بررسی مدل ریاضی تأثیر بیوساید بر بیوفیلم جدا شده از سیستم خنک کننده به روش میکروتیتر پلیت

شهریار شاکری[۱] روحا کسری کرمانشاهی[۲]

گیتی امتیازی [۲]

(دریافت ۸۴/۱/۲۰ پذیرش ۸۴/۴/۱۷)

چکیده

حضور فیزیکی سلولهای باکتری بر روی فلزات و سطح آنها و فعالیت‌های متابولیکی آنها می‌تواند سبب خوردگی میکروبی شود. در حقیقت، هر عاملی که بتواند ضخامت بیوفیلم را کاهش دهد و یا آن را حذف کند، می‌تواند خوردگی را نیز کاهش دهد. بیوسایدها یکی از این عوامل هستند که می‌توانند بیوفیلم را کنترل کنند. این مواد می‌توانند به داخل بیوفیلم نفوذ کنند و در نتیجه سبب حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای درون آن شوند. هدف این تحقیق بررسی مدل ریاضی ترمودینامیکی نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت می‌باشد. در این تحقیق بعد از جداسازی باکتریهای بیوفیلم ، بیوفیلم مخلوط تشکیل شد و سپس اثر بیوسایدها بر روی آن توسط روش میکروتیترپلیت بررسی شد. در نهایت مقایسهٔ نتایج حاصل از این روش با مدل ریاضی نشان داد که اثر بیوسایدهای اکسید کننده مثل هیپوکلریت سدیم و هیدروژن پراکساید بر روی بیوفیلم با این مدل سازگاری دارد. یعنی با افزایش غلظت بیوساید میزان حذف بیوفیلم و کشته شدن سلولهای درون آن افزایش می‌یابد. ولی کارآیی بیوسایدهای غیر اکسیدکننده مثل سولفاتیازول، گلوتارآلدهید و آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید با این مدل سازگاری ندارد و با افزایش غلظت این بیوساید ها هیچ تغییری در حذف بیوفیلم و یا کشته شدن سلولها مشاهده نمی‌شود.

واژه‌های کلیدی: بیوفیلم، خوردگی، بیوساید، میکروتیتر پلیت، مدل ترمودینامیک.

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان
۲- استاد میکروبیولوژی، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان

Study of a Mathematical Model of Biocide Effect on a Biofilm Isolated from a Cooling System Using the Microtiter Plate

Shahryar Shakeri[1], Roha Kasra Kermanshahi[2], Gity Emtiazi[2]

Abstract

Bacterial colonization on metal surfaces and their metabolic activities lead to biocorrosion. In fact, any agent removing the biofilm or decreasing its thickness is capable of preventing biocorrosion. Biocides make up one such agent. These agents can control bacterial biofilms, remove these structures, or kill cells within them. The object of this research is to study the thermodynamic model of biocide penetration into the biofilm using the microtiter plate test. First, the biofilm bacteria were isolated to form a mix-bacterial biofilm. The biocide effect on the mix-biofilm was then determined using the microtiter plate test. Results from this test were compared with those from a thermodynamic model and it was revealed that the effects of oxidizing biocides such as sodium hypochlorite and hydrogen peroxide are in good agreement with the results from the model. The results indicated that increased biocide concentration leads to the removal of the biofilm or to the kill-off of the cells within it. However, in the case of non-oxidizing biocides such as sulfathiazol, glutaraldehyde, and alkyl dimethyl ammonium chloride, the efficiency results did not agree well with the results from the thermodynamic model such that increased biocide concentration did not remove the biofilm nor did it kill off the cells within it.

***Key words**: Biofilm, Corrosion, Biocides, Microtiter Plate, Thermodynamic Model.*

1- Graduate Student of Microbiology, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan
2- Professors of Microbiology, Department of Biology, Isfahan University, Isfahan

حضور فیزیکی سلولهای باکتری بر روی فلزات و سطح آنها و فعالیتهای متابولیکی آنها می‌تواند سبب خوردگی میکروبی شود. ضخامت بیوفیلم سبب ایجاد یک سری نقاط بی‌هوازی در کف بیوفیلم می‌شود که فاقد اکسیژن می‌باشند[۱]. در نتیجه غلظتهای متفاوت اکسیژن در دو محل بر روی سطح فلز می‌تواند سبب تفاوت در پتانسیل الکتریکی و نهایتاً منجر به خوردگی شود[۲]. همچنین بعضی از باکتریهای بیوفیلم قادرند مواد شیمیایی خورنده مثل اسید و گاز هیدروژن را در طول متابولیسم خود تولید کنند. نواحی غیرهوازی در بیوفیلم نیز می‌توانند دارای باکتریهای احیاء کنندهٔ سولفات باشند. این گروه از باکتریها، سولفات را به سولفید هیدروژن احیاء می‌کنند که فلزات را می‌خورد[۳]. موضوع جدیدی که در چند سال اخیر مورد توجه قرار گرفته است، میکروارگانیسمهای ایجاد کنندهٔ بیوفیلم می‌باشد که کنترل آنها در حقیقت کنترل تمام باکتریها و حتی فرصت ندادن به زیانی است که از سوی باکتریهای احیاء کنندهٔ سولفات به سیستم وارد می‌شود[۴]. در حقیقت، هر عاملی که بتواند ضخامت بیوفیلم را کاهش دهد و یا آن را حذف کند، می‌تواند نواحی بی‌هوازی‌ای که سبب خوردگی می‌شوند را نیز کاهش دهد. یک نمونه از تیمار شیمیایی به کار برده شده برای جلوگیری و کنترل تشکیل بیوفیلم و عواقب ناشی از آن، استفاده از بیوسایدها می‌باشد. بیوسایدها مواد خالص یا ترکیبات مخلوطی هستند که قادرند میکروارگانیسمها را بکشند یا رشد آن‌ها را مهار کنند[۵]. این مواد می‌توانند به داخل بیوفیلم باکتری نفوذ کنند و در نتیجه سبب حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای درون آن شوند. کارآیی یا بازده یک بیوساید بستگی به نوع میکروارگانیسم و شرایط راه‌اندازی سیستم مورد نظر دارد[۶]. بنابراین بررسی نفوذ بیوسایدها به داخل بیوفیلم و اثرات آن ها بسیار با اهمیت می‌باشد. اما باید توجه داشت که بعضی بیوسایدها می‌توانند به داخل بیوفیلم نفوذ کنند، ولی اثر کمی در حذف بیوفیلم و کشتن سلولهای درون آن دارند. هدف این تحقیق بررسی مدل ترمودینامیکی نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت و مقایسه نتایج حاصل از این روش با این مدل ریاضی می‌باشد.

۲- مواد و روشها

۲-۱- بیوسایدهای آزمایش شده در این تحقیق

در این تحقیق، اثر سه نوع بیوساید زیر با غلظتهای متفاوت برای نفوذ به داخل بیوفیلم مخلوط باکتریها توسط روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت. قابل ذکر است که اساس انتخاب غلظتهای مورد استفاده با توجه به مراجع متعدد می‌باشد.

بیوسایدها به این قرارند:

بیوسایدهای اکسید کننده مثل سدیم هیپوکلریت در غلظت‌های ۱، ۱۰، ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و هیدروژن پراکساید در غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام؛

بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل گلوتارآلدهید در غلظت‌های ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ پی پی ام و سولفاتیازول در غلظت‌های ۱۰، ۳۰، ۵۰ و ۷۰ پی پی ام؛

بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی مثل آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلراید(ABDAC) در غلظت‌های ۴۰۰، ۵۰۰، ۶۰۰ و ۷۰۰ پی پی ام.

۲-۲- نمونه برداری، جداسازی و شناسایی باکتریها

در این تحقیق نمونه‌برداری به دو صورت انجام شد:

الف- از قسمت‌های مختلف سیستم خنک کننده کارخانه پلی اکریل اصفهان که در شکل ۱ نشان داده شده است، نمونه‌های آب و همچنین تا حد امکان نمونه‌های بیوفیلم برداشته و به داخل ظروف نمونه‌برداری انتقال داده شد؛

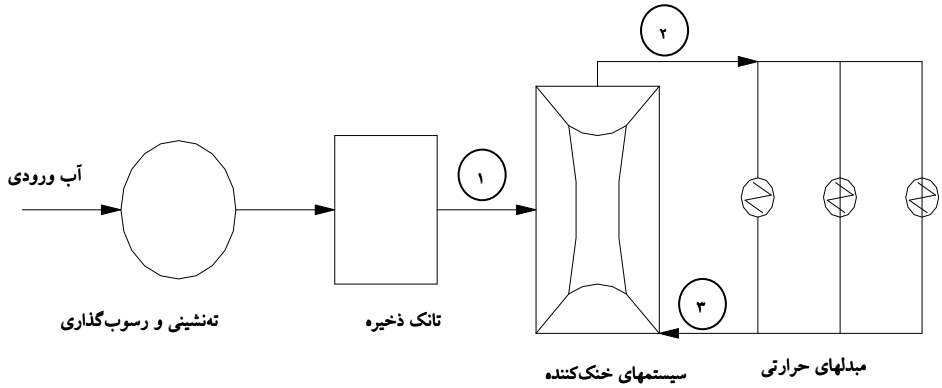
ب- در نوع دوم نمونه‌برداری، کوپنهای فلزی در مسیر جریان آب سیستم خنک کننده (محل‌های نشان داده شده در شکل ۱) قرار گرفت. بعد از گذشت مدت ۴۰ روز، این کوپنها از مسیر جریان خارج و به آزمایشگاه انتقال داده شد.

برای جداسازی باکتریها بعد از تهیهٔ سوسپانسیون از نمونه‌های نوع اول، سریال رقت تهیه شد و روی محیط نوترینت آگار کشت صورت گرفت. در مورد کوپنها، بعد از شست و شوی آنها با آب مقطر استریل، بیوفیلم سطح کوپنها به وسیلهٔ یک اسپاتول تحت شرایط استریل در ۱۰ میلی‌لیتر بافر استریل قرار گرفت و سوسپانسیون تهیه شد و بعد از تهیهٔ سریال رقت، کشت صورت گرفت. این محیط‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C انکوبه شدند. بعد از گذشت این زمان، جداسازی باکتری‌ها و شناسایی آن‌ها صورت گرفت[۷].

۲-۳- مقایسهٔ بین قدرت باکتریهای جداسازی شده برای تشکیل بیوفیلم توسط روش میکروتیتر پلیت

برای سنجش قدرت تشکیل بیوفیلم توسط باکتریهای جدا شده، یک کشت ۱۸ تا ۲۴ ساعته[1] از هر ایزوله در تریپتیکاز سوی براث[2] در دمای ۳۰°C تهیه شد. سپس یک میلی‌لیتر از این محیط

[1] Overnight Culture
[2] TSB



شکل ۱- نمایی از سیستم خنک کننده و محلهای نمونه برداری

کشت به ۱۰ میلی‌لیتر از محیط تریپتیکاز سوی براث استریل اضافه شد و کدورت آن از طریق خواندن جذب نوری سوسپانسیون بین ۰/۰۸ تا ۰/۱ در طول موج ۶۲۵ نانومتر تنظیم گردید. این عمل توسط دستگاه اسپکتروفتومتر مدل میلتون روی[1] صورت گرفت. کدورت سوسپانسیون معادل استاندارد ۰/۵ مک‌فارلند و حاوی بیش از 10^8 باکتری در هر میلی‌لیتر بود. سپس از این سوسپانسیون، ۲۵۰ میکرولیتر به هر چاهک در میکروپلیت انتقال داده شد. هر هشت چاهک در میکروپلیت با یک سوسپانسیون باکتریایی مشخص پر شد که به این ترتیب در هر چاهک نزدیک به 25×10^6 CFU/well باکتری وجود داشت. چاهکهای شاهد، تنها حاوی محیط تریپتیکاز سوی براث استریل می‌باشند. جنس میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی، پلی‌استیرن[2] می‌باشد و ظرفیت هر چاهک ۳۰۰ میکرولیتر است. سپس سطح پلیتها پوشانده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت در دمای $30^\circ C$ صورت گرفت. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، محلول مواد غذایی و سوسپانسیون میکروبی از چاهکها خارج شد و هر چاهک، سه مرتبه توسط ۳۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل شسته شد. همچنین پلیتها به منظور حذف سلولهای پلانکتونیک یا غیر متصل در حین شستن به شدت تکان داده شد. سپس باکتریهای متصل به دیواره و کف چاهک، با ۲۵۰ میکرولیتر اتانل ٪۹۶ تثبیت شد. بعد از ۱۵ دقیقه، محتویات چاهکها تخلیه شد و پلیتها در یک محل در آزمایشگاه به منظور خشک شدن قرار گرفت. بعد از خشک شدن، پلیتها به مدت ۵ دقیقه با ۲۰۰ میکرولیتر رنگ کریستال ویولهٔ ٪۲ که برای رنگ‌آمیزی گرم مورد استفاده قرار می‌گیرد، رنگ‌آمیزی و سپس رنگهای اضافی از طریق قرار دادن پلیتها در مسیر جریان آب لولهٔ شهری شسته شد. این رنگ برای سنجش میزان بیوفیلم بسیار مناسب است و همچنین می‌تواند برای سنجش اثرات بیوسایدها بر روی بیوفیلم مورد استفاده قرار گیرد.

بعد از شستن رنگهای اضافی، پلیتها در دمای آزمایشگاه قرار گرفتند تا خشک شدند. پس از خشک شدن پلیتها، بیوفیلمها به صورت حلقه‌های ارغوانی رنگی بر روی دیواره چاهکها قابل مشاهده بود. سپس سنجش کمّی تولید بیوفیلم به وسیلهٔ اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک ٪۳۳ به هر چاهک صورت گرفت. سپس جذب نوری (OD)[3] رنگ کریستال ویولهٔ موجود در حلال رنگ‌بر در طول موج ۴۹۲ نانومتر توسط دستگاه الیزا ریدر (استات فاکس ۲۱۰۰)[4] خوانده شد. در نهایت، دسته بندی باکتریها برای تشکیل بیوفیلم بر اساس جذب نوری بیوفیلم باکتری صورت گرفت[۸].

۲-۴- روش انجام آزمایش میکروتیتر پلیت برای تعیین اثر بیوساید ها در نفوذ به داخل بیوفیلم مخلوط باکتریها و حذف بیوفیلم و یا کشتن سلولهای درون آن

برای سنجش اثر عوامل ضدمیکروبی بر روی حذف بیوفیلم مخلوط و یا کشتن سلولهای درون آن، بعد از آماده سازی کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته و فعال‌سازی باکتریها، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک‌فارلند از هر کدام از ایزوله‌ها تهیه شد. سپس از هر سوسپانسیون به مقدار ۱ mL، به ۵۰ mL تریپتیکاز سوی براث استریل تلقیح شد و سپس تمام چاهکها در یک میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۵۰ میکرولیتر از این محلول پر شد (25×10^4 CFU/well). بعد از تلقیح، سطح پلیتها پوشانده شد و انکوباسیون به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد صورت گرفت. سپس عوامل ضدمیکروبی بعد از خارج کردن

[1] Milton Roy
[2] Polystyrene
[3] Optical Density
[4] ELISA Reader (Stat Fax-2100)

محتویات چاهکها و شست و شوی آنها مورد استفاده قرار گرفت. (تعداد نمونه‌ها در این آزمایش برابر ۸ می‌باشد).

تمام این عوامل ضد باکتریایی به مدت یک ساعت روی بیوفیلم اثر داده شد. همچنین ۸ چاهک در یک ستون میکروپلیت، یک تیمار مشابه دریافت کردند. به دلیل احتمال تراکم بالای سلولهای بیوفیلم، در خنثی کردن عوامل ضدمیکروبی که با این حجم(۲۵۰ میکرولیتر) به کار رفته اند، هر بیست دقیقه یک بار این عوامل با عوامل تازه جایگزین[1] شدند. علاوه بر این، ستونهای تیمار شده، ستونهای کنترل (حاوی بیوفیلم و بدون تیمار) و همچنین ستونهای شاهد(حاوی محیط براث استریل) در هر پلیت، در نظر گرفته شد. بعد از گذشت یک ساعت، عوامل ضد میکروبی به وسیلهٔ شستن چاهکها خارج شدند و سپس چاهکها با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویولهٔ ٪۲ به مدت ۵ دقیقه رنگ شد. از آن جا که کریستال ویوله رنگی است که می‌تواند کل بیوفیلم[2] را رنگ کند، یک رنگ مناسب برای سنجش حذف بیوفیلم محسوب می‌شود.

بعد از گذشت مدت زمان ۵ دقیقه، چاهکها با آب شیر شسته شدند و سپس با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ٪۳۳ پر شد. سپس پلیت‌ها به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شدند و بعد از این مدت به شدت تکان داده شد و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. سپس سنجش کارایی بیوساید در حذف بیوفیلم یا درصد کاهش[3] بیوفیلم از طریق جذب نوری چاهکهای تیمار شده، کنترل و شاهد با توجه به رابطهٔ ۱ محاسبه شد[۹]:

$$\text{درصد کاهش} = [(C-B)-(T-B)] / (C-B)\times 100 \qquad (۱)$$

که در آن:

C : میانگین جذب نوری چاهکهای کنترل

B : میانگین جذب نوری چاهکهای شاهد

T: میانگین جذب نوری چاهکهای تیمارشده

باید توجه داشت که حذف ناقص بیوفیلم توسط بیوسایدها، سبب می‌شود که قسمت ماندهٔ بیوفیلم روی سطوح، که هنوز تعدادی از سلولهای زنده را دارا می‌باشد، مجدداً رشد کند و در نتیجه بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی بیوفیلم به حالت اولیهٔ خود برگردد و ساختمان خود را تعمیر کند و دوباره سبب آلودگی سیستم شود. از این رو توجه به این نکته که بعد از اثر عوامل ضدمیکروبی چه میزان و یا چه تعداد از سلولهای درون بیوفیلم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند، ضروری است. در نتیجه دوباره آزمایش میکروپلیت همانند روش بالا انجام شد. ولی در نهایت به جای کاربرد کریستال ویوله از یک رنگ تنفسی به نام ۲، ۳ و ۵- تری فنیل تترازولیوم کلراید یا TTC استفاده شد. TTC محلول در آب می‌باشد و پتانسیل ردوکس آن در حدود ۰/۰۸۷- است و می‌تواند به عنوان یک پذیرندهٔ الکترون برای هیدروژنازهای متفاوت عمل کند. تقریباً تمام میکروارگانیسمها توانایی احیاء TTC را به تری فنیل فورمازان یا TPF دارند که با توجه به رنگ قرمزی که در حین احیاء ایجاد می‌شود، می توان از روی خواندن جذب نوری این رنگ در طول موج ۴۵۰ نانومتر و محاسبه کارایی بیوسایدها در کشتن سلولهای درون بیوفیلم، با توجه به فرمول بالا مشخص کرد که چه میزان از سلول های درون بیوفیلم توسط بیوساید کشته شده اند[۸].

۲-۵- آنالیزهای آماری

اختلاف بین میانگینهای به دست آمده در آزمایشهای بالا، توسط آزمون ویلکاکسون برای نمونه‌های مستقل (داده‌های مربوط به نمودار CV و TTC) و زوج شده (داده‌های مربوط به یک نمودار) با درجه اطمینان ۰/۰۵ و احتمال ٪۹۵ محاسبه شد.

۳- نتایج

۳-۱- باکتریهای جداسازی شده از بیوفیلم

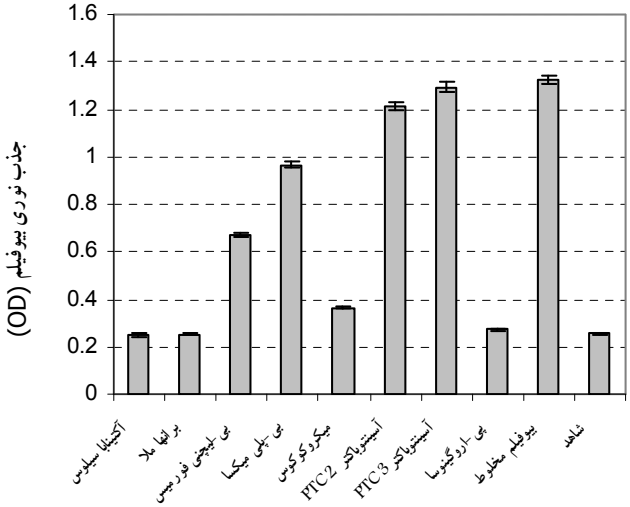
در این تحقیق باکتری‌های g^+ (به نسبت ٪۳۰) و g^- (به نسبت ٪۷۰) در بیوفیلم شناسایی شدند. جداسازی جنسهای میکروکوکوس، باسیلوس، اکتینوباسیلوس، برانهاملا و آسینتوباکتر صورت گرفت. نتایج حاصل از روش میکروتیتر پلیت برای مقایسه بین قدرت باکتریهای ایزوله شده برای تشکیل بیوفیلم (شکل۲)، نشان می‌دهد که بیوفیلم مخلوط باکتریهای جداسازی شده(جذب نوری بیوفیلم نزدیک به ۱/۴ می باشد)، بیشترین توانایی را در تشکیل از خود نشان داده است. در نتیجه بیوفیلم مخلوط انتخاب و اثر بیوسایدها بر روی آن توسط روش میکروتیتر پلیت مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲- نتایج مربوط به اثر بیوساید ها روی بیوفیلم مخلوط باکتریها

شکل ۳-الف اثر بیوساید هیپوکلریت سدیم را روی بیوفیلم مخلوط باکتریها (سویه های آسینتوباکتر، باسیلوس و میکروکوکوس با هم) را نشان می‌دهد. ستونهای CV، اثر حذفی و

---

[1]. Refresh
[2]. Mass of Biofilm
[3]. Percentage Reduction



شکل ۲- مقایسه بین قدرت باکتریهای ایزوله شده برای تشکیل بیوفیلم از طریق روش میکروتیتر پلیت

ستونهای TTC، اثر کشندگی بیوسایدها را نشان می‌دهند. در غلظت ۱ و ۱۰ پی پی ام از این بیوساید به ترتیب ٪۴۱ و ٪۵۹ از بیوفیلم حذف شده است. این در حالی است که در این دو غلظت هیچ اختلاف معنی‌داری بین داده‌های حاصل از حذف بیوفیلم و کشتن سلولهای درون بیوفیلم وجود ندارد. بیوساید در این دو غلظت در کشتن سلولهای درون بیوفیلم موفق نیست. با افزایش غلظت بیوساید به ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام توانایی حذف بیوفیلم از ٪۶۶ تا ٪۸۳ افزایش می‌یابد. در این دو غلظت بیوساید هیپوکلریت سدیم نزدیک به ٪۱۰۰ از سلول‌های درون بیوفیلم را کشته است. شکل ۳-ب اثر بیوساید هیدروژن پراکساید روی بیوفیلم مخلوط را نشان می‌دهد. H_2O_2 در دو غلظت پایین خود بین ٪۲۹ تا ٪۴۰ از بیوفیلم مخلوط را حذف کرده است. این در حالی است که با افزایش غلظت بیوساید به ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام میزان حذف بیوفیلم تا ٪۸۰ افزایش پیدا کرده است. قابل توجه است که در کمترین غلظت این بیوساید، تمام سلولهای درون بیوفیلم کشته شده‌اند.

شکل ۳-ج اثر گلوتار آلدهید روی بیوفیلم مخلوط باکتریها را نشان می‌دهد. با توجه به نمودار، اثر حذفی این بیوساید روی بیوفیلم مخلوط بسیار ناچیز و نزدیک به ٪۲۰ برای اکثر غلظتهای مورد استفاده می‌باشد و با افزایش غلظت بیوساید هیچ تغییری در اثر حذفی آن دیده نمی‌شود. اما قدرت کشندگی این بیوساید روی سلولهای درون بیوفیلم در کمترین غلظت مورد استفاده نزدیک به ٪۱۰۰ می‌باشد.

شکل ۳-د اثر بیوساید سولفاتیازول روی بیوفیلم مخلوط باکتریها را نشان می دهد. در غلظتهای ۱۰، ۳۰ و ۵۰ پی پی ام از این بیوساید، نزدیک به ٪۳۰ از بیوفیلم مخلوط حذف شده است. در غلظت ۷۰ پی پی ام، این توانایی حذف بیوفیلم به ٪۴۴ افزایش یافته است. اما با توجه به نمودارهای مربوط به کشتن سلولهای درون بیوفیلم و حذف آن توسط بیوساید و عدم اختلاف معنی دار بین داده‌ها، مشخص می‌شود که این بیوساید در حذف بیوفیلم و کشتن سلولهای درون بیوفیلم ناموفق است.

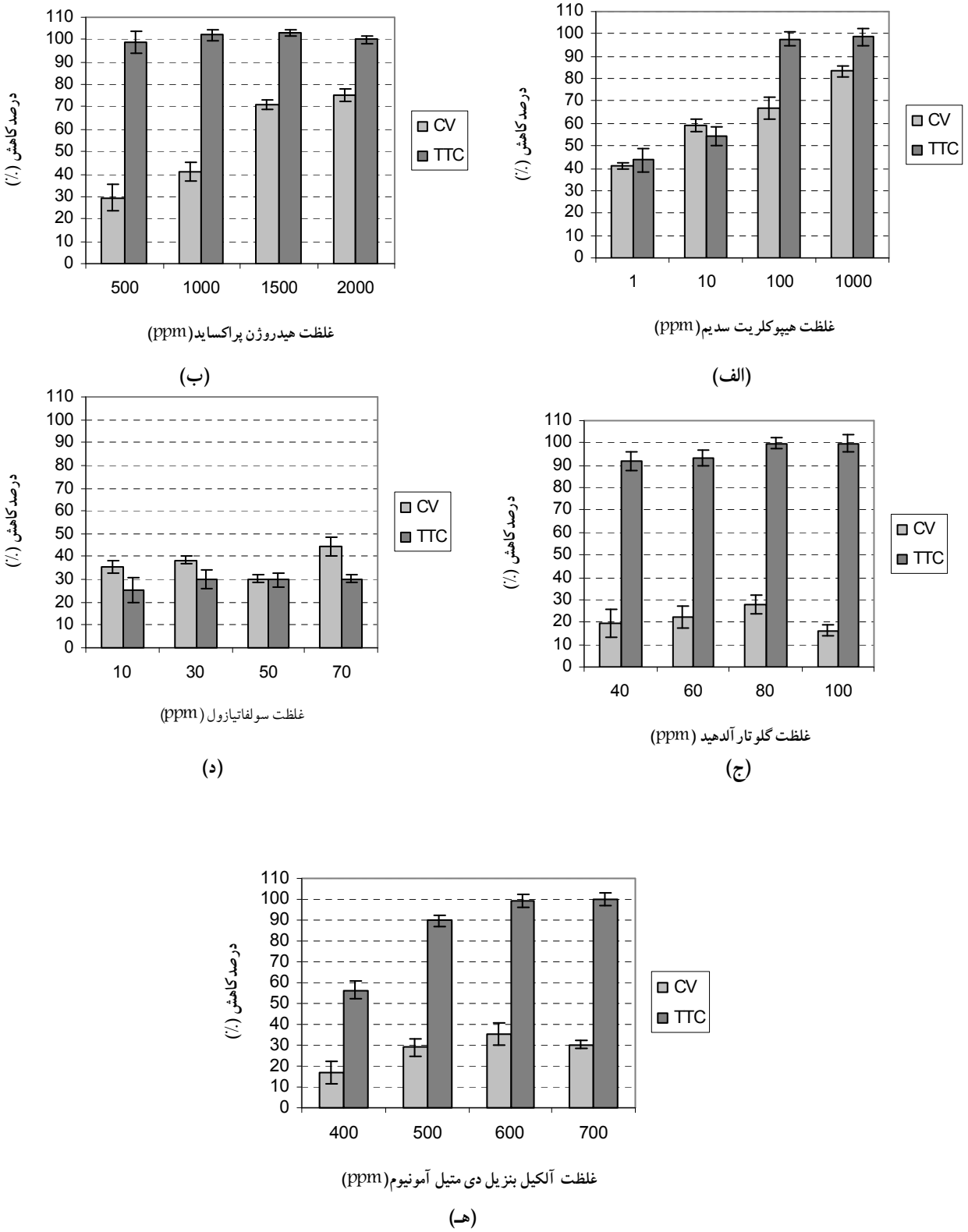
در نهایت اثر آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلراید روی بیوفیلم مخلوط باکتریها در شکل ۳-هـ نشان داده شده است. در غلظت ۴۰۰ پی پی ام از این بیوساید نزدیک به ٪۱۶ از بیوفیلم مخلوط حذف شده است. اما در سه غلظت بالاتر میانگین حذف بیوفیلم نزدیک به ٪۳۰ می‌باشد. یعنی با افزایش غلظت بیوساید اثر حذفی آن افزایش چندانی پیدا نکرده است.اثر این بیوساید در کشتن سلولهای درون بیوفیلم در دو غلظت ۴۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام به ترتیب ٪۵۶ و ٪۸۹ می‌باشد. ولی اثر کشندگی این بیوساید در دو غلظت بالاتر به ٪۱۰۰ می‌رسد.

۴- بحث

۴-۱- بررسی مدل نفوذ بیوساید به درون بیوفیلم

در این بحث سعی خواهد شد تا برای اولین بار به بررسی مدل نفوذ بیوساید به زیر بیوفیلم باکتری پرداخته شود. به همین دلیل نظرات موافق و مخالف سایر محققین برای این مدل وجود ندارد. تمام توضیحات در مورد این مدل بر اساس مرجع [۱] می‌باشد و تنها هدف از این بحث بررسی و مقایسه نتایج حاصل از این تحقیق با مدل مذکور می‌باشد.

فرض می‌شود که تمامی شرایط لازم برای تشکیل یک بیوفیلم باکتری موجود باشد و سرعت سیال نیز در سیستم کمتر از ۱/۵ متر



شکل ۳- اثر حذفی(ستونهای CV) و کشندگی (ستونهای TTC) بر روی بیوفیلم مخلوط باکتری‌ها

CV : رنگ کریستال ویوله که بیانگر میزان حذف بیوفیلم توسط بیوساید می باشد

TTC : رنگ تری فنیل تترازولیوم کلرید که بیانگر میزان کشندگی سلول های درون بیوفیلم توسط بیوساید می باشد

بر ثانیه باشد. همچنین بر اساس قانون دوم فیک داریم :

$$C(h,t) = C_S[1 - \mathrm{erf}(h/2\sqrt{dt})] \qquad (۲)$$

که در آن :

erf : تابع خطا

C_s : مقدار بیوساید مؤثر برای حذف بیوفیلم

C(h, t) : مقدار بیوساید اندازه گیری شده در زیر بیوفیلم

d : ضریب نفوذ بیوساید به زیر بیوفیلم

h : ارتفاع بیوفیلم

t : زمان اثر بیوساید روی بیوفیلم

مقدار C_s در این تحقیق در آزمایشگاه و با استفاده از تکنیک میکروپلیت محاسبه شد. همچنین d برای هر بیوساید بستگی به فعالیت بیوساید دارد. زیرا اگر بیوساید به قدر کافی فعال باشد، به مرور زمان، تمامی بیوساید به داخل بیوفیلم وارد می‌شود.

بنابراین با توجه به رابطه فوق می‌توان گفت که با ثابت بودن مقدار C_s (مقدار مؤثر بیوساید روی بیوفیلم) تنها با افزایش زمان، میزان C(h, t) (میزان بیوساید در زیر بیوفیلم) افزایش می‌یابد. برای مثال، اگر برای هیپوکلریت سدیم فرض شود که میزان بیوساید لازم برای حذف کامل بیوفیلم ۱۰۰ پی پی ام باشد، و همچنین فرض شود که بعد از گذشت زمان t_1 از اثر بیوساید روی بیوفیلم، ۲۰ پی پی ام و از گذشت زمان t_2 ، ۸۰ پی پی ام از بیوساید به داخل بیوفیلم نفوذ کرده است، با حل معادله (۲) برای زمان های t_1 و t_2 خواهیم داشت:

$$t_2 = 26 t_1$$

یعنی این که برای نفوذ ۸۰ پی پی ام از بیوساید به داخل بیوفیلم، نیاز به گذشت زمان بسیار زیادی می‌باشد(که این زمان ۲۶ برابر زمان لازم برای نفوذ ۲۰ پی پی ام از این بیوساید به داخل بیوفیلم می‌باشد). بنابراین می‌توان در واحد زمان(با توجه به مدل)، با تزریق مقدار زیاد بیوساید، باعث شد تا مقادیر بیشتری از بیوساید به داخل بیوفیلم نفوذ کند تا در موقعی که تزریق بیوساید با مقادیر اندک صورت پذیرفت به راندمان مورد نظر دست یافت. همچنین با توجه به فرمول می‌توان ذکر کرد که نفوذ بیوساید به داخل بیوفیلم، علاوه بر زمان، به عوامل دیگری از جمله ضریب نفوذ بیوساید و ارتفاع بیوفیلم یا ضخامت آن نیز بستگی دارد.

در این تحقیق، تمام بیوسایدهای مورد استفاده در غلظتهای مختلف، تنها در مدت زمان یک ساعت روی بیوفیلم اثر داده شدند [۹]. با توجه به شکل ۳-الف، مشخص می‌شود که هیپوکلریت سدیم بیشتر در دو غلظت ۱۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام موفق به حذف قسمت زیادی از بیوفیلم باکتریها شده است. در دو غلظت ۱ و ۱۰ پی پی ام از این بیوساید، با مدت زمان اثر یک ساعت روی بیوفیلم، میزان حذف بیوفیلم پایین می‌باشد. با مقایسه این نتایج با مدل فوق، می‌توان ذکر کرد که غلظتهای بالای هیپوکلریت سدیم نسبت به غلظتهای پایین آن و با مدت زمان اثر یکسان روی بیوفیلم، کارآیی بسیار بالایی در حذف بیوفیلم دارند و در مدت زمان یک ساعت میزان بیشتری از بیوساید در غلظتهای بالاتر به زیر بیوفیلم نفوذ کرده است و سبب حذف بیوفیلم شده است. همچنین با افزایش غلظت بیوساید قدرت کشندگی آن نیز افزایش پیدا می‌کند.

در مورد هیدروژن پراکساید مطابق شکل ۳-ب، می‌توان این گونه ذکر کرد که افزایش غلظت این بیوساید در مدت زمان اثر یک ساعت، اثر حذفی بیوساید روی بیوفیلم مخلوط باکتریها را بالا برده است. همچنین غلظتهای پایین این بیوساید کارآیی بسیار عالی در کشتن سلول‌های بیوفیلم دارند.

در مورد گلوتارآلدهید مطابق شکل۳- ج، می‌توان گفت که این بیوساید حتی در غلظتهای بالای خود نسبت به غلظتهای پایین‌تر، اثر حذفی خوبی ندارد(میانگین اثر حذفی این بیوساید بین ٪۲۰ تا ٪۳۰ می‌باشد). ولی این بیوساید در کمترین غلظت خود تمام سلولهای درون بیوفیلم را می‌کشد [۱۰].

از شکل ۳-د مشخص است که با افزایش غلظت سولفاتیازول که در مدت زمان یک ساعت روی بیوفیلم اثر داده شده بود، هیچ افزایشی در توانایی این بیوساید برای حذف بیوفیلم و همچنین کشتن سلولهای درون آن مشاهده نشد. در مورد آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید مطابق شکل ۳-هـ، نیز با افزایش غلظت آن تنها ٪۳۰ از بیوفیلم در بالاترین غلظت بیوساید حذف شده است که اثر حذفی مناسبی نمی‌باشد. ولی اثر کشندگی بیوساید با افزایش غلظت، افزایش می‌یابد [۱۱].

۵- نتیجه گیری

می‌توان با توجه به توضیحات داده شده، منطق استفاده از مقادیر بالای بیوسایدهای اکسیدکننده را برای حذف بیوفیلم درک نمود. با توجه به مدل و بدون افزایش زمان، با تزریق مقدار زیاد بیوسایدی که توانایی خوبی در حذف بیوفیلم دارد، مقدار بیشتری از آن به زیر بیوفیلم نفوذ می‌کند تا در موقعی که تزریق بیوساید به سیستم با مقادیر اندک صورت پذیرد. در این تحقیق، با افزایش غلظت بیوسایدهای اکسید کننده مثل هیپوکلریت سدیم و هیدروژن پراکساید میزان حذف بیوفیلم نیز افزایش پیدا می‌کند. این بیوسایدها در کنترل و حذف بیوفیلم بسیار مؤثر می‌باشند. اما این مورد در رابطه با بیوسایدهای غیر اکسید کننده مثل گلوتارآلدهید، سولفاتیازول و بیوسایدهایی با خاصیت دترجنتی مثل آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید دیده نشد و تنها اثر کشندگی بعضی از این بیوساید ها روی بیوفیلم افزایش پیدا کرد.

بـه طـور کلـی، در کنتـرل بیـوفیلم توسـط بیوسـایدهای غیـر اکسیدکننده باید بـه ایـن نکتـه توجـه داشـت کـه ایـن بیوسـایدها در غلظت‌های مورد آزمایش در این تحقیق توانـایی حـذف بیـوفیلم را ندارند. در حقیقت تیمار بیوفیلم با این بیوسایدها سبب حذف ناقص بیوفیلم می‌شود و در نتیجه با توجـه بـه نـسبت رشـد بـالای سـلولها، بیوفیلمی که به طور ناقص حذف شده است، دوباره رشـد کـرده و بـه حالت اولیه خود برمی‌گردد. در نهایت، می توان بیـان نمـود کـه ایـن مـدل بـرای بیوسـایدهای غیـر اکـسید کننـده مثـل گلوتارآلدهیـد، سولفاتیازول و آلکیل بنزیل دی متیل آمونیوم کلرید صدق نمـی‌کنـد و تنها می‌توان آن را به بیوسایدهای اکـسید کننـده مثـل هیپوکلریـت سدیم و هیدروژن پراکساید نسبت داد.

۶- مراجع

۱- جواهر دشتی، ر. (۱۳۷۸). "خوردگی میکروبی"، انتشارات بهرورزان، تهران، ۱۷۰ صفحه.

2- Danese, P. N., Pratt, L. A., and Kolter, R. (2001). "Biofilm formation as a developmental process." *J. Methods in Enzymol*, 336, 19– 26.

3- Costerton, J. W., and Lashen, E. S. (1984). "Influence of biofilm on efficiency of biocides on corrosion- causing bacteria." *J. Material Performance,* 23, 13-18.

4- Alasri, A., Roques, C., Cabassud, C., Michel, G., and Aptel, P. (1992). "Effects of different biocides on a mixed biofilm produced on a tygon tube and on ultrafiltration membranes." *J. Spectra,* 168, 21–24.

5- Beer, D. D., Srinivasan, R., et al. (1994). "Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection." *J. Applied Environmental Microbiology,* 60, 4339–4344.

6- Cochran, W. L., et al. (2000). "Reduced susceptibility of thin *Pseudomonas aeruginosa* biofilm to hydrogen peroxide and monochloramine." *J. Applied Microbiology,* 88, 22- 30.

7- Krieg, N. R., et al. (1998). *Bergeys manual of determinative for bacteriology*, Williams and Wilkins, New York.

8- Stewart, S. P., Zelver, N., Hamilton, A. M., and Pitts, B. (2003). "A microtiter plate screening method for biofilm disinfection and removal." *J. Microbiology Methods,* 54, 269-276.

9- Green, P. N. (1993). " Efficiency of biocides on laboratory generated *Legionella* biofilms." *J. Letter Applied Microbiology,* 17, 158– 161.

10- Huang, C. T., Yu, F. P., McFeters, G. A., and Stewart, P. S. (1995). "Nonuniform spatial patterns of respiratory activity within biofilms during disinfection." *J. Applied Environmental Microbiology,* 61(6), 2252– 2256.

11- Ludensky, M. (2003). "Control and monitoring of biofilms in industrial applications." *J. International Biodeterioration and Biodegradation*, 51, 255- 263.