Mechanism of bacterial biofilm formation in milk containers

آلية تكون الأغشية الحيوية البكتيرية في حاويات الحليب

حوراء وهاب عزيز
قسم علوم الحياة/كلية العلوم للبنات/جامعة بابل

حسن فاضل ناجي
قسم علوم الحياة/كلية العلوم/جامعة بابل

الخلاصة:

عزلت 44 عزلة بكتيرية مختلفة من الأغشية الحيوية المتكونة على جدران حاويات حليب الأبقار الخام. شكلت العزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام النسبة المؤية الأعلى (81.8%) في الأغشية من العزلات الموجبة للصبغة (18.2%) وبلغ معدل العدد البكتيري الكلي الحي في الأغشية $10X6^4$ خلية/مل/سم^2 من جدار الحاوية. لدى متابعة آلية تكون الأغشية الحيوية بتقنية الشرائح الزجاجية الغاطسة تبين أن العزلات السالبة لصبغة كرام هي السائدة وبنسبة 75.3% في حين كانت العزلات الموجبة للصبغة بنسبة 24.7% وقد نافست العزلات المتحركة تلك غير المتحركة في عملية التكوين. تؤكد نتائج هذه الدراسة على أن البكتريا السالبة لصبغة كرام وعلى وجه الخصوص المتحركة منها لها دور مهم في تكوين الأغشية الرقيقة الحيوية وتلف الحليب.

Abstract

Different 44 bacterial isolates were isolated from biofilms of raw cow milk. The results were elicited that the Gram-negative isolates showed maximum percentage(81.8%) of total bacteria, whereas the minimum(18.2%) was found in the Gram-positive isolates. However, the average number of total bacteria count in biofilms of milk containers was 60000 cell/ ml/ cm. When the mechanism of biofilm formation was followed, using submerged slides technique, it was found that differences in the percentage of Gram-negative isolates (75.3%) from Gram-positive isolates (24.7%), however, the motile bacteria showed more competence than non motile in formation process. These findings suggest that the Gram-negative bacteria, with respect to motile bacteria have significant role in formation of biofilms and spoilage of milk.

* Present address: Department of Biology, college of science, university of Babylon, Iraq.
For correspondence, phone: (030)249562; Fax: 8851398
e-mail: fhnaji 20022003@ yahoo.com

المقدمة

تكّون البكتريا ائتلاف مجهري على شكل غشاء رقيق يعرف بالغشاء الحيوي يحميها من التغيرات البيئية والمؤثرات الخارجية (ICMSF, 1998). يوصف الغشاء الحيوي بأنه مدن مجهرية تقطنها تجمعات من الأحياء المجهرية ملتصقة على أسطح صلبة ورطبة تنمو لتكون مستعمرات ذات نوع واحد أو أكثر من الأحياء المجهرية (Baillie&Douglas, 1999) .

يعد هذا الغشاء مرحلة تطورية في علم البكتريا ويتكون من عدة مراحل تبدأ بانجذاب المواد العضوية وغير العضوية نحو السطح ثم التصاق البكتريا عليه وبناء المستعمرات المجهرية وإنتاجها لمواد متعددة خارجية (Exopolysubstances)ومن ثم نضج الغشاء (Costerton *et al.*, 1999 ; Chmielewski&Frank, 2003). تسيطر على مراحل تكون الغشاء الحيوي سيل من الجينات وتساعد قوى الاتزان الكهربائي والأواصر الكيميائية في رصانة بناء هذا الغشاء(Wimpenny, 2000). يسبب تكون الغشاء الحيوي على الأسطح الصلبة الملامسة للحليب مشاكل تلوث جدية إذ توفر بقاياه المتروكة على أسطح الأدوات والحاويات المغذيات الضرورية لنمو وتكاثر البكتريا وتساعد الرطوبة والحرارة المناسبة على تكونه ونتيجة لاستعمال هذه الأدوات والحاويات يحدث تلوث للحليب الطازج (Yoo & Chen, 2002). يؤدي تلوث الحليب هذا إلى تغير في صفاته النوعية لذا كان هدف هذه الدراسة هو عزل وتشخيص البكتريا المكونة للأغشية الحيوية ودراسة آلية تكونها.

المواد وطرائق العمل

1. العينات

تم جمع 27 عينة حليب بقري خام (1 لتر/عينة) من مركز جمع وتبريد الحليب في محافظة بابل في حاويات معدنية معقمة سعة 1 لتر خلال مدة الدراسة البالغة سنة. نقلت هذه العينات في حافظة مبردة إلى المختبر لإجراء التجارب اللاحقة.

2. عزل وتشخيص البكتريا من الغشاء الحيوي

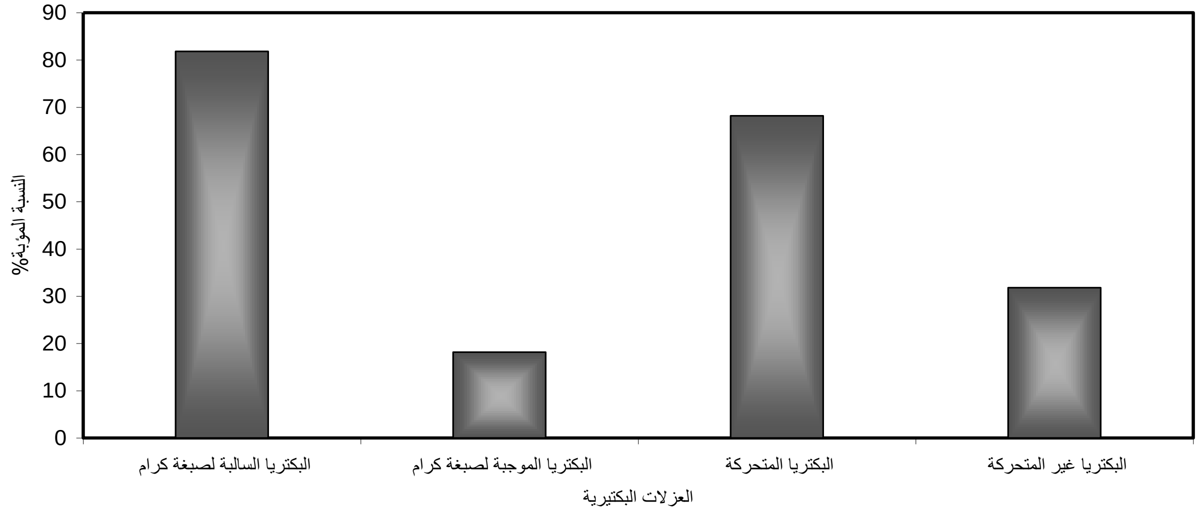
حضنت العينات عند درجة حرارة 30 م ͦ لمدة 48 ساعة بعدها سكب الحليب وغسلت الحاوية بهدوء بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات لإزالة بقايا الحليب. درست الأغشية الحيوية بوساطة المسحات وباستعمال 20 عينة إذ مسح موقعين بمساحة 1سم^2 من على سطح الحاوية من المواقع المحددة سلفاً وأخذ لكل موقع ثلاث مسحات. نقلت كل مسحة على حدة إلى أنبوب اختبار حاوي على 10 مل من 0.1% ماء الببتون بعدها عملت سلسلة تخافيف بالمحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) المعقم وزرعت التخافيف بتقنية صب الأطباق باستخدام وسط Standard plate agar (Oxoid). حضنت الأطباق بصورة مقلوبة عند درجة حرارة 30 م ͦ لمدة 48 ساعة بعدها عدت المستعمرات وشخصت البكتريا (Flint *et al.*, 1997; Macfaddin, 2000; Jessen& Lammert, 2001).

3. آلية تكون الغشاء الحيوي

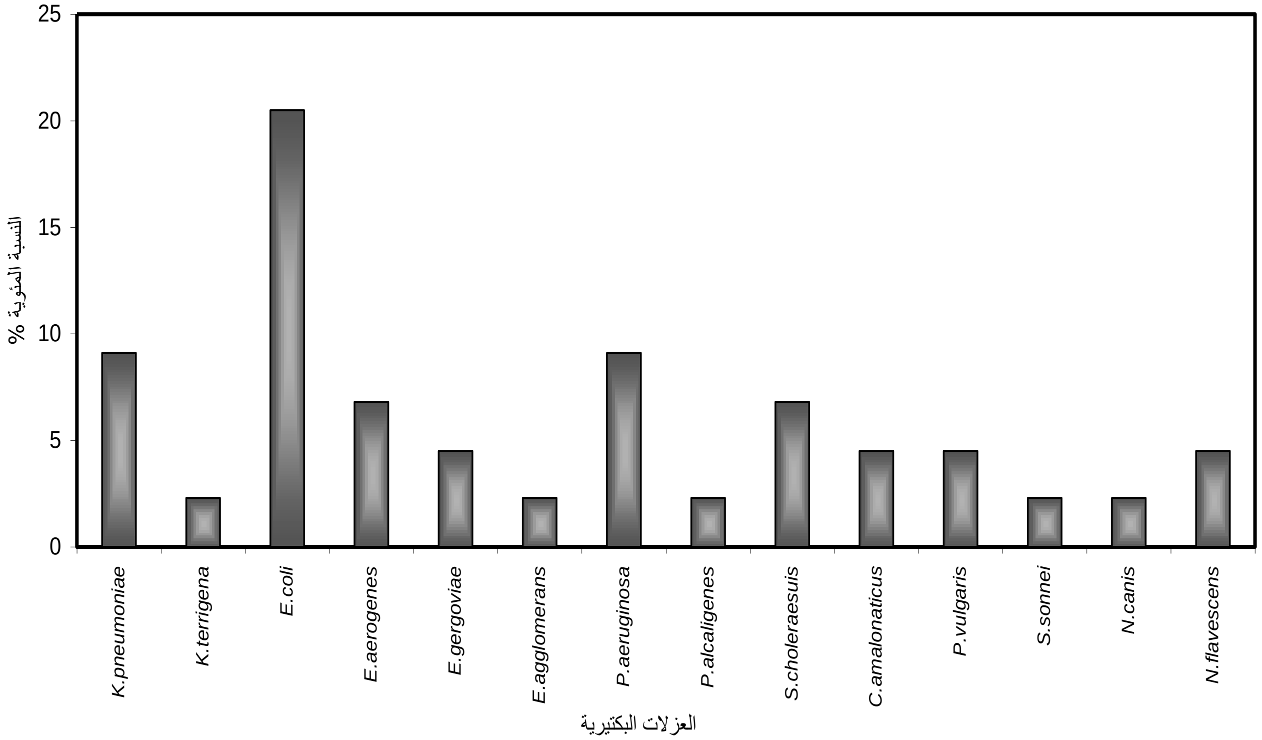
استعملت سبع عينات لدراسة آلية تكون الأغشية الحيوية إذ خضعت لظروف تجريبية ثابتة تمثلت بتثبيت ثمان شرائح زجاجية في حامل زجاجي وضع بدوره في كل حاوية معدنية (1 لتر). عقمت ثم أضيف لها الحليب الخام وحضنت عند درجة حرارة 30 م ͦ لمدة 48 ساعة. رفعت الشريحة الأولى في وقت الصفر من مدة الحضن بوساطة ملقط معقم وغمرت في الماء المقطر المعقم ثم وضعت في دورق حاوي على 20 مل من المحلول الملحي الفسيولوجي (0.85%) المعقم ثم رج جيداً لإزالة البكتريا الملتصقة عليه وعمل منه سلسلة تخافيف و زرعت بتقنية صب الأطباق باستخدام وسط Standard plate agar وحضنت عند درجة حرارة 30 م ͦلمدة 48 ساعة. سحبت الشرائح الزجاجية المتبقية في الأوقات الزمنية 2 و 4 و 6 و 24 و 26 و 28 و 48 ساعة لعد البكتريا الملتصقة عليها وبنفس الخطوات السابقة. استعملت بعض الشرائح لغرض فحص الغشاء مباشرة تحت المجهر الضوئي بعد صبغها بصبغة كرام (Flint *et al.*, 1997).

النتائج والمناقشة

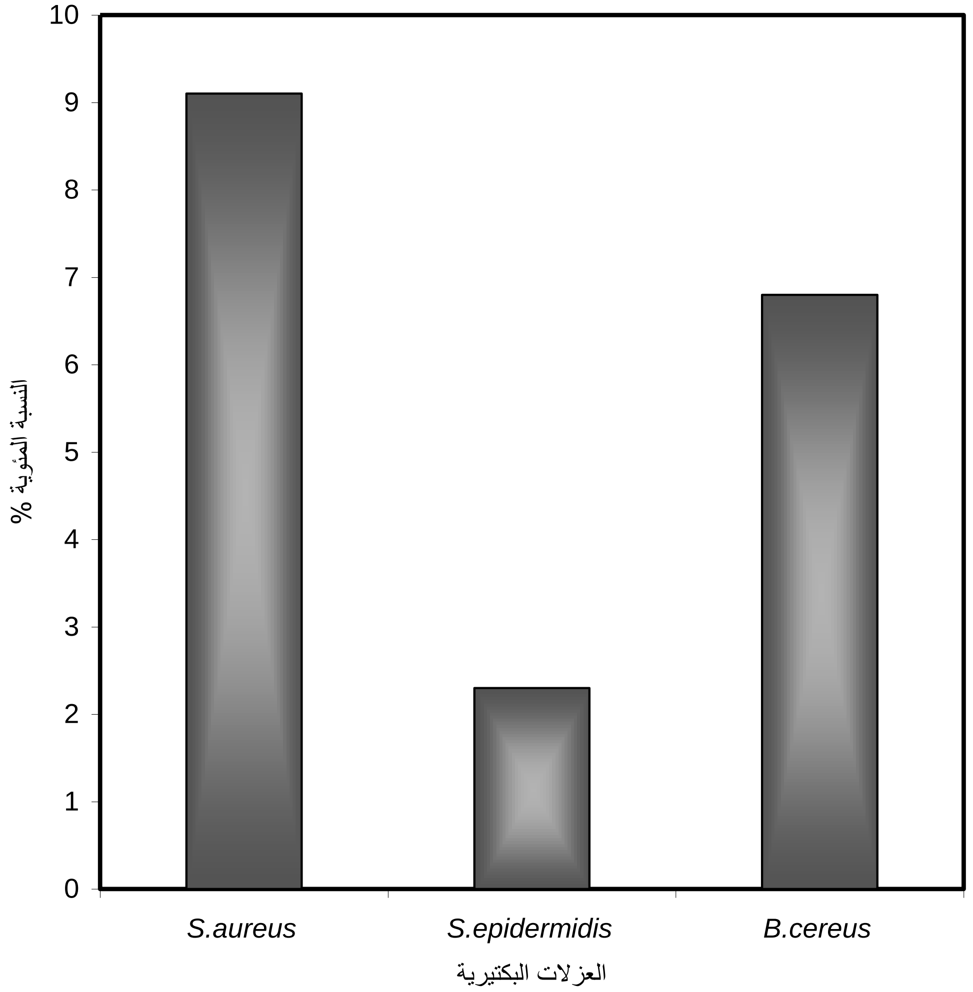
عزلت 44 عزلة بكتيرية من الأغشية الحيوية المتكون على السطح الداخلي لحاويات الحليب وتبين أن البكتريا السالبة لصبغة كرام هي السائدة وبنسبة 81.8% (شكل1). شكلت بكتريا *Escherichia coli* أعلى النسب إذ بلغت 20.5% في حين كانت البكتريا التابعة لأجناس *Salmonella ,Pseudomonas, Klebsiella, Enterobacter, Proteus ,Citrobacter, Neisseria* و *Shigella* بنسب 13.6, 11.4, 11.4, 6.8, 6.8, 4.5, 4.5 و 2.3% على التوالي (شكل2). أما البكتريا الموجبة لصبغة كرام فعزلت بنسبة 18.2% وكانت الانواع العائدة لأجناس *Staphylococcus* و *Bacillus* بنسبة 11.4% و 6.8% على التوالي (شكل3). ذكر ÓToole وآخرون(2000a&b) إن بكتريا *E.coli* و *P.aeruginosa* هي الشائعة في تكوين الغشاء الحيوي وان البكتريا السالبة لصبغة كرام هي السائدة فيه على البكتريا الموجبة لصبغة كرام ومع هذا وجد إن بعض الانواع العائدة للعنقوديات لها القدرة على تكوينه. أكد Flint وزملاءه (1997) على إن هذا الغشاء هو



شكل 1. النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام والمتحركة وغير المتحركة المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب



شكل 2. النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة لصبغة كرام المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب



شكل 3. النسب المئوية للعزلات البكتيرية الموجبة لصبغة كرام المعزولة من المسحات الجدارية لحاويات الحليب

متعدد الأنواع البكتيرية وأشار Zottola(2001) إلى إمكانية تكوينه من قبل البكتريا المرضية أيضاً. كانت البكتريا المتحركة ذات قدرة على تكوين الغشاء الحيوي وبنسبة 68.2% أما غير المتحركة فكانت بنسبة 31.8% (شكل1). وجد إن معدل العدد البكتيري الكلي الحي المستحصل عليه من عملية المسح هو $10X6^{4}$ خلية/مل/ سم^{2} وجاء هذا مقارباً لما وجده Jessen وLammert (2001) إذ بلغ العدد البكتيري الحي $10\ X3.7^{4}$ خلية/مل/ سم^{2}.

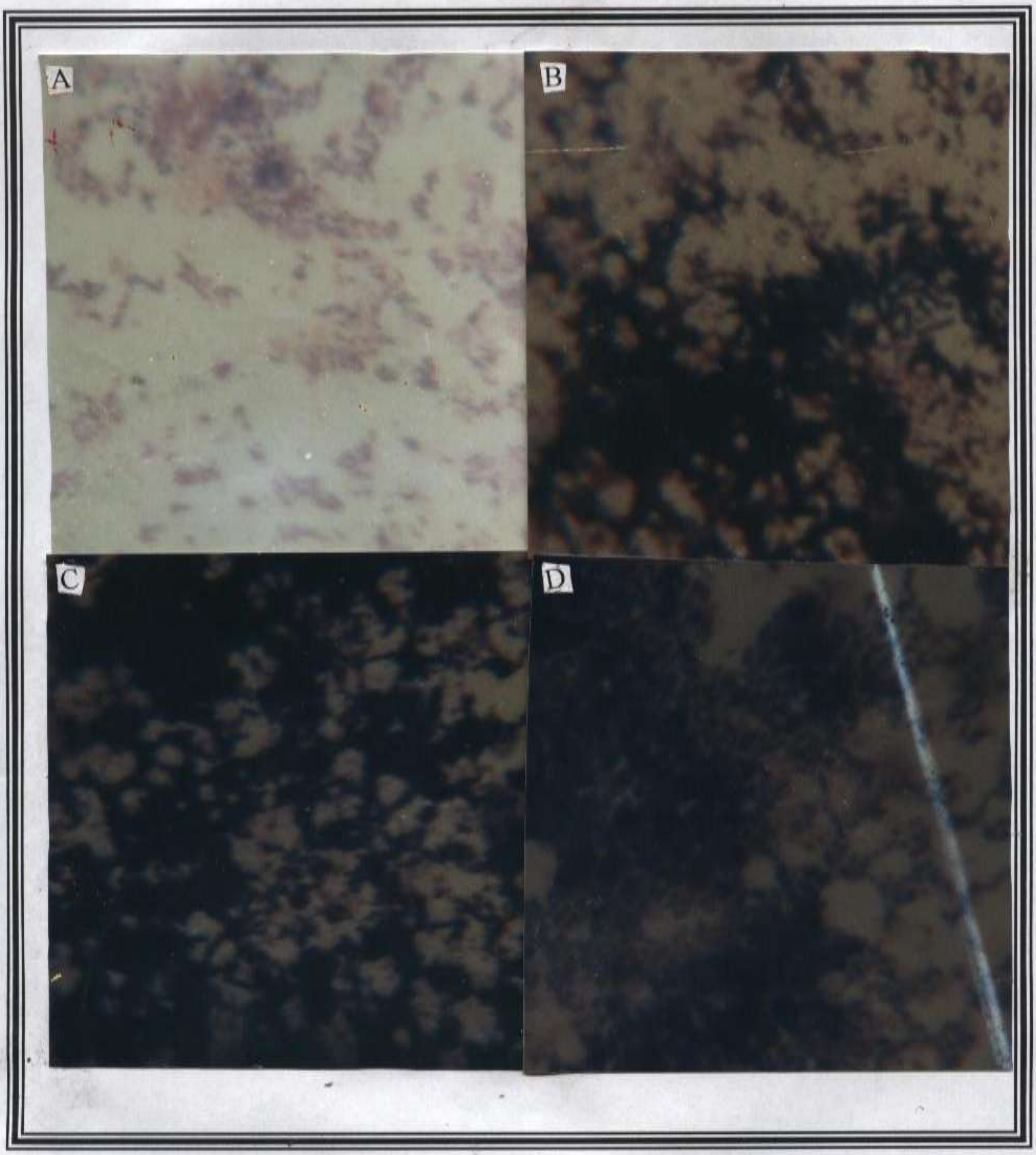
أظهرت نتائج هذه الدراسة أن 55% من العينات تقارب فيها العدد الكلي الحي للمسحات الثلاث إذ شهدت زيادة في إعداد البكتريا بشكل متدرج من المسحة الأولى إلى الثالثة ولكل موقع وفي كلا الموقعين, في حين أظهرت 20% من العينات تناقص في أعداد البكتريا. شهدت 25% من العينات زيادة في أعداد البكتريا في موقع ونقصانها في موقع أخر (جدول1). تعد الزيادة الحاصلة بشكل متدرج في أعداد البكتريا من المسحة الأولى إلى الثالثة للموقع الواحد إلى آلية تكون الغشاء الحيوي في ذلك الموقع وان الانخفاض الطفيف يعد مقبولاً إلى حد ما وهذا ما ذكره Jessen و Lammert (2001) وقد يعود تغير الأعداد من موقع إلى آخر إلى تغير نسجة السطح الذي قد يكون أملس يعيق عملية الالتصاق وقد يكون خشن يساهم في تعزيز الارتباط إذ يحمي البكتريا من قوى الضغط وحركة السوائل وتساعد كبر مساحته السطحية على نمو أعداد كبيرة من البكتريا(Donlan, 2002) .

يظهر شكل 4 المراحل الأربعة لآلية تكون الغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية الغاطسة إذ يبين A التصاق أعداد قليلة من البكتريا في حين يظهر B تزايد أعداد البكتريا الملتصقة وهذا يعود إلى نمو وتكاثر الخلايا الملتصقة أما في C فيظهر بدء تكون المستعمرات المجهرية التي تكون على شكل بقع أو مجاميع وأخيراً يبين D تكون الغشاء الحيوي ويظهر فيه اندماج المستعمرات المجهرية مع بعضها لتكون غشاء مستمر. لقد ذكر في دراسات سابقة أن الغشاء الحيوي يتكون من عدة مراحل (ỎToole *et al*., 2000a; Donlan, 2002; Espinosa-Urgal, 2003).

إن النسب المؤية للعزلات البكتيرية الملتصقة على الشرائح الزجاجية الغاطسة موضحة في شكل 5 إذ عزلت 150 عزلة وكانت نسب الأنواع البكتيرية العائدة لأجناس *Klebsiella, Staphylococcus , Escherichia , Pseudomonas, Enterobacter, Bacillus, Streptococcus, Salmonella, Proteus* و*Citrobacter* هي 25.30 , 16.67, 12.67, 12.67, 15.35, 4, 4, 4, 2.67 و 2.67 %على التوالي.

جدول1. تقدير تكّون الأغشية الحيوية على جدار حاويات الحليب بطريقة المسحة الجدارية

رقم العينة	رقم الموقع	العدد البكتيري الكلي الحي $\times 10^4$ خلية /مل/سم^2		
		المسحة الأولى	المسحة الثانية	المسحة الثالثة
1	1	4.2	5.5	6.3
	2	3.1	2.9	5.2
2	1	1.9	3.3	5.1
	2	2.2	2.6	4.5
3	1	8.7	9.1	11.2
	2	5.3	4.6	6.5
4	1	2.7	2.9	3.2
	2	4.4	5.1	5.9
5	1	0.7	1.8	0.2
	2	2	1.4	0.9
6	1	7.4	5.7	6.7
	2	5	10.3	8.7
7	1	6.5	4.9	7.6
	2	0.9	11.5	12.1
8	1	5.5	3.4	2.9
	2	3	4.6	1.1
9	1	5.7	4.8	9.5
	2	4.2	10.5	11.3
10	1	4.8	6.6	10.5
	2	5.1	7.1	8.4
11	1	10.3	9.8	11.4
	2	9.2	8.6	8.1
12	1	3.7	2.3	1.8
	2	4.2	3.5	3.2
13	1	14	9.6	11.5
	2	10.5	8.7	9.2
14	1	3	4.1	5.9
	2	1.2	2.7	4
15	1	11.5	12.3	13.7
	2	9.1	10.4	12.1
16	1	6.5	8.2	12.5
	2	3.4	6.8	5
17	1	1.1	3.9	5.5
	2	2.9	4.5	1.2
18	1	2.6	1.5	0.8
	2	2.1	3.3	2.5
19	1	7.4	4	6.3
	2	0.5	4.3	7.5
20	1	8.9	9.7	11.5
	2	10.1	11.4	12.3



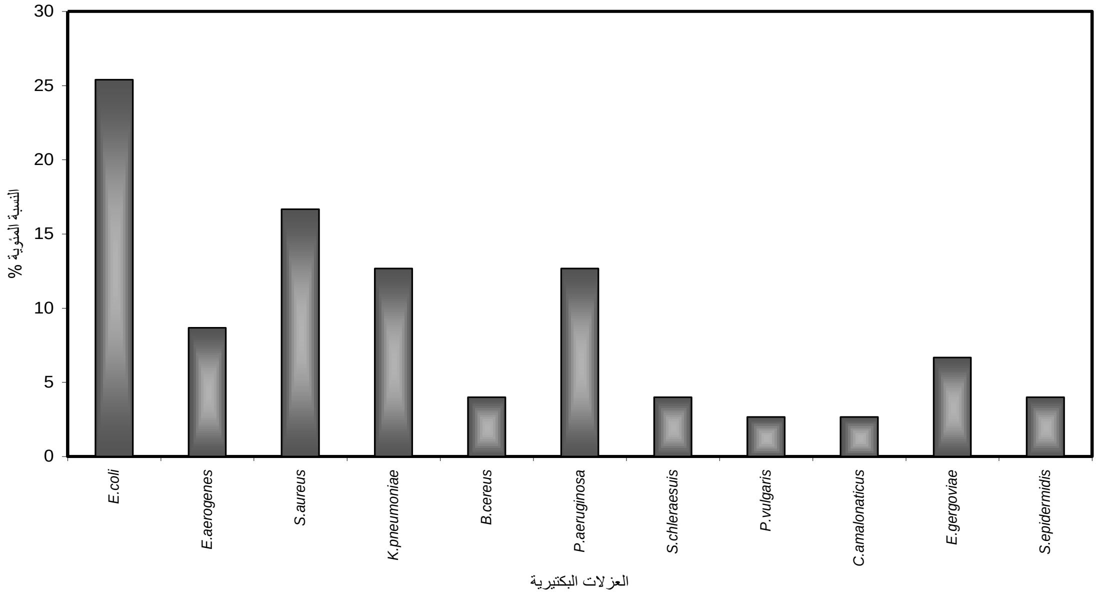
شكل 4. مراحل تكون الغشاء الحيوي على الشرائح الزجاجية الغاطسة. A: بدء التصاق البكتريا بعد 6 ساعات. B: نمو وتكاثر البكتريا الملتصقة بعد 24 ساعة. C: تكون المستعمرات المجهرية بعد 28 ساعة. D: اندماج المستعمرات المجهرية وتكوين الغشاء الحيوي بعد 48 ساعة.

تبين إن البكتريا السالبة لصبغة كرام هي السائدة وبنسبة 75.3% في الغشاء الحيوي المتكون
على الشرائح الزجاجية في حين كانت البكتريا الموجبة بنسبة 24.7% وقد نافست البكتريا المتحركة (66.7%) البكتريا غير المتحركة (33.3%) في عملية تكوين الغشاء الحيوي (شكل6). لقد أشار ỎToole وزملاءه (2000a) إلى إن وسائل الحركة (الاسواط والأهداب) تزيد من نشاط البكتريا وتسارع من عملية تكوين الغشاء الحيوي. بلغ معدل العدد اللوغارتمي للبكتريا الملتصقة على الشرائح الزجاجية الغاطسة في الأوقات الزمنية الأنفة الذكر(المواد وطرائق العمل الفقرة 3) 1.10, 3.10, 3.36, 3.49, 5.22, 5.34, 5.56, 6.64 خلية/مل على التوالي(شكل 7). إن الزيادة التدريجية في أعداد البكتريا بزيادة وقت الحضانة تشير إلى نمو وتكاثر البكتريا الملتصقة من جهة وازدياد أعداد البكتريا المضافة لسطح الالتصاق من جهة أخرى والتي تؤدي إلى إنضاج الغشاء .

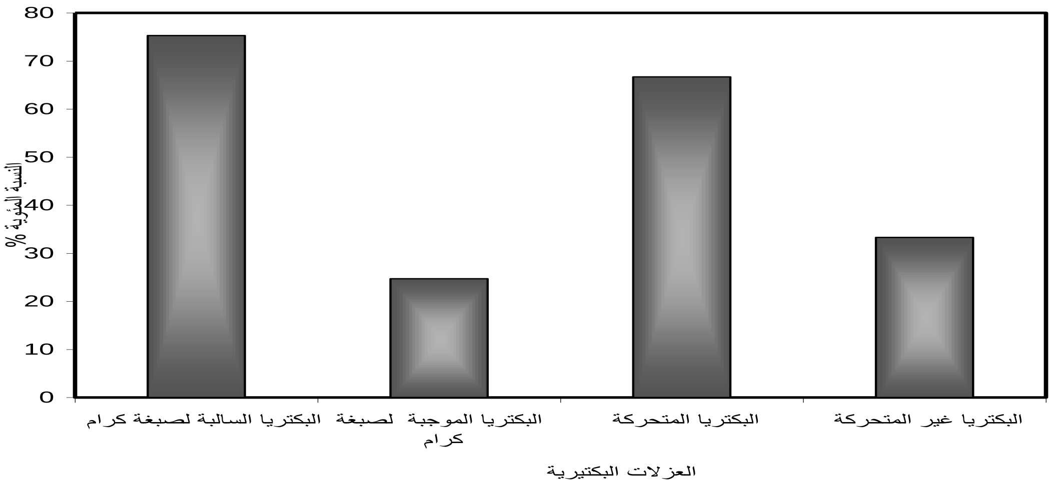
أن الحليب وسط غذائي مثالي لنمو وتكاثر البكتريا وإنتاج سمومها فيه وان تكون الأغشية الحيوية سوف يزيد من ديمومتها ويوفر لها الحماية لذا تخلص هذه الدراسة إلى السيطرة على عمليات تداول الحليب وحاوياته وإزالة الأغشية الحيوية منها, وتوصي بأجراء الدراسات الوراثية لمعرفة المزيد عن الأسس الوراثية التي يتكون فيها الغشاء الحيوي.

شكر وتقدير

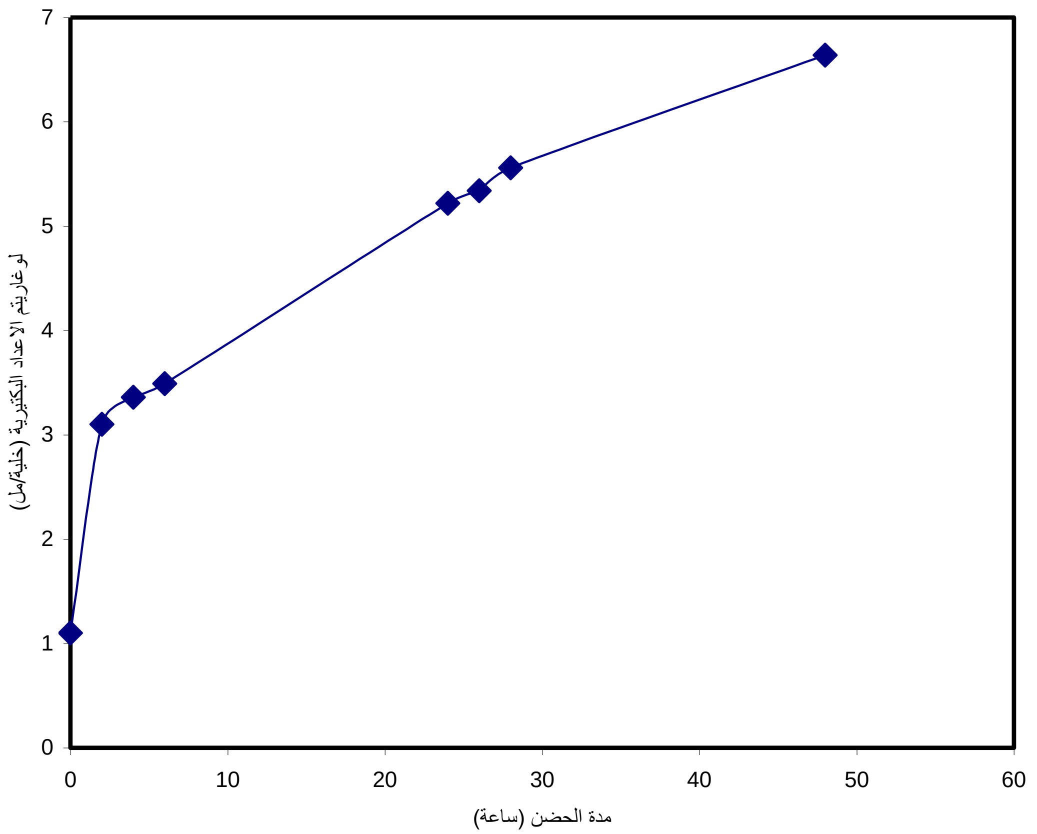
يقدم باحثوا هذه الدراسة الشكر والامتنان إلى كل من مد يد العون والمساعدة لإنجاز هذا الجهد المتواضع والله ولي التوفيق.



شكل 5. النسب المئوية للعزلات البكتيرية المعزولة من الشرائح الزجاجية



شكل 6. النسب المئوية للعزلات البكتيرية السالبة والموجبة لصبغة كرام والبكتريا المتحركة وغير المتحركة المعزولة من الشرائح الزجاجية



شكل 7. منحنى نمو الخلايا البكتيرية الملتصقة على الشرائح الزجاجية المغمورة في حاويات الحليب

References

Baillie, G.S. and Douglas, L.J. 1999. Role of dimorphism in the development of *Candida albicans* biofilms. J. Med. Microbiol. *48(7)*: 671- 679.

Chmielewski, R.A. and Frank, J.F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. J.CRFSFS. *2:* 22-32.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S. and Greenberg, E.P. 1999. Bacterial biofilm: a common cause of persistent infections. Sci. J. *284(5418):* 1318-1322.

Donlan, R.M. 2002. Biofilm: microbial life on surfaces. J. Emer. Infect. Dis. *8(9):* 881-890.

Espinosa-Urgel, M. 2003.Resident parking only: rhamnolipids maintain fluid channels in biofilms. J. Bacteriol. *185(3):* 699-700.

Flint, S.H.; Brooks, J.D. and Bremer, P.J. 1997. Use of the malthus conductance growth analyser to determine number of thermophilic Streptococci on stainless steel. J. Appl. Microbiol. *83:* 335-339.

ICMSF. 1998. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. 1st ed. Blackie Academic and Professional. London, UK. pp: 521-532.

Jessen, A.B. and Lammert, O.L. 2001. Biofilm and Disinfection in Meat Processing Plants. 2nd International Symposium on Disinfection and Hygine. Wageningen, Holland.

Macfaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippin Cott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA.

O'Toole, G.; Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000a. Biofilms formation as microbial development. Annu. Rev. Microbiol. *54*: 49-79.

O'Toole, G.A; Gibbs, K.A.; Hager, P.W.; Phibbs, P.V. and Kolter, R. 2000b. The global carbon metabolism regulator *CrcIs*, a component of signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. *182(2)*: 425-431.

Wimpenny, J.2000.An overview of Biofilms as Functional Communities. In: Community Structure and Cooperation in Biofilms. Allison, D.G.; Gilbert, P.; Lappin Scott, H.M. and Wilson, M. (eds). The Society for General Microbiol. London, UK. pp: 1-19.

Yoo, J.A. and Chen, X.D. 2002. An emission pattern of thermophilic bacteria attached to or imbedded in porous supports. Int. J. Food Microbiol. *73(1):* 11-21. (Abs).

Zottola, E.A. 2001. Reflections on *Salmonella* and other wee beasties in foods. J. Food Tech. *55(9):* 60-67.