نشریه آموزشی- پژوهشی موسسه تحقیقات علوم دامی کشور
فصلنامه تحقیقات کاربردی در علوم دامی
شماره ٤٤، پاییـز ١٤٠١
ص‌ص: ٣٧~٤٢

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم در *اشریشیاکلی* جداشده از مدفوع شتر های سالم شهرستان مشهد به روش کنگو رد آگار

• **مجید جمشیدیان مجاور[1]، محدثه امیری[2]، علیرضا صدر[3]، سید الیاس طباطبایی زاده[4]، فاطمه امانی[5]،رضا محمد زاده[6] ،حمید رضا فرزین[7*]**

۱و۳و۴و۷. استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، ایران.

۲. بخش تحقیقات – مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شعبه مشهد، مشهد، ایران.

۵. دکتری تخصصی باکتری شناسی، آزمایشگاه مرکزی اداره کل دامپزشکی استان خراسان رضوی، سازمان دامپزشکی کشور.

۶. دانش آموخته ی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشگاه پیام نور مشهد.

تاریخ دریافت : اردیبهشت ۱۴۰۱ تاریخ پذیرش : شهریور ۱۴۰۱

شماره تماس نویسنده مسئول: ۰۲۶۳۴۲۵۶۰۰۱
Email: hrfarzin@yahoo.com

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22092/ aasrj.2022.128153

چکیده:

هدف از مطالعه ی پیش رو بررسی تولید و توانایی تشکیل بیوفیلم در جدایه های *اشریشیاکلی* جداشده از مدفوع شتر های سالم شهرستان مشهد می باشد. بیوفیلم را می توان یک اجتماع باکتریایی نامید که باکتری ها می توانند به سطوح مختلفی اعمم از زنده یا غیر زنده متصل شوند. *اشرشیاکلی* از اعضای باکتریایی کامنسال و میکروبیوتای دستگاه گوارش در انسان ها و حیوانات خون گرم می باشد. این باکتری، بی هوازی اختیاری و میله ای گرم منفی است. سویه های *اشرشیاکلی* به ۲ گروه بیماری زا و غیر بیماری زا تقسیم بندی می شوند؛ که سویه های بیماری زا به ۲ گروه روده ای و خارج روده ای تقسیم بندی می گردند.

در این مطالعه ۲٦ سوآپ معقدی از شتر های سالم شهرستان مشهد جمع آوری شد. سوآپ های مقعدی بر روی محیط کشت مک کانکی آگار کشت داده شدند و جدایه های بدست آمده توسط تست های بیوشیمیایی مورد تایید قرار گرفتند. جدایه های فوق برای تشکیل بیوفیلم به روش کنگو رد آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

در این مطالعه ، ۸۰/۷٦ درصد از ایزوله ها دارای بیوفیلم قوی و ۱۵/۳۸ درصد بیوفیلم متوسط بودند.

با توجه به تولید بیوفیلم در باکتری ها و اهمیت آن در بیماری زایی بررسی تولید بیوفیلم به روش های فنوتیپی و ژنوتیپی مهم می باشد.

واژه‌های کلیدی: *اشریشیاکلی*، بیوفیلم، روش های فنوتیپی، شتر

Applied Animal Science Research Journal No 44 pp: 37-42

Evaluation of biofilm formation ability in Escherichia coli isolated from feces of healthy camels in Mashhad by Congo red agar method

Majid Jamshidian-Mojaver[1],Mohadese Amiri[2], Ali Reza Sadr[3], Seyed-Elias Tabatabaeizadeh[4], Fatemeh Amani[5], Reza Mohamadzadeh[6], Hamidreza Farzin[7]
1,2,3,4,7.Mashhad Branch, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran.
5. PhD in Bacteriology,Central Laboratory of the Veterinary Head Office of Khorasan Razavi Province, Veterinary Organization of the country.
6. Graduate of Biochemistry, Payame Noor University of Mashhad.

Received: May 2022 **Accepted: September 2022**

The aim of the present study was to investigate the production and ability of biofilm formation in *Escherichia coli* isolates isolated from feces of healthy camels in Mashhad. Biofilms can be called a bacterial community where bacteria can attach to different levels, whether living or non-living. *Escherichia coli* is a commensal bacterial member of the gastrointestinal microbiota in humans and warm-blooded animals. It is an optional anaerobic bacterium and a gram negative rod. *Escherichia coli* strains are divided into two pathogenic and non-pathogenic groups; the pathogenic strains are divided into two intestinal and extra-intestinal groups.
In this study, 26 digestive swabs were collected from healthy camels in Mashhad. Anal swaps were cultured on MacConkey agar medium and the isolates were confirmed by biochemical tests. The above isolates were examined for biofilm formation by Congo Red Agar method.
In this study, 80.76% of isolates had strong biofilm and 15.38% had moderate biofilm.
Considering biofilm production in bacteria and its importance in pathogenesis, it is important to study biofilm production by phenotypic and genotypic methods.

Key words: Biofilm, Camel, *Escherichia coli*, Phenotypic methods

مقدمه

بیوفیلم های میکروبی، به عنوان تجمع میکروارگانیسم ها و اتصال محصولات خارج سلولی بر روی سطح و یا به یکدیگر در فاصله ای دور از یک سطح تعریف شده اند. این ساختار ها به صورت گسترده در طبیعت و در محیط یافت می شوند، در مکان هایی از فرمانتور های مواد غذایی گرفته تا لوله های حفاری چاه نفت، بدنه کشتی و در ارتباط با بیماری های دامی و انسانی می باشد (۱). برای بیوفیلم های مرتبط با بیماری های عفونی ارائه آمار و ارقام دقیق شیوع و بروز آنها دشوار است . بیوفیلم ها با بسیاری از شرایط از جمله پلاک های دندانی، عفونت های دستگاه تنفسی فوقانی، پریتونیت، عفونت های ادراری تناسلی و بیماری های مرتبط با تجهیزات پزشکی از جمله قلب مصنوعی در ارتباط هستند (۲). میکروارگانیسم ها با تشکیل پلی ساکارید های خارج سلولی به سطوح می چسبند و بیوفیلم تولید می کنند .بیوفیلم ها به دلیل افزایش مقاومت ارگانیسم های درون آن نسبت به دارو های ضد میکروبی یک مشکل جدی در بهداشت عمومی ایجاد می کنند . بیوفیلم به عنوان استراتژی برای بعضی از باکتری ها محسوب می شود تا بتوانند در برابر عوامل آسیب رسان از خود محافظت نموده و دچار آسیب نشوند (۳و۴).

فرآیند تشکیل بیوفیلم

بیوفیلم ها به طور گسترده در طی سی سال اخیر مطالعه شده اند و در مورد روند اتصال میکروبی و شروع تشکیل بیوفیلم اطلاعات زیادی به دست آمده است .برای درک اتصال که اولین مرحله

در تشکیل بیوفیلم است، لازم است که خصوصیات سطح لایه و سطح سلول از نزدیک مورد بررسی قرار گیرند .سطح زیرلایه می تواند از مواد آبگریزی مثل تفلون، انواع پلاستیک، لاتکس و سیلیکون تا مواد آبدوست مثل شیشه و انواع فلزات تشکیل شده باشد . برخی مواد ساختار خشن یا پر تار و پودی دارند مثل لوله های آب و سطوح محیطی در حالی که برخی دیگر بسیار نرم و صاف هستند مثل کاتتر های تفلونی یا سیلیکونی، همچنین برخی سطوح دارای خواص ضد میکروبی هستند که باید در نظر گرفته شود مثل کاتتر های آغشته به آنتی بیوتیک، یا حلقه دوخت دریچه قلب و لوله های فلزی ساخته شده از مس یا آلیاژ های حاوی مس. خصوصیات زیرلایه می تواند تاثیر بسزایی روی سرعت و میزان اتصال میکروارگانیسم ها داشته باشد (۵و ۶). هرچه مواد خشن تر و آب گریز تر باشند، بیوفیلم ها سریع تر روی آن ها رشد می کنند .وضعیت زمانی پیچیده تر می شود که زیر لایه در محیط مایع قرار بگیرد (اقیانوس آزاد، جریان خون و یا مجاری ادراری) در این شرایط زیرلایه یک لایه بسترساز یا پوششی متشکل از عمدتا مواد پروتئینی که در مایع وجود دارد را به دست می آورد (۷) .این لایه بسترساز، با پوشاندن سطح زیرلایه خصوصیات شیمیایی جدیدی را به آن می دهد به طور مثال بلافاصله پس از قرار گرفتن یک وسیله پزشکی در معرض مایعات بدن مثل خون، بزاق یا ادرار، مؤلفه های ماکرومولکولی جهت تشکیل یک لایه بسترساز جذب می شوند .بسیاری از این مولکول ها پروتئینی هستند، مانند آلبومین سرم، فیبرینوژن، کلاژن، و فیبرونکتین .نشان داده شده که برخی از آن ها موجب چسبندگی متعاقب باکتری ها می شوند (۷و۸).

باکتری *اشریشیاکلی*، که به طور طبیعی از دستگاه گوارش انسان و حیوان جداسازی می شود، از مهم ترین اعضای میکروبیوتا (فلور طبیعی) این دستگاه محسوب شده و فرم بیماری زای آن ایجاد کننده ی عوارض بسیار مهمّی در انسان و حیوان می باشد سویه های بیماری زا به دو گروه پاتوژن های روده ای و خارج روده ای تقسیم می شوند (۹و ۱۰).

مواد و روش کار

جمع آوری نمونه

در این مطالعه ۲۶ نمونه از مدفوع شتر های سالم جمع آوری شد. نمونه های مدفوع توسط سوآپ مقعدی اخذ و بلافاصله در محیط انتقالی Amies قرار داده شد. پس ازانتقال نمونه ها در کنار یخ در کمتر از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه، نمونه ها به طور مستقیم در محیط مک کانکی آگار کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. جهت تایید، جدایه ها آزمایشات بیوشیمیایی (تست اوره، سیمون سیترات، TSI و SIM) انجام گرفت.

تشخیص تولید بیوفیلم در جدایه های *اشریشیاکلی*

تمامی جدایه های *اشریشیاکلی* به منظور شناسایی تشکیل بیوفیلم با روش کنگورد آگار مورد بررسی قرار گرفتند.

روش کنگو رد آگار

به منظور تهیه این محیط ابتدا محیط برین هرت اینفوژن براث به همراه آگار را تهیه نموده و معرف کنگورد را نیز به صورت جداگانه به فرم محلول آبی تهیه نموده سپس دو محلول فوق اتوکلاو گردید. پس از اتوکلاو محیط فوق ساکارز را فیلتر نموده و محیط اضافه شد.

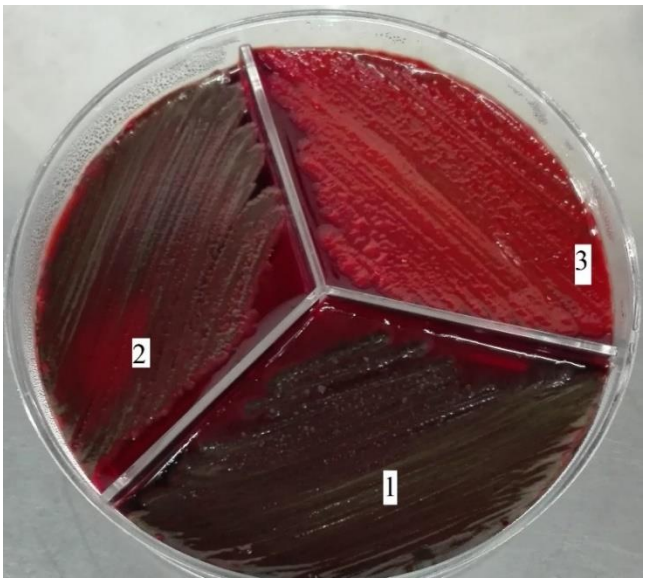
به منظور بررسی بیوفیلم باکتری ذکر شده، تک کلنی از جدایه های مورد نظر را از محیط مک کانکی آگار به محیط کنگو رد انتقال داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند.

نتایج

نتایج حاصله از جدایه های *اشریشیاکلی* تشکیل دهنده ی بیوفیلم با روش کنگو رد آگار براساس خصوصیات ظاهری کلنی هایشان تفسیر گردیدند. جدایه های مورد مطالعه از لحاظ تولید بیوفیلم به سه گروه تقسیم بندی شدند؛ جدایه های دارای کلنی های سیاه و لبه های خشن، جدایه های دارای کلنی های قرمز رنگ با لبه های خشن و جدایه های که دارای کلنی هایی قرمز رنگ با سطحی صاف که به ترتیب به عنوان تولید کننده های بیوفیلم قوی، متوسط و عدم تولید بیوفیلم در نظر گرفته شدند.

جدول ۱: تولید بیوفیلم به روش کنگو رد آگار

باکتری مورد مطالعه	بیوفیلم قوی	بیوفیلم متوسط	فاقد بیوفیلم
اشریشیاکلی	۸۰/۷۶ درصد	۱۵/۳۸ درصد	۳/۸۴ درصد



تصویر شماره ۱
تشکیل بیوفیلم جدایه ها به روش کنگو رد آگار
۱و ۲: بیوفیلم قوی/۳: بیوفیلم متوسط

بحث

بیوفیلم ها ساختارهایی متشکل از سلول های باکتری بهم چسبیده در داخل یک ماتریکس پلیمری هستند که توسط خود این باکتری ها ساخته می شود و سبب اتصال باکتری به سطوح زنده و غیر زنده می گردد (۱۱).

در مطالعه حاضر از میان ۲۶ ایزوله *اشریشیاکلی* جداشده از نمونه های ۲۶ نفر شتر، ۸۰/۷۶ درصد ایزوله ها دارای بیوفیلم قوی،۱۵/۳۸ درصد درای بیوفیلم متوسط و ۳/۸۴ درصد فاقد بیوفیلم بودند.

در مطالعه ی خرمیان طوسی و همکاران که در سال ۱۳۸۸ در تهران صورت پذیرفت، توانایی تشکیل بیوفیلم را بیماری ورم پستان گاو ها مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که ۴۳/۴ درصد جدایه ها دارای بیوفیلم قوی، ۴۰ درصد جدایه ها دارای بیوفیلم متوسط و ۴/۴ درصد جدایه ها فاقد بیوفیلم بودند (۱۲).

Zmantar و همکاران در سال ۲۰۰۸ به بررسی تشکیل بیوفیلم توسط باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* جدا شده از عفونت های گوش انسان پرداختند که نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که ۵۶/۵ درصد جدایه توانایی تولید بیوفیلم را داشتند (۱۳).

نصرتی و همکاران در مطالعه ای که سال ۲۰۱۷ بر روی ۱۰۰ نمونه جدا شده از موارد عفونت ادراری تولید بیوفیلم را بررسی نمودند.

در این پژوهش ۴ درصد جدایه دارای بیوفیلم قوی و ۶۵ درصد جدایه دارای بیوفیلم متوسط در روش کنگو رد آگار بودند.در بررسی جدایه ها به روش کدورت لوله ۲۳ درصد دارای بیوفیلم قوی و ۵۹ درصد دارای بیوفیلم متوسط بودند (۱۴).

نتیجه گیری

با توجه به تولید بیوفیلم در باکتری ها و اهمیت آن در بیماری زایی بررسی تولید بیوفیلم به روش های فنوتیپی نظیر تست لوله و میکروپلیت و روش ژنوتیپی مانند بررسی ژن های *icaA* و *icaD*مهم می باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه تحقیقات مؤسسه "تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی "شعبه شمال شرق کشور که از هیچ کوششی در راستای انجام این مطالعه دریغ ننمودند، تشکر و قدردانی می نمایند.

منابع

1. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*,2(2):95-108

2. Lemon, K.P., D.E. Higgins, and R. Kolter. (2007). Flagellar motility is critical *for Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 189(12): 4418-4424.

3. Bjarnsholt, T. (2013). The role of bacterial biofilms in chronic infections. Apmis, 12 (6):. 1-58.

4. Dragoš, A. and Á.T. Kovács,(2017). The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix. *Trends in Microbiology*..

5. Böhme, A., U. Risse Buhl, and K. (2009). Küsel, Protists with different feeding modes change biofilm morphology. *FEMS microbiology ecology*, 69(2): 158-169.

6. Stoodley, P. and Z. Lewandowski.(1994). Liquid flow in biofilm systems. *Applied and environmental microbiology*, 60(8): 2711-2716.

7. Wu, Z., et al. (2013). Evidence for broad-spectrum biofilm inhibition by the bacterium *Bacillus* sp. strain SW9. *Applied and environmental microbiology*, 79(5): 1735-1738.

8. Thomas, C.M. and K.M. Nielsen. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature reviews microbiology*, 3(9): 711-721.

9. Mordi, R. M., & Erah, P. O. (2006). Susceptibility of common urinary isolates to the commonly used antibiotics in a tertiary hospital in southern Nigeria.African *Journal of Biotechnology*, 5(11):100-110.

10. Walters, M. S., & Mobley, H. L. (2009). Identification of uropathogenic *Escherichia coli* surface
proteins by shotgun proteomics. *Journal of microbiological methods*, 78(2): 131-135.

11. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, 2(2):95-108.

12. Babak Khorramian Tousi, Mohammad Iman Eni, Mahmoud Bolourchi. Evaluation of biofilm formation ability in isolated *Staphylococcus aureus* From Oram Breast to farms around Tehran.

13. Zmantar, T., Chaieb, K., Makni, H., Miladi, H., Abdallah, F.B., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2008). Detection by PCR of adhesins genes and slime production in clinical *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol*, 48(4):308-14.

14. Nosrati N, Honarmand Jahromy S, Zare Karizi S. (2017). Comparison of Tissue Culture Plate, Congo red Agar and Tube Methods for Evaluation of Biofilm Formation among *Uropathogenic E. coli* Isolates. *Iran J Med Microbiol*, 11(3):49-58.