تأثیر ضداتصالی بیوسورفکتانت *Lactcobacillus rhamnosus* بر باکتری‌های جداسازی شده از بیوفیلم خط تولید شیر پاستوریزه

سیده صالحه واعظی*[1]، آرزو طهمورث پور[2]

۱. باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد اصفهان (خوراسگان)، دانشگاه آزاد اسلامی، اصفهان، ایران.

۲. گروه علوم پایه پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اصفهان (خوراسگان)، اصفهان، ایران.

***نویسنده مسئول:** *ssvaezi@ymail.com*

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۵/۷/۲۸ تاریخ دریافت : ۲/۵/ ۱۳۹۵

چکیده

بسیاری از باکتری‌ها دارای قابلیت اتصال به سطوح می‌باشند که از این قابلیت آن‌ها با مفهومی به نام بیوفیلم یاد می‌شود. بیوفیلم‌های متصل به خطوط تولید صنایع غذایی مشکلات عدیده‌ای را در خط تولید و محصول نهایی ایجاد می‌کند لذا بررسی روش‌های کنترل آن‌ها ضروری می‌باشد. در این پژوهش ابتدا باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم از خط تولید شیر پاستوریزه کارخانه‌ای در شهر اصفهان، جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی (به کمک آزمون‌های بیوشیمیایی) شد. پس از آن بیوسورفکتانت حاصله از *Lactcobacillus rhamnosus* ATCC 7469 استخراج گردید و سپس بررسی اثر ضد اتصالی بیوسورفکتانت به روش میکروتیترپلیت و خوانش جذب نوری با الیزاریدر صورت گرفت. نهایتاً داده‌ها به روش تجزیه واریانس برای آزمون فاکتوریل و مقایسه میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ آنالیز شدند. نتایج نشان می‌دهد که غالب‌ترین باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس *Staphylococcus* با ۱۹٪ از جمعیت کل می‌باشد. هم‌چنین میانگین اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت استفاده‌شده در این پژوهش، ۴۲/۸٪ می‌باشد، بیشترین اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت بر *Klebsiella pneumoniae* با ۸۲/۳٪ کاهش اتصال و کمترین اثر ضدانصالی بر باکتری *Staphylococcus aureus* با ۴/۲٪ کاهش اتصال می‌باشد. لذا با توجه به مثبت بودن اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت مذکور، استفاده از آن در خط تولید در طی فرآیند CIP توصیه می‌گردد.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، بیوسورفکتانت، ضداتصالی، باکتری، جذب‌نوری.

مقدمه

بهداشت سطوح در تماس با موادغذایی، تأثیر بسزائی در کیفیت و امنیت غذا دارد، لذا می‌توان تشکیل بیوفیلم میکروبی بر سطوح را اصلی‌ترین مشکل در صنعت غذا دانست (Anand et al., 2014). بیوفیلم به مجموع میکروارگانیسم‌های متصل به سطوح جامد به وسیله ماتریکس پلی ساکارید خارج سلولی اطلاق می‌گردد (Rzhepishevska et al., 2014; Kafil and Mobarez; 2015). گزارشات متعددی مبنی بر آلودگی غذا، ناشی از ارتباط با سطوح آلوده به بیوفیلم وجود دارد به‌طوری که تشکیل بیوفیلم از عمده‌ترین و مهم‌ترین مشکلات صنعت غذا به خصوص صنایع آبجو-سازی، لبنیات، فرآورده‌های گوشت قرمز، ماکیان و ماهی‌ها می‌باشد (Frank et al., 2003; Jessen and Lammert, 2003; Srey et al., 2013; Adetunji et al., 2014(a); Somers and Wong, 2004; Chen et al., 2007). همچنین از مهم‌ترین مسائل عملیاتی در غشاءهای فیلتراسیون در طول بازه‌های زمانی طولانی شست‌وشو، تشکیل بیوفیلم میکروبی است به‌گونه‌ای که در سیستم‌های اولترافیلتراسیون و فیلتر غشائی اسمزمعکوس بیوفیلم‌های تکامل یافته‌ای

گزارش شده‌اند (Anand et al., 2014; Muthukumaran et al., 2005; Gram et al., 2007). بنابراین بیوفیلم موجود در صنعت غذا به‌عنوان یک فاکتور مهم تأثیرگذار بر اقتصاد و بهداشت عمومی در سرتاسر دنیا مطرح است. باکتری‌های مولد فساد در محصولات لبنی، قادرند به طور مستقیم از آلودگی‌های موجود در محیط مزرعه و همچنین آب شست‌وشوی تجهیزات و دستگاه‌ها در طول مسیر، وارد شیر شوند (Oliver et al., 2005). آلودگی‌های پس از پاستوریزاسیون هم در صنعت لبنیات عمدتاً در طول پرکردن دستگاه‌ها رخ می‌دهد (Dogan and Boor, 2003). برخی از انواع این باکتری‌ها پتانسیل اتصال به سطوح و تشکیل بیوفیلم را دارند و به عنوان یک تکیه-گاه یا سوبسترا برای میکروارگانیسم‌های باقدرت اتصال کمتر عمل می‌نمایند. بیوفیلم‌ها می‌توانند برروی درزها، زانوهای درونی لوله‌ها و واشرهای خط‌تولید گسترش یابند و عامل آلودگی پس از پاستوریزاسیون شوند. تشکیل بیوفیلم باعث افزایش احتمال بقاء باکتری‌های پاتوژن و انتشار آن‌ها در فرآورده‌های غذایی می‌گردد (Lapidot et al., 2006; Lehner et al., 2005). باکتری‌های بیوفیلم نسبت به باکتری‌های شناور موجود از مقاومت بالاتری برخوردار بوده و حذف آن‌ها از سیستم دشوارتر است. برای حذف این جوامع میکروبی متصل به سطوح از روش‌های مختلفی از جمله فیزکی، شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می‌شود که در این بین روش‌های شیمیایی پرکاربردترین روش در صنعت غذا به‌شمار می‌روند هرچند باتوجه به احتمال حضور ترکیبات شیمیایی در خطوط تولید و عدم حذف کامل بیوفیلم‌ها، استفاده از ترکیبات شیمیایی مطلوب نمی باشد. امروزه استفاده از روش‌های بیولوژیک و حتی محصولات میکروارگانیسم‌ها برای مقابله با تشکیل بیوفیلم به دلیل کارایی مناسب و کم خطر بودن بسیار مورد توجه محققین قرار گرفته‌است. بیوسورفکتانت (بیوامولسیفایر) به گروهی از مولکول‌های آمفی‌فیلیک با ساختار متنوع از مولکول‌های فعال سطحی اطلاق می شود که توسط میکروارگانیسم‌ها سنتز می‌شوند. بیوسورفکتانت‌ها ترکیباتی بیولوژیک هستند که فعالیت سطحی بالایی از خود نشان می دهند (Ajdic et al., 2002). استفاده از بیوسورفکتانت‌های حاصل از سویه های *Lactobacillus* بسیار امیدوار کننده‌است زیرا این باکتری‌ها کاملا بی‌ضرر و حتی مفید می‌باشند. (Singh and Cameotra, 2004). در پزشکی از بیوسورفکتانت‌ها به منظور جلوگیری از اتصال میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به سطوح جامد استفاده می‌شود. به‌عنوان مثال، سورفکتین در کاهش اتصال *Salmonella enterica*، *Salmonella typhimurium*، *Escherichia coli* و *Proteus mirabilis* به سوندها؛ بیوسورفکتانت *Lactobacillus fermentum* برای مبارزه با عفونت ناشی از بیوفیلم *Staphylococcus aureus* در ایمپلنت‌های جراحی (Mireles et al., 2001)، بیوسورفکتانت *Lactcobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus fermentum* و *Lactobacillus acidophilus* در کاهش فرایند اتصال *Streptococcus mutans* و درنتیجه کاهش ریسک پوسیدگی دندان (طهمورث‌پور، ۱۳۸۷)؛ ایجاد اختلال در تشکیل بیوفیلم‌های *Bordetella bronchiseptica* توسط رامنولیپیدها (Irie and Parsek, 2008)، بیوسورفکتانت *Streptococcus thermophiles*، برای کنترل رسوب در صفحات مبدل حرارتی پاستوریزاسیون شیر (Busscher et al., 1996)، بیوسورفکتانت *Pseudomonas putida*

جهت ممانعت از رشد و تکثیر بیوفیلم سایر گونه‌های *Pseudomonas* (Kuiper et al., 2004) و همچنین از بیوسورفکتانت *Bacillus subtilis* و *Bacillus licheniformis* بر کاهش بیوفیلم *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* (Rivardo et al., 2009) استفاده‌شده‌است.

مواد و روش کار

نمونه برداری

ابتدا خطوط تولید یک کارخانه لبنی در اصفهان از محصول تخلیه‌شده و پس از شست‌وشو در مکان (CIP)، از نقاط کور خط‌تولید با استفاده از سوآپ استریل نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها بلافاصله به محلول فسفات بافر سالین استریل منتقل شدند. از هر نقطه سه تکرار برداشته‌شد. نمونه‌ها سریعاً به آزمایشگاه میکروب شناسی ارسال شدند.

شناسایی باکتری ها

بعد از خالص‌سازی باکتری ها بر روی محیط کشت‌های اختصاصی،رنگ آمیزی گرم و آزمون پتاسیم-هیدروکسید ۳٪ انجام و براساس مورفولوژی و واکنش گرم باکتری‌ها از آزمون‌های بیوشیمیایی مناسب منطبق با جداول راهنمای برگی (according to Bergey's manual of systematic bacteriology) جهت شناسایی جنس و گونه احتمالی باکتری‌های جداسازی شده‌استفاده‌شد.

تولید و استخراج بیوسورفکتانت

سویه باکتریایی استاندارد - ATCC 7469 *Lactcobacillus rhamnosus* PTCC:1637 به عنوان پروبیوتیک مورد نظر تهیه گردید و از آن برای استخراج بیوسورفکتانت استفاده‌شد. به منظور تولید و استخراج بیوسورفکتانت مراحل زیر، انجام گرفت (Tahmourespour et al., 2011): تهیه کشت شبانه *Lactcobacillus rhamnosus* در محیط کشت MRS Broth (Merck، ساخت کشور آلمان)؛ تلقیح ۱۵ml از کشت شبانه به ۶۰۰ml محیط کشت MRS Broth استریل؛ انکوباسیون در انکوباتور شیکردار به مدت ۲۴ ساعت و دمای ۳۷°C ؛ سانتریفوژ به مدت ۵ دقیقه در ۱۰°C و ۱۰۰۰۰×g؛ دور ریختن مایع رویی و افزودن آب مقطر استریل دیونیزه به رسوب سلولی و سپس سانترفوژ به منظور شست‌وشو (تکرار دو مرتبه‌ای این مرحله)؛ حل کردن رسوب سلولی در ۱۰۰ml فسفات بافر سالین؛ هم‌زدن فسفات بافر سالین در دمای اتاق به مدت ۲ ساعت به‌منظور تولید بیوسورفکتانت؛ سانتریفوژ به‌منظور جداسازی بیورسورفکتانت حاصله؛ عبور مایع رویی از فیلترهای میلی‌پور با منافذ ۰/۲۲µm به‌منظور استریل کردن بیوسورفکتانت؛ نگهداری بیوسورفکتانت در فریزر ۱۸-°C.

تأثیر ضد اتصالی بیوسورفکتانت

به منظور بررسی خاصیت ضداتصالی بیوسورفکتانت خام استخراج شده از *Lactcobacillus rhamnosus*، از روش رنگ سنجی با الیزاریدر (ELISA Reader) استفاده شد؛ (Coa et al., 2009): به این ترتیب که در ابتدا چاهک‌های میکروتیترپلیت (microtiter plate) با ۲۰۰µl بیوسورفکتانت خام پر شد؛ میکروتیترپلیت به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴°C یخچال قرار داده‌شد؛ پس از آن، چاهک‌ها با فسفات بافر سالین سه مرتبه شست‌وشو داده‌شد؛ چاهک‌ها با ۲۰۰µl از سوسپانسون میکروبی(کشت شبانه باکتری در محیط کشت Trypticase Soy Broth (TSB) (Merck، ساخت کشور آلمان) که کدورت آن با نیم مک فارلند تنظیم شده است) پر شدند؛ برای ۴ ساعت

میکروتیترپلیت‌ها را در دمای اتاق قرار داده؛ پس از این زمان، چاهک‌ها تخلیه شدند و سه مرتبه با فسفات بافر سالین شست‌وشو شدند؛ باکتری‌های متصل به دیواره چاهک‌ها به وسیله اتانول تثبیت گردیدند؛ بیوفیلم تثبت‌شده با کریستال ویوله رنگ آمیزی شد؛ اسید استیک گلایسیال به چاهک‌ها اضافه گردید؛ در نهایت دانیسته نوری در طول موج ۴۹۲nm با دستگاه الیزاریدر خوانده‌شد. برای تهیه نمونه های کنترل نیز مراحل فوق الذکر انجام شدند با این تفاوت که در هیچ مرحله ای بیوسورفکتانت به چاهک ها اضافه نگردید. همچنین به منظور ایجاد نمونه های شاهد، تنها و تنها در تمامی مراحل مذکور، محیط کشت تریپتیکاز سوی براث استریل شد اضافه گردید.نحوی محاسبه درصد تأثیر ضداتصالی بیوسورفکتانت به صورت زیر بوده (طهمورث‌پور، ۱۳۸۷؛ کوآ و همکاران، ۲۰۰۹):

$$\text{درصد تأثیر} = \frac{\text{کنترل} - \text{تیمار}}{\text{کنترل} - \text{شاهد}} \times 100$$

آنالیز آماری

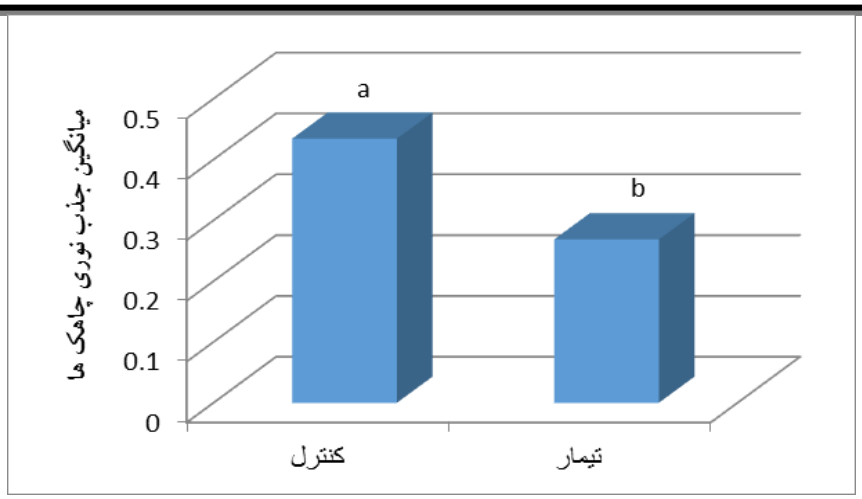
به منظور تحلیل آماری تأثیر ضداتصالی بیوسورفکتانت برروی باکتری‌ها، تجزیه واریانس برای آزمون فاکتوریل انجام گرفت و مقایسه میانگین به روش LSD در سطح احتمال ۵٪ صورت پذیرفت.

جدول ۱- جنس و گونه احتمالی باکتری‌ها

کد باکتری	جنس و گونه احتمالی	کد باکتری	جنس و گونه احتمالی
۱	*Shigella sonnei*	۱۱	*Shigella sonnei*
۲	*Corynebacterium xerosis*	۱۲	*Proteus penneri*
۳	*Shigella sonnei*	۱۳	*Aeromonas salmonicida*
۴	*Staohylococcus saprophvticus*	۱۴	*Micrococcus luteus*
۵	*Staohylococcus saprophvticus*	۱۵	*Shigella sonnei*
۶	*Pseudomonas aeruginosa*	۱۶	*Corynebacterium xerosis*
۷	*Aeromonas salmonicida*	۱۷	*Listeria monocytogenes*
۸	*Shigella boydii*	۱۸	*Staphylococcus aureus*
۹	*Klebsiella pneumoniae*	۱۹	*Staphylococcus aureus*
۱۰	*Bacillus circulans*	۲۰	*Staphylococcus epidermidis*

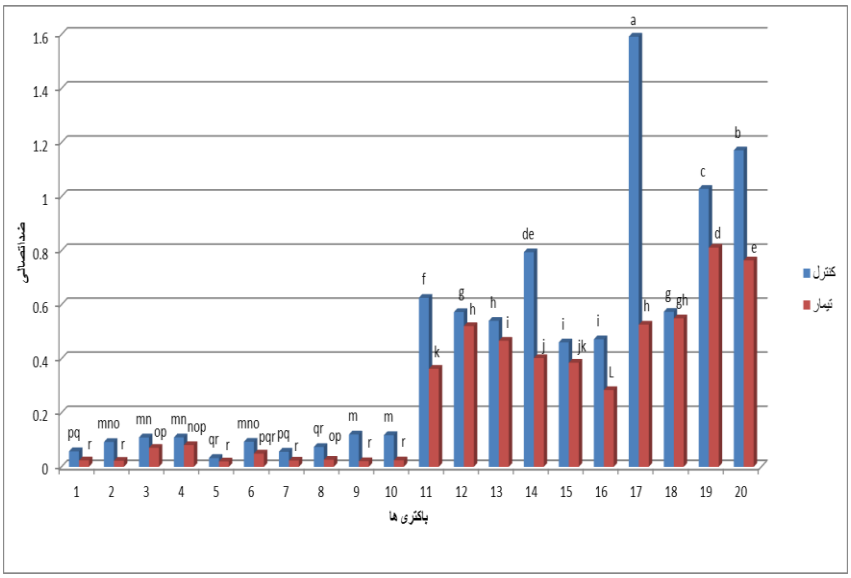
نتایج

جنس و گونه احتمالی باکتری‌ها بر مبنای آزمون‌های بیوشیمیایی انجام گرفته در جدول ۱ آمده است. در نمودار ۱ میانگین جذب نوری نمونه‌های کنترل ، بدون در نظر گرفتن نوع باکتری‌ها و میانگین جذب نوری نمونه‌های تیمارشده با بیوسورفکتانت بدون درنظر گرفتن نوع باکتری‌ها مشاهده می‌شود. کاهش میانگین جذب نوری نمونه‌های تیمارشده نسبت به نمونه‌های کنترل، حاکی از تأثیر ضداتصالی معنی‌دار و مثبت بیوسورفکتانت برروی مجموع باکتری‌های تشکیل-دهنده بیوفیلم می‌باشد.

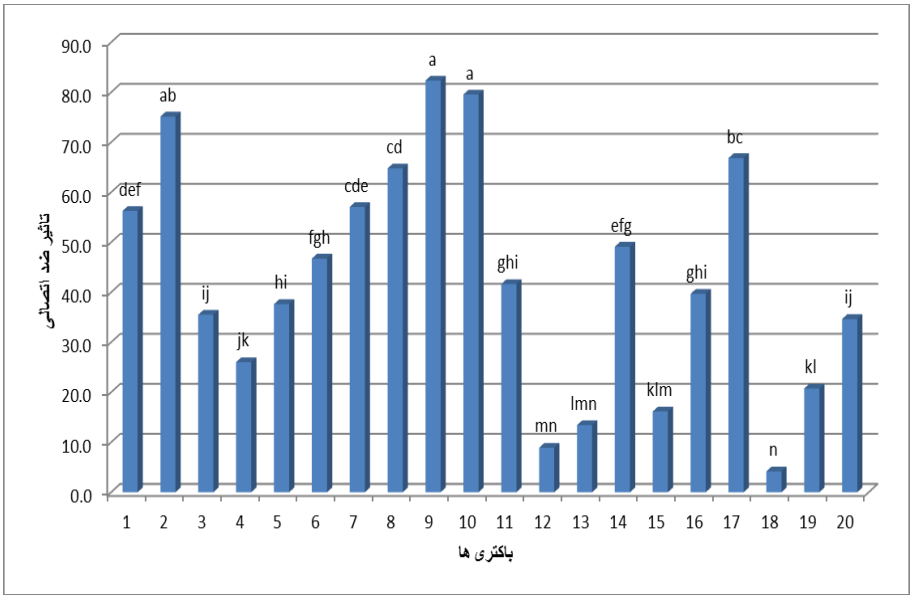


نمودار ۱- اثر ضد اتصالی بیوسورفکتانت در کل باکتری‌ها. عدم یکسانی حروف حاکی از معنی‌داری اختلاف بین کنترل و تمیار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.

به منظور مقایسه میانگین جذب نوری خوانش شده برای تک تک باکتری ها در حالت کنترل و تیمار شده با بیوسورفکتانت، نتایج در نمودار ۲ آورده‌شده‌است. با توجه به نمودار ۲ در تمام موارد فرایند اتصال در حضور بیوسورفکتانت مورد بررسی کاهش معنی‌دار نشان داد به جز در مورد باکتری‌های ۴، ۵ و ۱۸ (*Staphylococcus saprophyticus* و *Staphylococcus aureus*). بیشترین تأثیر ضد-اتصالی نیز بر باکتری ۱۷ (*Listeria monocytogenes*) می‌باشد. در نمودار ۳ درصد ضد-اتصالی بیوسورفکتانت برروی هر یک از باکتری‌ها مشاهده می‌گردد. بیشترین درصد اثر در باکتری ۹ (*Klebsiella pneumonia*) با بیش از ۸۰٪ اثر مثبت و کمترین درصد اثر در باکتری ۱۸ (*Staphylococcus aureus*) با حدود ۴٪ اثر مثبت مشاهده می‌گردد.



نمودار ۲- اثر ضد اتصالی بیوسورفکتانت در تک تک باکتری‌ها. حروف یکسان نشان از عدم اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ می‌باشد.



حروف یکسان نشان از عدم اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ می باشند. نمودار ۳- درصد تأثیر ضداتصالی بیوسورفکتانت در تک تک باکتری‌ها

بحث

شایع‌ترین باکتری‌های تشکیل‌دهنده بیوفیلم در صنعت لبنیات عبارتند از: *Listeria monocytogenes*، *Yersinia*، *Campylobacter*، *Salmonella*، *Shigella*، *Staphylococcus*، *Pseudomonas*، *Escherichia coli*، *Citrobacter*، *Corynebacterium* و *Bacillus* می‌باشد (Masadeh et al., 2013; Gunduz and Tuncel, 2006; Aarnisalo et al., 2007; Anand et al., 2014; Lapidot et al., 2006; Burgess et al., 2014; Teh et al., 2014). در این تحقیق نیز از بیوفیلم تشکیل شده در نقاط مختلف خطوط تولید لبنیات باکتری‌های متعددی (جدول ۱) از جمله

Shigella sonnei، *Shigella boydii*، *Corynebacterium xerosis*، *Staohylococcus saprophvticus*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Aeromonas salmonicida*، *Klebsiella pneumoniae*، *Bacillus circulans*، *Proteus penneri*، *Micrococcus luteus*، *Listeria monocytogenes*، *Staphylococcus aureus* و *Staphylococcus epidermidis* جداسازی شده‌اند. غالب‌ترین باکتری‌های جداسازی شده متعلق به جنس *Staphylococcus*با ۱۹٪ از جمعیت کل می‌باشد. بر-طبق نمودار ۲ بیشترین اختلاف بین میانگین جذب نوری در حالت کنترل (عدم حضور بیوسورفکتانت) و حالت تیمارشده با بیوسورفکتانت در *Listeria monocytogenes* (کد ۱۷) می‌باشد. در این نمودار مشاده می‌گردد که در باکتری‌های *Staohylococcus saprophvticus* و *Staphylococcus aureus* (کد های ۴ و ۵ و کد ۱۸) اختلاف معنی‌داری مابین حالت-های کنترل و تیمارشده با بیوسورفکتانت وجود ندارد. به عبارت دیگر بیشترین اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت *Lactcobacillus rhamnosus* بر باکتری *Listeria monocytogenes* و کمترین اثر ضد اتصالی برباکتری های *Staohylococcus saprophvticus* و *Staphylococcus aureus* می‌باشد که دلیل آن را می توان این گونه بیان کرد که این باکتری‌ها دارای اتصال ضعیف به سطوح بوده و احتمالاً در بیوفیلم تشکیل‌شده در خطوط تولید لبنیات هم به عنوان باکتری‌های اولیه تشکیل‌دهنده بیوفیلم (early coclonizers) مطرح نبوده و تنها از طریق اتصال به باکتری‌های متصل در ساختار بیوفیلم حضور یافته‌اند. مطابق با تحقیقی که در سال ۲۰۱۵ توسط Dwivedi و Singh انجام پذیرفت، مشخص شد که دو ترکیب امبلین و پیپرین دارای تأثیر ضداتصالی برروی ۱۸ سویه *Streptococcus* با توان تشکیل بیوفیلم قوی و متوسط مورد بررسی در آن پژوهش بوده‌اند. نتایج این پژوهش نیز منطبق با آنان می‌باشد. حال آن‌که از محاسن روش مورد استفاده در این تحقیق نسبت به تحقیق Dwivedi و Singh، بیولوژیک بودن بیوسورفکتانت است که به همین دلیل، روش مذکور دارای اثرات سوء بر انسان نمی‌باشد. نتایج تحقیق Kuiper و همکاران نیز اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت لیپوپپتیدی مستخرجه از *Pseudomonas putida* را بر سایر گونه‌های *Pseudomonas* اعلام کرده‌است (۲۰۰۴). هرچند بیوسورفکتانت استفاده‌شده در آن تحقیق استخراج شده از *Pseudomonas putida* است اما نتایج آنان از جنبه تأیید اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت با نتایج این تحقیق هم‌سو می‌باشد. میانگین اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت استفاده‌شده در این پژوهش، ۴۲/۸٪ می‌باشد به بیانی دیگر بیوسورفکتانت *Lactcobacillus rhamnosus* سبب کاهش ۴۲/۸ درصدی اتصال بیوفیلم به سطح شده-است. به‌گونه‌ای که همان‌طور که در نمودار ۳ مشاهده-می‌شود، بیشترین اثر ضداتصالی بیوسورفکتانت بر باکتری *Klebsiella pneumoniae* (کد ۹) با ۸۲/۳٪ کاهش اتصال و کمترین اثر ضدانصالی بر باکتری *Staphylococcus aureus* (کد ۱۸)با ۴/۲٪ کاهش اتصال می‌باشد. Rodrigues و همکاران در سال ۲۰۰۶ (د) از *Streptococcus thermophiles A*، بیوسورفکتانتی استخراج نمودند که به طور مؤثر سبب کاهش فرآیند اتصال باکتریایی می‌گردید، بدین صورت که در حضور بیوسورفکتانت، تعداد سلول‌های انواع

میکرواورگانیسم‌های مورد مطالعه که پس از گذشت ۴ ساعت به سطح متصل شدند، حدود ۹۰٪ کاهش یافت. در نهایت Rodrigues و همکارانش پس از مطالعات گسترده در این زمینه، در سال ۲۰۱۰ اعلام کردند که بیوسورفکتانت‌ها می توانند سبب کاهش اتصال سطحی شوند که نتایج این تحقیق نیز با نتایج تحقیقات آن‌ها منطبق می‌باشد. در باکتری‌های کد ۱، ۳، ۱۱ و ۱۵ که همگی *Shigella sonnei* می‌باشند با درصد ضد اتصالی متفاوتی از بیوسورفکتانت مواجه هستیم که این امر را می‌توان ناشی از متفاوت بودن سویه‌های مورد بررسی دانست. از جمله عوامل مؤثر بر این موضوع، مکان جداسازی اولیه باکتری تشکیل‌دهنده بیوفیلم از خط لبنی نیز می‌تواند به‌شمار آید. همچنین تعداد کشت‌های انجام شده به منظور خالص‌سازی هر کدام از باکتری‌ها می تواند خصوصیات باکتری‌ها را تحت‌الشعاع قرار دهد. علاوه بر این کلونیزاسیون باکتری‌ها نیز براین موضع اثر بخش است چه‌بسا که کلونیزه بودن اول تا ثانویه بر روی خصوصیات باکتری تأثیر معنی‌دار داشته باشد. به‌طوری که باکتری‌هایی با قدرت اتصال بیشتر، می‌توانند کلونایزرهای اولیه بوده و در صورتی که قدرت اتصال کمتر باشد به جای اتصال به سطح به باکتری-های ریز اتصال یابند (کلونایزرهای ثانویه). در سال ۲۰۱۵، Nan و همکاران با روشی فیزیکی، سبب کنترل اتصال *Staphylococcus aureus* بر خطوط استیلی شدند، بدین صورت که در ساختار آلیاژی استیل ضد-زنگ، عنصر مس دو ظرفیتی را افزودند. هرچند نتایج تحقیقات آنان مثبت بود اما در مقایسه با سایر روش های کنترل بیوفیلم کارآمد نمی‌باشند چرا که این امر لازمه تغییر کامل خطوط تولید استیل در صنایع غذایی و جایگزینی آن‌ها با آلیاژ جدید می‌باشد که از نظر اقتصادی به‌صرفه نمی‌باشد. حال آن‌که در صورت استفاده از بیوسورفکتانت‌ها تنها لازم است این ترکیبات در طی فرآیند CIP به خط تولید وارد گردند.طهمورث‌پور (۱۳۸۷) نیز بیان داشت که بیوسورفکتانت حاصل از *Lactcobacillus rhamnosus*، *Lactobacillus fermentum* و *Lactobacillus acidophilus*، هر سه دارای قابلیت ضداتصالی بر روی *Streptococcus mutans* و *non-mutans* می‌باشد. همچنین او اظهار داشت که از بین این سه بیوسورفکتانت، بیوسورفکتانت *Lactobacillus fermentum* بیشترین تأثیر ضدانصالی را داشته‌است.از آن‌جایی که میکروارگانیسم‌های موجود در بیوفیلم مشکلات متعددی در طول فرآیند تولید و هم‌چنین محصول نهایی ایجاد می‌کنند، کنترل و حذف آن‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد، به عنوان مثال؛ بیوفیلم‌ها کاتالیزور واکنش‌های شیمیایی و میکروبی بوده و منجر به خوردگی در سیستم‌های لوله‌کشی و مخازن هستند. هم‌چنین اگر بیوفیلم تشکیل‌شده در صفحات مبدل حرارتی و لوله‌کشی‌ها، ضخیم شده‌باشند، می‌توانند سبب کاهش انتقال حرارت مؤثر باشند (Simo'es et al., 2010). باکتری‌های بیوفیلم حتی پس از انجام اصول بهداشتی خطوط تولید سبب آلودگی و فساد محصولات می‌گردند (Fouladynezhad et al., 2013). همان‌طورکه بیان گشت، در این تحقیق از بیوسورفکتانت استخراج شده از ATCC 7469 *Lactcobacillus rhamnosus* استفاده شد که نتایج، حاکی از اثر ضداتصالی بر باکتری‌های مورد بررسی می-باشد به‌گونه‌ای که در نمودار ۱ مشاهده می‌گردد، میانگین جذب نوری چاهک‌های شاهد و کنترل دارای اختلاف معنی‌دار آماری (Pvalue< 0.05) می‌باشند. براین اساس در حالت تیمار نسبت به کنترل، فرآیند اتصال، ۳۸/۲ درصد کاهش نشان می‌دهد. از آن‌جایی

که حذف بیوفیلم با روش‌های فیزیکی مشکل بوده و با روش‌های شیمیایی نیز مضرات انسانی دارد لذا بهتر است از فرآیند تشکیل آن در خطوط تولید با روش‌های بیولوژیکی ممانعت به عمل آورد و از آن‌جایی که فرآیند اتصال به عنوان اولین مرحله تشکیل بیوفیلم می‌باشد، با استفاده از ترکیباتی با خاصیت ضداتصالی مثل بیوسورفکتانت‌ها می‌توان میزان تشکیل بیوفیلم را کاهش داد. استفاده ازبیوسورفکتانت‌ها به سبب ایجاد اختلال در تشکیل بیوفیلم و کاهش چسبندگی بیوفیلم باکتریایی، در ترکیب با آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند نشان دهنده یک استراتژی جدید ضدمیکروبی باشد. به‌طور کلی، آنتی‌بیوتیک‌ها به تنهایی در برابر بیوفیلم‌ها نسبت به سلول‌های پلانکتونی کمتر مؤثر هستند. حال آن‌که بیوسورفکتانت‌ها باعث اختلال در بیوفیلم شده و در نتیجه دسترسی آنتی‌بیوتیک به سلول را تسهیل میکنند (Irie et al., 2005).

منابع

۱. طهمورث پور، آرزو. (۱۳۷۸). تأثیر تعدادی از متابولیت های ثانویه و پروبیوتیک ها در تشکیل بیوفیلم و خصوصیات برخی از باکتری های بیماری زای دندان .پایان نامه دکتری، دانشکده زیست شناسی دانشگاه علوم تحقیقات تهران.

2. Aarnisalo, K., Lundén, J., Korkeala, H., and Wirtanen, G. 2007. Susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains to disinfectants and chlorinated alkaline cleaners at cold temperatures. LWT-Food Sci Technol. 40(6):1041-1048.
3. Adetunji, V.O., Adedeji, A.O., and Kwaga, J. 2014. Assessment of the contamination potentials of some foodborne bacteria in biofilms for food products. Asian Pacific J Tropical Medicine. 7:S232-S7.
4. Ajdić, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savić, G., Chang, J., Carson, M.B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., and Jia, H. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Nati Acad Sci. 99(22):14434-14439.
5. Anan, S., Singh, D., Avadhanula, M., and Marka, S. 2014. Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. Comp Rev Food Sci Food Safety. 13(1):18-33.
6. Burgess, S.A., Lindsay, D., and Flint, S.H. 2014. Biofilms of *Thermophilic Bacilli* Isolated from Dairy Processing Plants and Efficacy of Sanitizers. Methods Mol Biol. 1147:367-377.
7. Busscher, H., Van der Kuijl-Booij, M., and Van der Mei, H. 1996. Biosurfactants from thermophilic dairy *streptococci* and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates. J Industrial Microbiol. 16(1):15-21.
8. Chen, J., Rossman, M.L., and Pawar, D.M. 2007. Attachment of enterohemorrhagic *Escherichia coli* to the surface of beef and a culture medium. LWT-Food Sci Technol. 40(2):249-254.
9. Coa, X.H., Liao, Z.Y., Wang, C.L., Yang, W.Y., and Lu, M.F. 2009. Evaluation of a lipopeptide

biosurfactant from *Bacillus natto* TK-1 as a potential source of anti-adhesive, antimicrobial and antitumor activities. Braz J Microbiol, 40(2): 373-379.

10. Dogan, B., and Boor, K.J. 2003. Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. Appl Enviro Microbiol. 69(1):130-138.
11. Dwivedi, D., and Singh, V. 2015. Effects of the natural compounds embelin and piperine on the biofilm-producing property of *Streptococcus mutans*. J Traditional and Complementary Medicine.
12. Fouladynezhad, N., Afsah-Hejri, L., Rukayadi, Y., Nakaguchi, Y., Nishibuchi, M., and Son, R. 2013. Efficiency of four Malaysian commercial disinfectants on removing *Listeria monocytogenes* biofilm Int Food Res J. 20(3):1485-1490.
13. Frank, J.F., Ehlers, J., and Wicker, L. 2003. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. J Food Protect Trend. 23(8).
14. Gram, L., Bagge-Ravn, D., Ng, Y.Y., Gymoese, P., and Vogel, B.F. 2007. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. Food control. 18(10):1165-1171.
15. Gunduz, G.T., and Tuncel, G. 2006. Biofilm formation in an ice cream plant. Antonie van Leeuwenhoek. 89(3-4):329-336.
16. Irie, Y., O'toole, G.A., and Yuk, M.H. 2005. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse Bordetella bronchiseptica biofilms. FEMS Microbiol Lett. 250(2):237-243.
17. Irie, Y., and Parsek, M. 2008. Quorum sensing and microbial biofilms. J Bacterial biofilms, 67-84.
18. Jessen, B., and Lammert, L. 2003. Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int Biodeter Biodegr. 51(4):265-269.
19. Kafil, H.S., and Mobarez, A.M. 2015. Assessment of biofilm formation by *Enterococci* isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. J King Saud Uni-Sci.
20. Kuiper, I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E., Thomas-Oates, J.E., and Bloemberg, G.B. 2004. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin I and II, which inhibit biofilm formation and break down existing biofilms. J Mol Microbiol. 51(1):97-113.
21. Lapidot, A., Romling, U., and Yaron, S. 2006. Biofilm formation and the survival of *Salmonella Typhimurium* on parsley. Int J Food Microbiol. 109(3):229-233.
22. Lehner, A., Riedel, K., Eberl, L., Breeuwer, P., Diep, B., and Stephan, R. 2005. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: aspects promoting environmental

spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. J Appl Microbiol Biotechnol. 83(3):541-553.

29. Rodrigues, L., Van der Mei, H.C., Banat, I.M., Teixeira, J., and Oliveira, R. 2006. Inhibition of microbial adhesion to silicone rubber treated with biosurfactant from *Streptococcus thermophilus* A. J FEMS Immunol Medical Microbiol. 46(1):107-12.
30. Rodrigues, L.B., Santos, L.Rd., Tagliari, V.Z., Rizzo, N.N., Trenhago, G., Oliveira, A.Pd., Goetz, F., and Nascimento, V.P.D. 2010. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. Braz J Microbiol. 41(4):1082-1085.
31. Rzhepishevska, O., Hakobyan, S., Ekstrand-Hammarström, B., Nygren, Y., Karlsson, T., Bucht, A., Elofsson, M., Boily, J.F., and Ramstedt, M. 2014. The gallium (III)–salicylidene acylhydrazide complex shows synergistic anti-biofilm effect and inhibits toxin production by *Pseudomonas aeruginosa*. J Inorg Biochem. 138:1-8.
32. Simoes, M., Simoes, L.C., and Vieira, M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT-Food Sci Technol. 43(4):573-583.
33. Singh, P., and Cameotra, S.S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. TRENDS Biotechnol. 22(3):142-146.

persistence. J Food Protec. 68(11):2287-2294.

23. Masadeh, M.M., Mhaidat, N.M., Alzoubi, K.H., Hussein, E.I., and Al-Trad, EI. 2013. In vitro determination of the antibiotic susceptibility of biofilm-forming Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus*: possible role of proteolytic activity and membrane lipopolysaccharide. Inf Drug Res.6:27-32.
24. Mireles, J.R., Toguchi, A., and Harshey, R.M. 2001. *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium swarming mutants* with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. J Bacteriol. 183(20):5848-5854.
25. Muthukumaran, S., Kentish, S., Lalchandani, S., Ashokkumar, M., Mawson, R., Stevens, G.W., and Grieser, F. 2005. The optimisation of ultrasonic cleaning procedures for dairy fouled ultrafiltration membranes. Ultrason Sonochem. 12(1):29-35.
26. Nan, L., Yang, K., and Ren, G. 2015. Anti-biofilm formation of a novel stainless steel against *Staphylococcus aureus*. J Mater Sci Eng. 51:356-361.
27. Oliver, S.P., Jayarao, B.M., and Almeida, R.A. 2005. Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications. J Foodborne Pathog Dis. 2(2):115-129.
28. Rivardo, F., Turner, R., Allegrone, G., Ceri, H., and Martinotti, M. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus*

34. Somers, E.B., and Wong, A.C.L. 2004. Efficacy of two cleaning and sanitizing combinations on *Listeria monocytogenes* biofilms formed at low temperature on a variety of materials in the presence of ready-to-eat meat residue. J Food Protect. 67(10):2218-2229.
35. Srey, S., Jahid, I.K., and Ha, S.D. 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. J Food Control. 31(2):572-585.
36. Tahmourespour, A., Salehi, R., and Kermanshahi, R.K. 2011. *Lactobacillus acidophilus-derived* biosurfactant effect on gtfB and gtfC expression level in *Streptococcus mutans* biofilm cells. Braz J Microbiol. 42(1):330-339.
37. The, K.H., Flint, S., Palmer, J., Andrewes, P., Bremer, P., and Lindsay, D. 2014. Biofilm− An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products?. Int Dairy J. 34(1):32-40.

Anti-adhesively effect of bio-surfactant from *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on the isolated bacteria from the pasteurized milk production line

Vaezi SS, Tahmourespour A

1. Young Researchers and Elite Club, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.
2. Department of Basic Medical Sciences, Isfahan (Khorasgan) Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran.

***Corresponding author:** *ssvaezi@ymail.com*

Received: 24 April 2016 Accepted: 19 October 2016

Abstract

Many bacteria possess the ability to connect to surfaces that this ability to "biofilm" is called. Biofilms attached to the food industry for the production of many problems in the production line and the final product is therefore necessary to examine methods of controlling them. In this study, the bacterial biofilm from the inner part of pasteurized milk production line from one factory in Isfahan were isolated, purified and identified (by biochemical tests). After that, bio-surfactant was extracted from *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Then the anti-adhesively effect of bio-surfactant was performed by micro-titer-plate method and optical density was read with ELISA Reader. Finally, data factorial analysis of variance to test and comparison of means were analyzed method LSD at 5%. Results showed *Staphylococcus* was the most predominant isolated genus with 19% of the whole population. Also the average of anti-adhesively effect of bio-surfactants used in this study is 42.8%. The highest effect of bio-surfactants was on *Klebsiella pneumonia* with 82.3% for reducing connection and the least effect was on *Staphylococcus aureus* with 4.2% for reducing connection. However, due to the positive anti-adhesively effect of bio-surfactant, use it in the production line during the CIP process is recommended.

Keywords: Biofilm, Bio-surfactant, Anti-adhesively, Bacteria, Optical density.