

بررسی توانایی ایجاد بیوفیلم از سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی

تاریخ دریافت مقاله: ۹۶/۵/۴؛ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱

چکیده

مقدمه: بیماری‌های حاصل از غذا همیشه تهدیدی برای سلامتی انسان بوده است و در سراسر جهان به‌عنوان یک موضوع اورژانسی و مهم مورد توجه می‌باشد. بسیاری از طغیان‌ها در ارتباط با بیوفیلم‌ها بوده‌اند. علاوه بر این، مشخص شده است که بیوفیلم به‌عنوان یک مشکل در صنایع غذایی است، زیرا به‌سرعت نسبت به عوامل آنتی‌میکروبیال و پاک‌کننده مقاومت می‌یابد. تشکیل بیوفیلم یکی از عوامل بیماری‌زایی باکتری سالمونلا به‌ویژه در صنایع غذایی محسوب می‌شود که به باکتری امکان اتصال به سطوح مختلف را می‌دهد. این مطالعه باهدف بررسی توانایی ایجاد بیوفیلم از سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۸ جدایه (isolate) سالمونلا که از ۴۰۰ نمونه گوشت قرمز، مرغ، تخم‌مرغ و سبزی جدا شده و با تست‌های بیوشیمیایی اختصاصی و سروتایپینگ تعیین هویت شدند، توانمندی آن‌ها در ایجاد بیوفیلم با استفاده از روش تیتراسیون در میکروپلیت کریستال ویوله سنجیده شد.

یافته‌ها: در بررسی فنوتیپی از میان جدایه‌های سالمونلا با روش کدورت سنجی در طول موج ۵۵۰ نانومتر و بدون اسیداستیک، فقط ۲ جدایه (۲۵٪) توانایی ایجاد بیوفیلم مشاهده شد، که هر دوسویه متعلق به گروه D سالمونلا بودند. **نتیجه‌گیری:** با توجه به توانایی ایجاد بیوفیلم سالمونلاهای جدا شده از مواد غذایی و گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی آن‌ها و از طرف دیگر افزایش روزافزون گاستروانتریت‌های غذایی ناشی از سالمونلا علی‌الخصوص سروگروپ D، لزوم مراقبت بیشتر و رعایت سطح بالاتر بهداشت در تهیه، تولید، بسته‌بندی و عرضه مواد غذایی در سطح جامعه به نظر می‌رسد.

کلمات کلیدی: سالمونلا، بیوفیلم، بیماری‌های منتقله از غذا

ابوالفضل سبیردانی^۱، محمدمهدی سلطان دلال^{۲*}

^۱ کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، دامغان، ایران
^۲ استاد، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی/بخش باکتری‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران

*نویسنده مسئول:

مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی/بخش میکروبی‌شناسی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۰۲۱-۸۸۹۹۲۹۷۱

E-mail: msoltandallal@gmail.com

مقدمه

از آنجا که اطلاعات اندکی در رابطه با تشکیل بیوفیلم سالمونلا فرآورده های غذایی در کشورمان وجود داشت، هدف از این تحقیق، بررسی تشکیل بیوفیلم سروتیپ های سالمونلا با منشأ غذایی بود.

مواد و روش کار

تعداد ۸ جدایه سالمونلا که از ۴۰۰ نمونه گوشت قرمز، مرغ، تخم مرغ و سبزی جدا شده و با تستهای بیوشیمیایی اختصاصی و سروتایپینگ تعیین هویت شدند، جهت بررسی مقاومت آنتی بیوتیکی بر اساس لیست آنتی بیوتیک های مجاز در CLSI^{۱۱} برای سالمونلا به روش کربسی بائر (دیسک دیفیوژن) و برای آنتی بیوتیک های سپروفلوکساسین، سفنازیدیم، کوتریموکسازول، نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، آموکسی سیلین، مروپنم، ایمپنم، کلرامفنیکل، سفتریاکسون، سفوتاکسیم، استرپتومایسین، سفپیپیم و سفوروکسیم انجام گرفت.

تست توانایی ایجاد بیوفیلم با استفاده از روش تیتراسیون در

میکروپلیت

بررسی توانایی ایجاد بیوفیلم با استفاده از روش تیتراسیون در میکروپلیت بر اساس دستورالعمل بکار رفته توسط پیترز و همکاران در سال ۲۰۰۸ انجام گرفت.^{۱۲} پس از کشت در محیط آبگوشت TSB یک شبانه روز در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. پس از رقیق سازی در محیط TSB تازه میزان ۱۵۰ ماکرولیتر از این سوپانسیون سلولی در میکروپلیت های پلی استیرن ۹۶ خانه ای ریخته شد. پس از اینکه ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت به آرامی سه مرتبه توسط ۲۰۰ میکرولیتر PBS شسته و به صورت وارونه قرار داده شد تا پلیت خشک گردد. جهت فیکس کردن بیوفیلم ها از متانول ۹۹ درصد به میزان ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید و پس از ۱۵ دقیقه الکل خارج و پلیت در هوا خشک گردید. به تمام خانه ها ۱۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال و بوله ۲٪ اضافه شده و پس از ۲۰ دقیقه پلیت ها با آب شسته شدند تا رنگ اضافی از گوده ها خارج شود. سپس رنگ های باند شده با اضافه کردن ۱۵۰ میکرولیتر از اسیداستیک ۳۳٪ آزاد شد. جذب نوری (OD) هریک از خانه ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر با استفاده از الیزا

سالمونلا اینترتیدیس یک پاتوژن مهم منتقله از غذا می باشد، که اغلب از طریق مواد غذایی آلوده به انسان منتقل و باعث ایجاد بیماری می شود. ابتلا به سالمونلوزیس غیر تیفوئیدی در آمریکا ۱/۴ میلیون نفر در سال گزارش شده است که بیش از ۹۵٪ از این موارد، بیماری های با منشأ غذایی هستند. ۳۰٪ از این عفونت های غذایی منجر به مرگ می شوند. مطالعات مختلف، توانایی بالای این باکتری را برای اتصال و تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف نشان داده اند.^{۱۳}

بیوفیلم ساختاری متشکل از یک جمعیت باکتریایی است که به وسیله یک ماتریکس آگرو پلی مری تولید شده توسط باکتری محصور شده است. این ویژگی به باکتری توانایی اتصال به سطوح مختلف و همچنین افزایش مقاومت ذاتی به آنتی بیوتیک ها را می دهد.^۳ تشکیل بیوفیلم، حساسیت به درمان های ضد میکروبی را کاهش می دهد که نهایتاً هزینه های درمانی بالایی برای بیماران به دنبال خواهد داشت.^۴

آلودگی مواد غذایی در خط تولید از طریق سطوح غیر بهداشتی، یکی از مشکلات اساسی و متداول در کارخانجات فرآوری غذا است. سطوحی که به طور ناصحیح پاک سازی شده و دارای پس مانده غذایی هستند محیط مناسبی برای اتصال، رشد و تکثیر باکتری های مولد فساد و پاتوژن و در نتیجه تشکیل بیوفیلم می باشند. عبور محصول فرآیند شده از روی سطوح آلوده باعث ایجاد آلودگی میکروبی آن می شود.^{۵،۶}

رشد باکتری ها به حالت بیوفیلم روی سطوح، انتقال آن ها را آسان تر و از بین بردنشان را مشکل می کند. زیرا سلول های بیوفیلم در مقایسه با سلول های آزاد، در مقابله با بیوسایدها و ضد عفونی کننده ها مقاومت بیشتری نشان می دهند.^{۷،۸}

رشد بیوفیلم ها روی تجهیزات فرآوری غذا، باعث ایجاد آلودگی میکروبی در محصول فرآیند شده و در نتیجه منجر به کاهش مدت زمان نگهداری محصول و افزایش شیوع بیماری های ناشی از غذا به ویژه مربوط به لیستریامونوسیتوز و سالمونلا می شود. این بیوفیلم ها شامل میکروارگانیسم های مولد فساد یا پاتوژن هستند.^{۹،۱۰}

سیپروفلوکساسین و سفوروکسیم هر کدام ۲ جدایه (۵۰٪) و به بقیه آنتی بیوتیک ها ۱۰۰٪ حساسیت نشان دادند. سالمونلای سرگروپ A به سفوروکسیم و نالیدیکسیک اسید حالت بینابینی و به بقیه دیسک های بکار گرفته شده حساسیت داشتند.

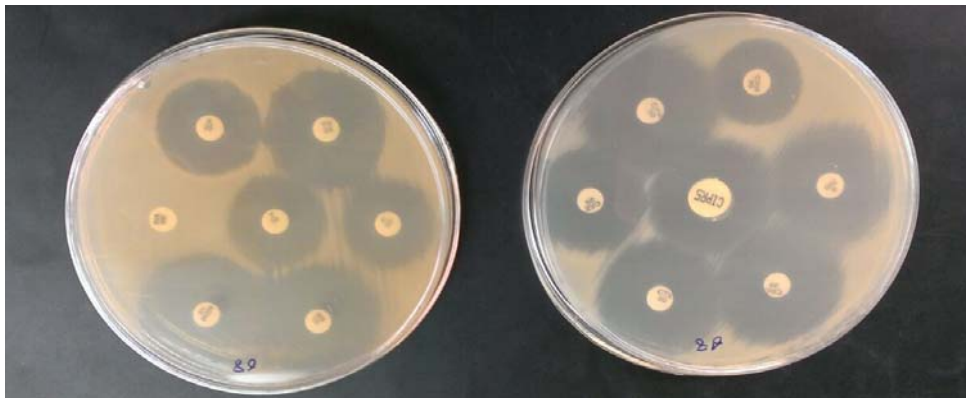
سالمونلای سرگروپ B به دیسک های نالیدیکسیک اسید، تتراسیکلین، کوتریموکسازول و آموکسی سیلین مقاومت و به مابقی دیسک های آنتی بیوتیک حساسیت کامل داشتند. سالمونلای سرگروپ C به نالیدیکسیک اسید و تتراسیکلین مقاوم، به سیپروفلوکساسین بینابینی و به مابقی دیسک ها حساس بود.

سالمونلای non-type به همگی آنتی بیوتیک ها حساسیت ۱۰۰٪ نشان دادند (شکل ۱). از هشت سالمونلای جدا شده، دو جدایه توانایی ایجاد بیوفیلم را دارا بودند که هر دو جدایه متعلق به سرگروپ D می باشند (شکل ۲).

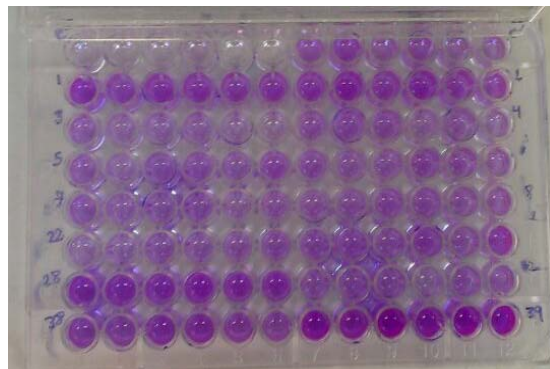
ریدر اندازه گیری شد. تمامی اندازه گیری ها به صورت ۴ تایی و در سه آزمایش جداگانه تکرار گردید. در بررسی تست توانایی ایجاد بیوفیلم، *E. coli* Top 10 به عنوان سویه کنترل منفی و *E. coli* EAEC 042 به عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

نتایج

در تست حساسیت جدایه های سالمونلا، بیشترین مقاومت سالمونلا به دیسک نالیدیکسیک اسید ۶ جدایه (۷۵٪)، بیشترین حالت بینابینی به دیسک سیپروفلوکساسین و سفوروکسیم هر کدام ۳ جدایه (۳۷/۵٪) و حساسیت کامل ۸ جدایه (۱۰۰٪) به آنتی بیوتیک های کلرآمفنیکل، ایمپی پنم، مروپنم، سفتریاکسون، سفپیپیم، استرپتومايسين، سفوتاکسیم و سفنازیدیم دیده شد. سالمونلا های سرگروپ D بیشترین مقاومت را به نالیدیکسیک اسید (۱۰۰٪)، بیشترین حالت بینابینی را به



شکل ۱: تست حساسیت آنتی بیوتیکی سالمونلا های مورد مطالعه



شکل ۲: توانایی ایجاد بیوفیلم توسط سالمونلاهای مورد مطالعه

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه ما ۲(۲۵٪) جدایه از ۸ جدایه سالمونلا به دست آمده از مواد غذایی توانایی ایجاد بیوفیلم را در سطح بالایی دارا بودند، در صورتی که مطالعه انجام شده در سال ۲۰۱۵ توسط ایزوکن و همکارش بر روی سالمونلاهای جدا شده از کلم و اسفناج ۲۱/۵٪ از جدایه های سالمونلا توانایی ایجاد بیوفیلم را داشتند که این مسئله افزایش توانایی بیوفیلم در کشور ما می‌تواند معضلی در روند درمانی و پاسخ به درمان علی‌الخصوص درمان آنتی‌بیوتیکی به وجود بیاورد.^{۱۳} در مطالعه ژیانمینگ و همکارش در سال ۲۰۰۹ بر روی توانایی ایجاد بیوفیلم توسط باکتری‌های جدا شده از مواد غذایی هیچ سالمونلایی که توانایی ایجاد بیوفیلم را در مواد مختلف غذای مورد آزمایش داشته باشد پیدا نکرده‌اند و این نتیجه با مطالعه حاضر ما تفاوت بسیاری دارد.^{۱۴} یونادیس و همکاران در سال ۲۰۱۳ در یونان ۱۹۴ جدایه سالمونلا انتریکا متعلق به ۱۹ سروتیپ مختلف از کودکان مبتلا به اسهال را از لحاظ وجود ۶ ژن فاکتورهای حدت و ارتباط آن‌ها با تشکیل بیوفیلم و مقاومت آنتی‌بیوتیکی مورد مطالعه قرار دادند. در این مطالعه شایع‌ترین سروتیپ سالمونلا انتریتیدیس و سپس سالمونلا تیغی موریوم بود. ۵۶ درصد جدایه‌ها از لحاظ تشکیل بیوفیلم مثبت بودند.^{۱۵} نیز و همکاران در سال ۲۰۱۵ در آلمان ۴۰ جدایه سالمونلا ایزوله شده از منابع مختلف انسانی، غذایی و محیطی از لحاظ تولید بیوفیلم با استفاده از روش میکروپلیت مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه فراوان‌ترین سروتیپ سالمونلا انتریتیدیس بود. ۸۵ درصد جدایه‌ها بیوفیلم تولید کردند. در حدود ۶۷/۵ درصد به عنوان تولیدکننده ضعیف بیوفیلم بودند و ۱۷/۵ تولیدکننده متوسط بیوفیلم بودند.^{۱۶} سالمونلا انتریتیدیس شایع‌ترین عامل گاستروانتریت سالمونلایی است که در صورت عدم درمان مناسب می‌تواند منجر به مرگ و میر بالایی گردد. توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه های سالمونلا انتریتیدیس، در شرایط نامناسب تغذیه ای نظیر استرس اسموتیک، فشار و PH نامناسب جزئی از سیکل زندگی این باکتری بوده که منجر به بقای

باکتری و گسترش عفونت در داخل بدن میزبان و محیط می‌گردد. این خصوصیت فنوتیپی می‌تواند در افزایش تهاجم جدایه های سالمونلا انتریتیدیس و حدت آن نقش داشته باشد. درصد قابل توجهی از مقاومت دارویی بالینی و متعاقباً شکست در درمان با تشکیل بیوفیلم مرتبط می‌باشد.^{۱۷} روند استفاده نادرست و بی‌رویه از آنتی‌باکتریال‌ها در واحدهای دامپزشکی و غذایی به دوراز ارزیابی دقیق از حساسیت باکتریایی منجر به گسترش مقاومت داروهای ضد میکروبی و متعاقباً مقاومت دارویی در انسان به دلیل اثرات باقی‌مانده دارویی در فرآورده‌های غذایی می‌گردد. بطوری‌که این مسئله باعث پیدایش سویه‌هایی از سالمونلا با مقاومت چندگانه شده است. مطالعات مختلف، توانایی بالای این باکتری را برای اتصال و تشکیل بیوفیلم روی سطوح مختلف نشان داده‌اند.^{۱۸} در صنایع غذایی، اتصال باکتری‌های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرایندهای تولید و بسته‌بندی آن‌ها و سرانجام، تشکیل بیوفیلم‌های میکروبی، می‌تواند منبع بالقوه آلودگی محصولات و فرآورده‌های غذایی و انتقال بیماری‌ها باشد.^{۱۹} 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 ضد عفونی‌کننده‌ها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. سالمونلا یک پاتوژن مهم منتقله از غذا می‌باشد، اتصال باکتری‌ها به یکدیگر و تشکیل بیوفیلم در محیط‌های پردازش مواد غذایی منجر به تولید منابع بالقوه از آلودگی شده که می‌تواند باعث انتقال و گسترش بیماری گردد.

تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه بخشی از گرنت تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره قرارداد ۳۲۴۱۴ می‌باشد. بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تهران که حامی مالی این طرح تحقیقاتی می‌باشند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داریم.

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. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes & susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res. 2012; 135(3): 389-96.
4. Atshan SS, Nor Shamsudin M, Sekawi Z, Lung LTT, Hamat RA, Karunanidhi A, et al. Prevalence of adhesion and regulation of biofilm-related genes in different clones of *Staphylococcus aureus*. Biomed Res Int. 2012;2012:976972. doi: 10.1155/2012/976972.
5. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. J Appl Microbiol. 2010;109(4):1117-31.
6. Palmer J, Flint S, Brooks J. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. J Ind Microbiol Biotechnol. 2007;34(9):577-88.
7. Bryers JD. BiofilmsII: process analysis and application. New York, John Wiley and Sons; 2000; 327-360.
8. Bae YM, Baek SY, Lee SY. Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. Int J Food Microbiol. 2012 15;153(3):465-73.
9. Wu Y, Park KC, Choi BG, Park JH, Yoon KS. The Antibiofilm Effect of Ginkgo biloba Extract Against *Salmonella* and *Listeria* Isolates from Poultry. Foodborne Pathog Dis. 2016;13(5):229-38.
10. Chen D, Zhao T, Doyle MP. Control of pathogens in biofilms on the surface of stainless steel by levulinic acid plus sodium dodecyl sulfate. Int J Food Microbiol. 2015; 207:1-7.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 25th informational supplement. M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015; Vol35.No3.
12. Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. J Microbiol Methods. 2008;72(2):157-65.
13. Igbinsola IH. Biofilm formation of *Salmonella* species isolated from fresh cabbage and spinach. J Appl Sci Environ. 2015; 19 (1) 45-50.
14. Xianming Shi, Xinna Zhu. Biofilm formation and food safety in food industries, Trend Food Sci Tech: 2009; 20(9)407-413.
15. Ioannidis A, Papavasileiou K, Papavasileiou E, Bersimis S, Chatzipanagiotou S. Distribution of six effector protein virulence genes among *Salmonella enterica enterica* serovars isolated from children and their correlation with biofilm formation and antimicrobial resistance. Mol Diagn Ther. 2013;17(5):311-7.
16. Nair A, Rawool DB, Doijad S, Poharkar K, Mohan V, Barbudhe SB, et al. Biofilm formation and genetic diversity of *Salmonella* isolates recovered from clinical, food, poultry and environmental sources. Infect Genet Evol. 2015;36:424-433.
17. Latasa C, Roux A, Toledo-Arana A, Ghigo JM, Gamazo C, Penadés JR, et al. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. Mol microbiol. 2005;58(5):1322-39.
18. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. J Anim Sci. 2008;86(14 Suppl):E173-87.
19. Wang H, Ding S, Wang G, Xu X, Zhou G. In situ characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. Int J Food Microbiol. 2013;167(3):293-302.

Abolfazl Sirdani¹, Mohammad Mehdi Soltan Dallal^{2*}

¹ Department of Microbiology, Faculty of Life Sciences, Islamic Azad University of Damghan, Damghan, Iran

² Food Microbiology Research Center / Division of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Investigating the Ability of Producing Biofilm by Isolated *Salmonella* from Food

Received: 26 Jul. 2017 ; Accepted: 23 Oct. 2018

Abstract

Introduction: Food-borne disease has always been a threat to human health and is considered as a matter of urgency worldwide. Many outbreaks have been associated with biofilms. In addition, Biofilm has been considered as a problem in the food industry because of quick resistance to anti-microbial and cleansing agents. Biofilm formation cause pathogenic effect in *Salmonella*, especially in the food industry, which allows bacteria to bind to different surface. The aim of this study was to investigate the ability of producing biofilm by isolated *Salmonella* from food

Materials and Methods: Eight *Salmonella* isolated from 400 samples of red meat, chicken, egg and vegetable were identified by conventional biochemical and serotype tests. Their ability to produce biofilm was measured using titration method in microplate crystal violet.

Results: In the phenotypic study of *Salmonella* isolates with 550 nm doping control method and without acetic acid, only 2 isolates (25%) had the ability to produce biofilm, both of which belong to the group D of *Salmonella*.

Conclusion: Considering the ability to create biofilms of *Salmonella* isolated from food and increasing their antibiotic resistance, and increasing gastroenteritis caused by *Salmonella*, especially serogroup D, more care and higher levels of health in the provision, production, food packaging and delivery are required.

Keywords: *Salmonella*, Biofilm, Food-borne diseases

***Corresponding Author:**

Food Microbiology Research Center / Division of Food Microbiology, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Tel: 021-88992971

E-mail: msoltandallal@gmail.com