرم	کشتا، گرم	حالتی، گرم
<i>B. megaterium</i>	معنی دار (۶۶)	معنی دار (۷۸)	معنی دار (۷۴)	-	-	معنی دار (۶۷)	معنی دار (۶۶)	معنی دار (۷۳)
<i>Staph. aureus</i>	معنی دار (۱۴)	معنی دار (۶۴)	معنی دار (۷۷)	-	-	-	-	-
<i>B. subtilis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. enteritidis</i>	-	معنی دار (۴۶)	معنی دار (۶۹)	-	-	-	-	معنی دار (۷۴)
<i>Staph. epidermidis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i>	معنی دار (۳۰)	-	معنی دار (۹۰)	-	-	-	معنی دار (۶۶)	-

با *S. enteritidis* و *Staph. epidermidis*، *monocytogenes* بیوسایدهای مختلف معنی دار نبود ( $P > 0.05$ ). نتایج بقیه باکتری ها با اختلاف معنی دار در نمودار ۱ آمده است.

مقایسه تأثیر ضد عفونی کننده ها نشان داد که آنها در بیشترین غلظت به کار رفته هر ضد عفونی کننده بالاترین قدرت را دارند. اختلاف درصد حذف باکتری های *L.*



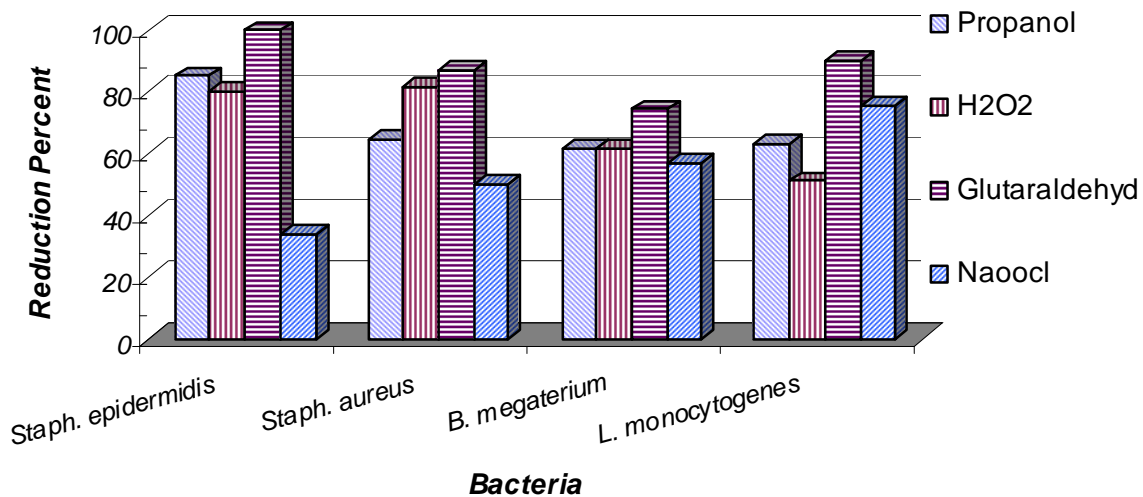
نمودار ۱. مقایسه اثر حذفی ضد عفونی کننده ها بر بیوفیلیم باکتری ها

*B. subtilis* (۹۵%) بیشترین تأثیر را داشتند. اثر کشندگی بیوسایدهای به کار رفته در این تحقیق بر باکتری های *S.*

هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن به ترتیب بر *B. megaterium* (۷۸%)، *Staph. aureus* (۷۹%) و

بیوفیلم باکتری‌های *Staph. epidermidis*، ۹۰٪ سلول‌های *L. monocytogenes*، ۸۷٪ سلول‌های *Staph. aureus* و ۷۴٪ سلول‌های *B. megaterium* را بکشد.

*B. subtilis* و *enteritidis* معنی دار نبود و در نمودار ۲ نتایج سایر باکتری‌ها با اختلاف معنی دار مشاهده می‌شود. با توجه به این شکل، اثر کشندگی گلو تار آلدئید نسبت به سایر بیوسایدها با اختلاف معنی داری بیشتر می‌باشد ( $P < 0/05$ )، بطوری که توانسته است ۱۰۰٪ از



نمودار ۲. مقایسه اثر کشندگی ضد عفونی کننده‌ها بر بیوفیلم باکتری‌ها.

EPS آنها را نیز از سطوح برمی‌دارد و بنابراین امکان اتصال باکتری‌های جدید و تشکیل بیوفیلم در سطوح کمتر می‌گردد (۱۷). استفاده از کلر به عنوان وسیله‌ای برای از بین بردن EPS توسط Samrakandi در سال ۱۹۹۷ تأیید شد. علاوه بر این Kumar و Anand در سال ۱۹۹۸ کلر را به عنوان ماده شیمیایی که EPS را دپلمریزه می‌کند، معرفی کردند (۱۹). Trachoo (۲۰۰۲) نشان داد که کلرین مؤثرترین sanitizer در غیر فعال کردن باکتری بیماریزای *Campylobacter jejuni* است، به طوری که غلظت ۵۰ ppm آن به مدت ۴۵ ثانیه برای غیر فعال کردن این باکتری کافی می‌باشد (۲۰).

## بحث

تنها راه جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، ضد عفونی منظم سطوح قبل از شروع تشکیل بیوفیلم می‌باشد. اما در عمل، اجرای آن در صنایع غذایی بسیار مشکل است (۱۷). یکی از راههای مرسوم جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، استفاده از مواد ضد عفونی کننده در صنایع غذایی است. از جمله ضد عفونی کننده‌های رایج در صنایع غذایی می‌توان هیپوکلریت سدیم و پراکسید هیدروژن را نام برد (۱۸). معمولاً در مبارزه با بیوفیلم، کلر فعال به عنوان انتخاب اول مطرح است. کلر علاوه بر کشتن میکروب‌ها،

زمان طولانی و همراه با دترجنت استفاده گردد (۲۱).  
Koffi و Frank (۱۹۹۰) در مطالعات خود مقاومتهای  
متفاوت بیوفیلیم *L. monocytogenes* را در تیمارهای  
ترکیبی هیپوکلریت سدیم و گرما نشان دادند (۲۲، ۲۳).

در این تحقیق به نظر می‌رسد هیپوکلریت سدیم در  
از بین بردن سلول‌های *S. enteritidis* چندان کارایی ندارد  
زیرا تنها ۵۵٪ سلول‌های آن را از بین برده و ۴۵٪ را  
کشته است. در حالی که Joseph و Karunasagar (۲۰۰۰)  
مقاومت بیوفیلیم‌های تشکیل‌شده سالمونلا را در برابر  
یدوفور و کلرین سنجیدند. آنها بیان کردند که ۱۰۰ ppm  
کلر در طی ۲۰ دقیقه تمام سلول‌های سالمونلا را غیر فعال  
می‌کند (۲۴).

Coworkers و De Beer (۱۹۹۴) با استفاده از  
میکروالکترودهای ردیاب کلرین در طی ضدعفونی با  
کلر، غلظت‌هایی از آن را که به بیوفیلیم *P. aeruginosa*  
و *Klebsiella pneumoniae* نفوذ کرده بود، اندازه‌گیری کردند.  
نفوذ کلرین به بیوفیلیم، شبیه به آنتی‌بیوتیک، ۲۰٪ کمتر از  
غلظت به کار رفته بود. این محققین نتیجه گرفتند که  
مقدار نفوذ و سرعت انتشار بیوساید درون بیوفیلیم بسته  
به وضعیت و تنوع در توده سلولی، متفاوت می‌باشد. به  
همین دلیل در تحقیق حاضر نیز بین درصد کشته شدن  
سلولهای بیوفیلیم با غلظت ۱۰۰ ppm هیپوکلریت سدیم  
باکتری‌های مختلف، اختلاف معنی‌دار دیده می‌شود که  
می‌تواند بیان‌کننده این مطلب باشد.

Lomander و همکاران (۲۰۰۴) نیز گزارش کردند که  
غلظت ۵۰ ppm کلر برای کشتن سلول‌های بیوفیلیم کافی  
است، اما قادر به برداشتن باکتری‌ها از روی سطوح  
نیست و حتی در این حالت توانایی آن با شستشو به  
وسیله آب قابل مقایسه نمی‌باشد (۱۹). Caldwell (۱۹۹۰)  
نیز به این نتیجه رسیده بود که غلظت‌های پایین  
هیپوکلریت سدیم (۵-۵ ppm) تنها از تشکیل بیوفیلیم  
روی سطوح جلوگیری می‌کند، اما برای از بین بردن و غیر  
فعال کردن کامل بیوفیلیم به غلظت‌های بالاتر از ۵۰ ppm  
کلرین نیاز می‌باشد (۲۰).

Norwood و Gilmour (۲۰۰۰) غلظت‌های بالای  
کلر (۱۰۰۰ ppm) را برای کاهش اساسی تعداد باکتری‌ها  
در بیوفیلیم لازم دانستند، در حالی که تنها غلظت ۱۰ ppm  
آن برای از بین بردن سلول‌های پلانکتونیک کافی  
است (۱۷). نتایج این تحقیق نشان داد که غلظت ۱۰۰ ppm  
کلر قادر است با اختلاف معنی‌داری اکثر سلول‌های  
باکتری‌های مورد آزمایش را از سطح حذف و بکشد. به  
عنوان مثال در غلظت ۱۰۰ ppm هیپوکلریت سدیم، ۶۰٪  
سلول‌های *L. monocytogenes* حذف و ۸۰٪ کشته شدند.  
Jessen و Lammert (۲۰۰۳) نشان دادند که اثر  
دترجنت‌ها بر *L. monocytogenes* قابل چشم‌پوشی است،  
در حالیکه کاراترین ضدعفونی‌کننده‌ها توانایی حذف آن  
را در بیوفیلیم دارند. البته این تأثیر زمانی است که ضد  
عفونی‌کننده طبق دستورالعمل کارخانه سازنده، به مدت



Gaylard (۲۰۰۰) کارایی کاملاً متفاوتی از این دو بیوساید گزارش می‌کنند (۲۱).

در این پژوهش با مقایسه اثرات بیوسایدهای مختلف بر باکتری‌ها می‌توان به این نتیجه رسید که اثر بیوسایدها بسته به نوع باکتری متفاوت است، به طوری که درصد حذف باکتری‌های *Staph. L. monocytogenes*، *S. enteritidis* و *epidermidis* توسط هیپوکلریت سدیم، گلوتارآلدئید، پروپانل و پراکسید هیدروژن مشابه می‌باشد ( $P > 0.05$ )، اما اثر آنها بر باکتری‌های *B. megaterium* و *Staph. aureus* مطابق با نمودار ۱ می‌باشد.

هیپوکلریت سدیم، پروپانل و پراکسید هیدروژن به ترتیب بیشترین تأثیر را بر آنها داشته‌اند. اثر کشندگی گلوتارآلدئید بر همه باکتری‌ها بیشتر می‌باشد، در حالی که اثر حذفی آن کمترین است (نمودار ۱). این مسأله می‌تواند به طبیعت سمی گلوتارآلدئید ارتباط داشته باشد که باعث کشته شدن بیشتر سلول‌های بیوفیلم می‌شود. بنابراین در این تحقیق از لحاظ قدرت کشندگی، گلوتارآلدئید نسبت به سایر بیوسایدها بیشترین توانایی را نشان داد. Grobe و همکاران (۲۰۰۰) غلظت‌های بالای گلوتارآلدئید را برای از بین بردن کامل بیوفیلم ضروری می‌دانند. Laopaiboon و همکاران (۲۰۰۶) نشان دادند که غلظت‌های ۴۰ ppm، ۸۰ و ۱۰۰ گلوتارآلدئید قادر به حذف کافی میکروارگانیسم‌های بیوفیلم نمی‌باشد (۲۵).

در جدول ۲ به خوبی دیده می‌شود که بیشترین مقاومت به اثر ضد عفونی کننده‌ها مربوط به دو باکتری *B. subtilis* و *Staph. epidermidis* می‌باشد. زیرا نتایج آنها دارای اختلاف معنی‌داری نبوده است ( $P > 0.05$ ). همچنین *Staph. aureus* به پروپانل و پراکسید هیدروژن، *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* به پراکسید هیدروژن مقاومت نشان داده‌اند ( $P > 0.05$ ). بنابراین با حضور این باکتری‌ها در محیط‌های غذایی، تشکیل بیوفیلم اجتناب ناپذیر است که به راحتی نیز از بین نمی‌روند. این نتیجه از نظر این که باکتری‌های *S. enteritidis*، *L. monocytogenes* و *Staph. aureus* بیماریزا می‌باشند، از اهمیت بیشتری هم برخوردار است.

در این تحقیق پراکسید هیدروژن با کارایی بالا نزدیک به ۱۰۰٪ سلول‌های بیوفیلم *B. subtilis* را غیر فعال کرده است و بیشترین تعداد (۹۰٪) از سلول‌های *B. megaterium* را کشته است.

Stewart و Coworker (۲۰۰۰) نیز نشان دادند که پراکسید هیدروژن نمی‌تواند به بیوفیلم *P. aeruginosa* نفوذ کند و سلول‌های آن را بکشد. Carpentier (۱۹۹۳)، Bourion (۱۹۹۶) و Fatemi (۱۹۹۹) پیشنهاد کردند که ضد عفونی کننده‌های اسیدی مانند پراکسید هیدروژن از ترکیبات کلردار در تجهیزات فراورده‌های گوشتی کارا تر می‌باشند. در حالی که Frank و Koffi (۱۹۹۰) فعالیت این دو را مشابه ارزیابی کردند و همچنین Possini و

یافتنی باشد. انتخاب ضدعفونی کننده مناسب که بیوفیلیم‌ها کمترین مقاومت را به آن نشان دهند و بیشترین درصد از آنها را حذف و بکشند، هم هزینه‌ها را کاهش می‌دهد و هم محیط‌هایی را که در آنها شستشوی مؤثر انجام شده است، حفظ می‌کند. سود این اقدامات برای صنایع کاهش فساد محصولات، بهبود کیفیت و اطمینان مصرف‌کنندگان می‌باشد.

### نتیجه‌گیری

از آنجایی که از بین بردن بیوفیلیم باکتری‌های تشکیل شده روی سطوح، بسیار مشکل است و بیوفیلیم‌ها منبع بالقوه آلودگی منجر به فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماری‌ها می‌باشند، بنابراین مبارزه با ایجاد شدن آنها در صنایع غذایی برای سلامت عمومی جامعه حائز اهمیت می‌باشد. نتایج این تحقیق به خوبی نشان داد که در صنایع غذایی شستشو برای از بین بردن بیوفیلیم باید با طراحی سیستماتیک انجام گیرد و نیز برنامه‌های دقیقی وجود داشته باشد از جمله برنامه‌ریزی در شستشو، انتخاب عوامل شوینده، ضدعفونی‌کننده و تجهیزات شوینده مناسب و کارا.

### منابع

1- J.W., Costerton Z., Lewandowski, D.E., Caldwell, D.R., Korber H.M., Lappin-Scott et al.

در این تحقیق استفاده از غلظت ۱۰۰ppm گلو تارآلدئید تمام سلول‌های بیوفیلیم باکتری‌ها را می‌کشد، ولی در از بین بردن آنها کارایی چندانی از خود نشان نمی‌دهد. از آنجایی که قدرت کشندگی بالای یک ماده ضدعفونی کننده می‌تواند از رشد و تکثیر مجدد سلول‌های بیوفیلیم جلوگیری کند، گلو تارآلدئید می‌تواند بهترین گزینه برای ضدعفونی سطوح باشد، اما به دلیل میزان حذف کم سلول‌های بیوفیلیم به تنهایی توصیه نمی‌شود بلکه بهتر است همراه با ضدعفونی کننده‌های دیگر مورد استفاده قرار گیرد.

از نتایج تحقیق حاضر می‌توان پی برد که کارایی عوامل شوینده بسته به توان آنها در برداشتن بیوفیلیم از سطوح و کشتن باکتری‌های درون بیوفیلیم متفاوت می‌باشد. البته حذف کامل بیوفیلیم تنها با تیمارهای ضدعفونی‌کننده به دست نمی‌آید، حتی اگر آن عامل مورد استفاده در مقابل سلول‌های پلانکتونیک بسیار مؤثر باشد (نمودار ۱ و ۲). بنابراین برای حذف کامل بیوفیلیم بر روی سطوح دستگاهها، محیط کارخانه‌های تولیدی و اماکن بهداشتی بهتر است از ترکیب چندین ضد عفونی کننده و بطور همزمان استفاده گردد.

از آنجایی که تشکیل بیوفیلیم در سیستم‌ها بیانگر وجود آلودگی در فرایند می‌باشد، به نظر می‌رسد جلوگیری از تشکیل بیوفیلیم با مطالعه بیشتر اثر ضدعفونی‌کننده‌های مختلف بر بیوفیلیم باکتری‌ها دست

- 10- D. G., Dunsmore, A., Twomey, W. G., Whittlestone, and H. W., Morgan, Design and performance of systems for cleaning product-contact surfaces of food equipment: *Rev. J Food protects.* 44, 220-240; (1981).
- 11- R. D., Ponterfact, Bacterial adhesion: Its consequence in food processing. *J Can. Inst. Food Sci. Technol.* 24, 113-117; (1991).
- 12- P., LenaVena, Microbial biofilm in food processing. *Rev. J Academic Press.* 32, 321-326; (1999).
- 13- M., Mahdavi, M. Jalali and R.K. Kermanshahi, The assessment of biofilm formation in Iranian meat processing environments. *Res. J. Microbiol.* 3(3): 181-186; (2008).
- 14- S., Sonak, and N. B., Bhosle, A simple method to assess bacterial attachment to surfaces. *Biofoul.* 9, 31– 38; (1995).
- 15- J., Smith, and G., McFeters, Mechanisms of INT(2-(4-iodophenyl)-3(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC(5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J Microbiol Methods.* 29, 161– 175; (1997).
- 16- S., Stepanovic, D., Vukovic, I., Dakic, B., Savic, and M., Svabic-Vlahovic, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbial Meth.* 40(2), 175– 179; (2000).
- Microbial biofilms: Annual reviews. *J. microbiol* 49: 711-745; (1995).
- 2- K.C., Marshall An overview of bacterial adhesion, activity, and control of surfaces. *ASM news;* 58: 202-207; (1992).
- 3- R.A.N., Chmielewski J.F., Frank et al. Biofilm formation and control in food processing facilities. *J food Sci;* 2: 22-32; (2003).
- 4- N., Trachoo Biofilms and the food industry. *J Sci Technol;* 25(6): 807-815; (2003).
- 5- J.D., Bryers BiofilmsII: process analysis and application. John Wiley and Sons, New York;; 327-360; (2000).
- 6- H.M., Neil Reflections on salmonella and other "wee Beasties" in foods. *Food Technol;* 55: 61-67; (2001).
- 7- E.A., Zottola K.C., Sasahara et al. Microbial Biofilms in the food processing industry: should they be a concern? *Int J Food Microbiol;* 23: 125-148; (1994).
- 8- R.J.C., McLean J.C., Nickel M.E., Olson et al. Biofilm associated urinary tract infections, p. 261–273. In H. M. Lappin-Scott and J. W. Costerton(ed.), *Microbial biofilms.* Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom; (1995).
- 9- G., Reid D., Lam Z., Policova A.W., Neumann et al. Adhesion of two uropathogens to silicone and lubricious catheters: influence of pH, urea and creatine. *J Mater Sci Mater Med;* 4:17–22; (1993).

- 22- M. W., Mittelman, Structural and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. Dairy Sci. 81, 2760-2764; (1998).
- 23- J. S., Peng, W. C., Tsai, and C., Chou, Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. Int Food Microbiol. 77, 11-18; (2002).
- 24- B., Joseph, S. K., Otta, and I., Karunasagar, Biofilm formation by *Salmonella* spp. On food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. Int Food Microbiol. 64, 367-372; (2000).
- 25- L., Laopaiboon, Effect of glutaraldehyde biocide on laboratory-scale rotating biological contactors and biocide efficacy. J Biotechnol. 9, 358-369; (2006).
- 17- B., Meyer, Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. Int Biodeter & Biodegrad. 51, 249-253; (2003).
- 18- S., Langsrud, M. S., Sidhu, and A., Holk, Bacterial disinfectant resistance- a challenge for the food industry. Int Biodeter & Biodegrad. 51, 283-290; (2003).
- 19- A., Lomander, P., Schreuders, R., Cohen, and A., Laila, Evaluation of chlorines impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. Bioresource Technol. 94, 275-283; (2004).
- 20- N., Trachoo, Biofilms and the food industry. Sci Technol. 25(6), 807-815; (2003).
- 21- B., Jessen, and L., Lammert, Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int biodeter & biodegrad. 51, 265-269; (2003).