Archive of SID

Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 12, Number 3 (July - August)

Journal homepage: www.ijmm.ir

# Biofilm Formation of *Salmonella typhimurium* on Stainless Steel in Red Meat Model and the Effect of Bacteriophage on Bacterial Biofilm

**Hossein Tajik, Mehran Moradi, Mostafa Alipour, Hadi Ghasemmahdi**

Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

## *Article Information*

**Article history:**
Received: 2017/04/09
Accepted: 2018/07/02
Available online: 2018/10/11

**Article Subject:**
Clinical Microbiology

**IJMM 2018; 12(3): 179-188**

**Corresponding author:**

**Mehran Moradi**
Department of Food Hygiene and Quality Control, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia University, Urmia, Iran

**Tel:** 044-31942633
**Email:**
m.moradi@urmia.ac.ir

**Use your device to scan and read the article online**

## *Abstract*

**Background and Aims:** The application of bacteriophage to control and removal of bacterial biofilm is a novel method. The goal of this study was to investigate the effect of the *Salmonella typhimurium* bacteriophage against biofilm of a multidrug resistance (MDR) Salmonella formed on stainless steel in beef broth.

**Materials and Methods:** One and 7 days old biofilm were grown at 15, 8 and 4 °C, on the stainless steel in beef broth and the effects of different bacteriophage concentrations ($10^3$, $10^5$ and $10^7$ PFU/mL) with two contact times (10 and 15 min) were assayed.

**Results:** Results showed that *Salmonella* can adhere to stainless steel and form biofilm in the beef broth which was significantly influenced by temperature. Higher biomass of biofilm was developed at 15, 4 and 8 °C, respectively. One-day-old is less dense (~1 logarithmic cycle) than 7-day-old biofilm. No significant difference ($P$>0.05) in biofilm reduction was observed in samples treated with different concentration as compared with control. Statistical differences were also not observed in the different contact time (10 and 15 min).

**Conclusions:** These results indicated that there was no significant reduction in MDR *Salmonella* biofilm population developed on stainless steel in the beef broth after using the bacteriophage; it is needed to investigate some combination procedures or increase contact time to improve the biofilm removal activity of bacteriophage.

**Keywords:** Bacteriophage, *Salmonella typhimurium*, Biofilm, Red meat

Copyright © 2018 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

**How to cite this article**:

Tajik H, Moradi M, Alipour M, Ghasemmahdi H. Biofilm Formation of Salmonella typhimurium on Stainless Steel in Red Meat Model and the Effect of Bacteriophage on Bacterial Biofilm. Iran J Med Microbiol. 2018; 12 (3) :179-188



www.SID.ir

Archive of SID

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۱۲ – شماره ۳ – مرداد-شهریور ۱۳۹۷

Journal homepage: www.ijmm.ir

مقاله پژوهشی

Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

# تشکیل بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم* در سطح استیل زنگ‌نزن در مدل گوشت قرمز و اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلم باکتری

**حسین تاجیک، مهران مرادی، مصطفی علیپور، هادی قاسم‌مهدی**

گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

***اطلاعات مقاله***

**تاریخچهٔ مقاله**

**دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰**

**پذیرش:۱۳۹۷/۰۴/۱۱**

**انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹**

**موضوع:**

میکروب شناسی بالینی

**IJMM1397;12(3): 179-188**

**نویسندهٔ مسئول:**

**مهران مرادی**

گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

**تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۳۶۳۳**

**پست الکترونیک:**

**moradi.mehran@yahoo.com**

## چکیده

**زمینه و هدف:** استفاده از باکتریوفاژ در کنترل و حذف بیوفیلم عوامل باکتریایی روشی جدید است. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک تشکیل‌شده در سطح استیل زنگ‌نزن در مدل براث گوشت گاو است.

**مواد و روش کار:** بیوفیلم ۱ و ۷روزهٔ باکتری در سه دمای انکوباسیون ۴، ۸ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس روی استیل زنگ‌نزن در براث گوشت قرمز تشکیل و سپس اثر سه غلظت باکتریوفاژ ($10^3$، $10^5$ و $10^7$ پلاگ در هر میلی‌لیتر) در دو سطح تماس (۱۰ و ۱۵ دقیقه) بر بیوفیلمِ تشکیل‌شده، بررسی شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که *سالمونلا* توانایی تشکیل بیوفیلم در استیل زنگ‌نزن در براث گوشت را دارد و این توانایی تحت‌تأثیر دمای انکوباسیون است، به‌طوری که به‌ترتیب در دمای ۱۵، ۴ و ۸ درجهٔ سلسیوس بیشترین تشکیل بیوفیلم مشاهده شد. تجمع باکتری در بیوفیلم یک‌روزه، یک سیکل لگاریتمی کمتر از بیوفیلم ۷روزه بود. باکتریوفاژ در سه غلظت به‌کاررفته، اثر معنی‌داری بر بیوفیلم ۱ و ۷روزهٔ *سالمونلا* در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد ($P > ۰/۰۵$). همچنین، افزایش زمان تماس از ۱۰ به ۱۵ دقیقه، اثر معنی‌داری در کاهش بیوفیلم باکتری از سوی باکتریوفاژ نشان نداد.

**نتیجه‌گیری:** درمجموع نتایج این مطالعه نشان داد که باکتریوفاژ به‌کاررفته اثر مشخصی بر بیوفیلم ایزولهٔ مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک *سالمونلای* تشکیل‌شده در سطح استیل در مدل گوشت قرمز نداشت و بایستی از روش‌های ترکیبی و افزایش زمان تماس برای بهبود اثر ضدبیوفیلمی باکتریوفاژ استفاده کرد.

**کلمات کلیدی:** باکتریوفاژ، *سالمونلا تیفی‌موریوم*، بیوفیلم، گوشت قرمز

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفادهٔ علمی از این مقاله برای مجلهٔ میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

## مقدمه

بیوفیلم ساختار پلی‌ساکاریدی است که از طریق جمعیتی از سلول‌های باکتریایی در محیط پیرامونی ترشح می‌شود و آنها را نسبت به شرایط محیطی مقاوم می‌کند. شکل‌گیری و گسترش بیوفیلم تابع عوامل متعددی از جمله نوع باکتری، خصوصیات سطح، ویژگی‌های محیطی از جمله pH، میزان مواد مغذی و دما است. سلول‌های تولیدکنندهٔ بیوفیلم در مقایسه با شکل آزاد باکتری، مقاومت بالایی نسبت به عوامل ضدمیکروبی دارند؛ چراکه دارای ویژگی‌هایی هستند که باعث کاهش و یا جلوگیری از تماس آنها با عوامل ضدمیکروبی می‌شود. میکروارگانیسم‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و ایجادکنندهٔ فساد، توانایی تشکیل بیوفیلم‌ها را دارند. این ویژگی نقشی کلیدی در بسیاری از عفونت‌ها و آلودگی‌های ناشی از محصولات غذایی دارد. تشکیل بیوفیلم برای باکتری تحت شرایط محیطی سخت، استراتژی‌ای برای زنده‌ماندن محسوب می‌شود (۱،۲). توانایی باکتری در اتصال به سطوح بی‌جان و تشکیل بیوفیلم دغدغهٔ بسیاری از صنایع از جمله فرآوری محصولات گوشتی است. در این صنایع، پاک‌سازی



www.SID.ir

Archive of SID


Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

ناقص سطوح منجر به تجمع مواد آلی و غیرآلی می‌شود و حضور آب در این نقاط، امکان تشکیل بیوفیلم را افزایش می‌دهد (۳). به نظر می‌رسد یکی از علل بقای میکروارگانیسم در محیط به‌ویژه در محیط، فرآوری و عرضهٔ محصولات غذایی، توانایی باکتری‌ها از جمله *سالمونلا* در تشکیل بیوفیلم باشد. از سویی اهمیت آلودگی متقاطع در انتشار *سالمونلا* از سطوح در تماس با غذا نیز پدیده‌ای شایع است؛ لذا تشکیل بیوفیلم *سالمونلا* در سطوح و آلودگی متقاطع با این سطوح یک روش بالقوهٔ آلودگی محصولات غذایی به این باکتری است (۴). بنابراین درک روند تشکیل بیوفیلم از سوی *سالمونلا* و اثرات عوامل محیطی از جمله ویژگی‌های استاتیک سطح، شرایط محیطی، pH، دما و مواد مغذی در دسترس، در تشکیل بیوفیلم و اثرات ترکیبات ضدمیکروبی شیمیایی و یا طبیعی، اهمیت بسزایی در حذف و ریشه‌کن کردن باکتری دارد (۲،۵).

آلودگی میکروبی در کارخانه‌های فرآوری و کشتارگاه‌های دام، عمدتاً به‌دلیل آلودگی متقاطع بین وسایل با لاشه در بخش‌های مختلف فرآوری اتفاق می‌افتد. امکان آلودگی محصولات خام به باکتری‌هایی با توانایی تشکیل بیوفیلم که به‌صورت مختلط از مجموعه‌ای از باکتری‌ها تشکیل یافته‌اند، وجود دارد. برای کنترل بیوفیلم در چنین واحدهایی، داشتن دانش لازم در زمینهٔ محل تشکیل بیوفیلم و میکروارگانیسم‌های دخیل ضروری است. از آنجایی که در ماشین‌آلات صنایع غذایی، سطوح در تماس با موادغذایی اغلب از جنس استیل زنگ‌نزن است، استفادهٔ مکرر از این سطوح، باعث ایجاد خراشیدگی و زبری شده و به این خاطر لکهٔ موادغذایی روی این سطوح باقی مانده و باعث افزایش توانایی باکتری‌ها در اتصال، رشد و تشکیل بیوفیلم می‌شود. رشد این میکروارگانیسم‌ها روی تجهیزات و موادغذایی، باعث ایجاد آلودگی میکروبی در محصول شده و در نتیجه منجر به کاهش مدت‌زمان نگهداری محصول و افزایش شیوع بیماری‌های ناشی از غذا می‌شود (۶،۷).

در سالیان اخیر، استفاده از روش‌های جدید برای کنترل فرم آزاد و بیوفیلم *سالمونلا* در موادغذایی مطرح شده است. از این روش‌ها می‌توان به استفاده از گاز ازن، اولتراسوند، آب الکترولیز، فشار هیدروستاتیک بالا و باکتریوفاژ اشاره کرد (۸). امروزه، توجه ویژه‌ای به استفاده از اسانس و عصاره‌های گیاهی در جلوگیری و کنترل بیوفیلم باکتری‌ها می‌شود. در کنار ترکیبات گیاهی، استفاده از ترکیبات ضدبیوفیلم مثل آنزیم‌ها، مهارکننده‌های سیستم حدنصاب (Quorum sensing)، باکتریوسین‌ها، نانوامولسیون و سورفکتانت‌ها موردتوجه قرار گرفته‌اند. باکتریوفاژها نیز به‌عنوان دشمن طبیعی باکتری‌ها از ترکیبات ضدمیکروبی طبیعی با قابلیت حذف و کنترل بیوفیلم شناخته شده‌اند (۱). باکتریوفاژها، از پروتئین و اسیدنوکلئیک تشکیل شده و محصولات حاصل از شکستن آنها، اسیدهای آمینه و اسید نوکلئیک است؛ بنابراین به‌عنوان یک زنوبیوتیک (Xenobiotics) مطرح نیستند.

بیش از ۹۵ درصد باکتریوفاژهای مطالعه‌شده در مقالات و تقریبا تمام فاژهای مهم و مرتبط با باکتری‌های بیماری‌زا با منشأ غذایی، متعلق به راستهٔ کادوویرال‌ها یا فاژهای دم‌دار با DNA دو رشته‌ای هستند که براساس اندازهٔ دم به سه خانواده تقسیم می‌شوند. میوویریده (Myoviridae) فاژهایی با دم دراز و قابل‌انقباض هستند؛ (Siphoviridae) دُمی دراز دارند ولی قابلیت انقباض ندارند؛ پودوویریده‌ها (Podoviridae) که دُم‌کوتاه و بدون قابلیت انقباض هستند. اسیدنوکلئیک فاژها اغلب حاوی بازهای غیرمعمول یا تغییریافته است. این بازهای تغییریافته اسیدنوکلئیک فاژ را در برابر نوکلئازهایی که اسیدنوکلئیک میزبان را طی آلودگی به فاژ تجزیه می‌سازد، محافظت می‌کنند. اندازهٔ اسیدنوکلئیک بسته به نوع فاژ متغیر است (۹،۱۰).

پاک‌سازی و ضدعفونی سطوحی که روی آن فرآوری موادغذایی انجام می‌شود از آلودگی محصولات غذایی به عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. استفاده از ضدعفونی‌کننده‌های شیمیایی به ایجاد مقاومت در تعدادی از عوامل بیماری‌زا منجر شده است؛ بنابراین به‌کارگیری روش‌های جدید برای ضدعفونی کردن سطوح لازم است. اما زمانی که باکتری‌ها روی سطوح بیوفیلم تشکیل می‌دهند، زدودن آنها با ضدعفونی‌کننده‌ها سخت می‌شود. در سال‌های اخیر مطالعاتی برای جایگزینی موادشیمیایی با باکتریوفاژها به‌منظور حذف عوامل تولیدکنندهٔ بیوفیلم از سطوح انجام شده است. بر این اساس مطالعات مختلفی در زمینهٔ استفاده از باکتریوفاژ در حذف و کنترل بیوفیلم عوامل بیماری‌زا از جمله *کلبسیلا پنومونیه*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (۱۴-۱۱) در محیط کشت (۱۵،۱۶) و مدل‌های غذایی (۱۷،۱۸) انجام شده و موفقیت‌هایی نیز به دست آمده است. اثربخشی باکتریوفاژ بر بیوفیلم تحت‌تأثیر ویژگی‌های باکتریوفاژ، محیط تشکیل بیوفیلم و نوع و خصوصیات باکتری مدنظر است. در حال حاضر، استفادهٔ تجاری از باکتریوفاژ در کنترل عواملی بیماری‌زای با خواستگاه غذایی از محدودیت خاصی برخوردار است. این محدودیت، در وهلهٔ اول مربوط به نبود اطلاعات کافی و جامع دربارهٔ کاربرد این عوامل در موادغذایی


www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

است. تاکنون مطالعه‌ای در زمینهٔ اثرات دمای انکوباسیون بر روند تشکیل بیوفیلم *سالمونلا* و اثرات باکتریوفاژ در تشکیل بیوفیلم در مدل گوشت قرمز انجام نشده است. لذا این مطالعه با هدف ارزیابی امکان تشکیل بیوفیلم و اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم* مقاوم به آنتی‌بیوتیک تشکیل‌شده روی استیل زنگ‌نزن در مدل براث گوشت گاو انجام پذیرفت.

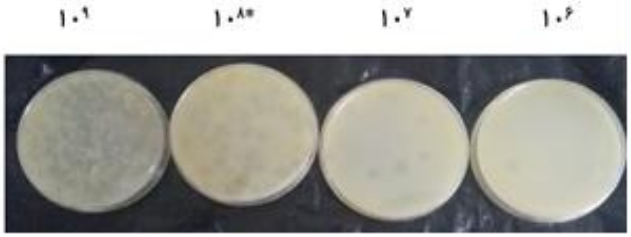
## مواد و روش‌ها

### تهیه و آماده‌سازی باکتری

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ در دانشکدهٔ دام‌پزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* با کد ST38 از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی دانشکدهٔ دام‌پزشکی دانشگاه ارومیه تهیه شد. خصوصیت تشکیل بیوفیلم قوی و مقاومت به چند داروی این جدایه قبلاً بررسی و مشخص شده است (۱۹). احیای باکتریایی به روش دومرحله‌ای در محیط لوریا برتانی براث انجام شد؛ به‌طوری‌که باکتری دو بار متوالی در محیط کشت لوریا برتانی براث به‌مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس کشت داده شد. برای به دست آوردن تعداد $۱/۵ \times ۱۰^{۸}$ باکتری در هر میلی‌لیتر (کدورت نیم مک‌فارلند)، از روش تعیین جذب نوری در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر به‌وسیلهٔ اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

### تهیهٔ استوک باکتریوفاژ

باکتریوفاژ STP38 لیتیک متعلق به خانوادهٔ *میروویریده* از گروه بهداشت و کنترل کیفی موادغذایی دانشکدهٔ دام‌پزشکی دانشگاه ارومیه دریافت شد. برای تهیهٔ استوک باکتریوفاژ خالص ابتدا باکتریوفاژ در SM بافر ( 50 mM Tris–HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 8 mM MgSO4:7H2O, با pH ۷/۵ و حاوی ۰/۰۱ درصد ژلاتین رقت‌سازی شد و سپس به روش کشت دولایه کشت داده شد. پس از بستن لایهٔ رویی، پلیت‌ها به‌صورت وارونه در ۳۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. از بین پلیت‌ها، پلیتی که در آن پلاک‌های باکتریوفاژ باهم ادغام نشده و به‌صورت کاملاً جدا نیز نیستند (بین آنها مرزی از باکتری وجود دارد) انتخاب شد (شکل ۱). در این مرحله، تیتر فاژ به روش شمارش تعداد پلاک نیز مشخص شد که حدود $۱۰^{۱۰}$ پلاک در هر میلی‌لیتر بود. سپس ۵ میلی‌لیتر SM بافر روی پلیت ریخته شد و پلیت در انکوباتور شیکردار یخچال‌دار در دمای ۱۷ درجهٔ سلسیوس با دور ۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس مایع روی پلیت جمع‌آوری و مایع جمع‌شده در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی با فیلتر سرسرنگی ۰/۲۲ میکرومتر فیلتر گشت. محلول باکتریوفاژ حاصل به میزان ۵۰ درصد حجمی/حجمی با گلیسرول استریل مخلوط و در دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس زیر صفر نگهداری شد (۲۰).




**شکل ۱. رقت‌سازی باکتریوفاژ و تشکیل پلاگ در رقت‌های مختلف. رقت کشت داده‌شده در پلیت نشان داده‌شده با علامت ستاره، به‌عنوان رقت اصلی برای تهیهٔ استوک استفاده شد.**

### تهیهٔ براث گوشت گاو

برای تهیهٔ براث گوشت، گوشت تازهٔ گاو از کشتارگاه تهیه شده و در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل و سریعاً چرخ شد. محلولی ۲۰ درصدی از گوشت در آب‌مقطر تهیه شده و با استفاده از استومیکر، همگن و سپس به‌مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و پس از اتوکلاو به‌مدت ۱۵ دقیقه، مورد استفاده قرار گرفت (۲۱).

### تشکیل بیوفیلم

کوپن‌های (Coupon) از جنس استیل زنگ‌نزن و در اندازهٔ ۲۰ × ۱۰ × ۱ میلی‌متر تهیه شدند. برای تمیزکردن کوپن‌ها از روش Valeriano و همکاران استفاده شد (۲۲). برای این منظور، ابتدا کوپن‌ها در استون خالص به‌مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و پس از شست‌وشو با آب‌مقطر، به‌مدت یک ساعت در داخل سود یک درصد گذاشته شدند. کوپن‌ها چندین بار دیگر با آب‌مقطر شست‌وشو شدند و سپس با الکل ۷۰ سطح کوپن‌ها پاک شد. پس از خشک‌شدن در فور، در اتوکلاو استریل و تا زمان استفاده در ظروف استریل نگهداری شدند. برای تشکیل بیوفیلم، ابتدا در میکروتیوپ‌های ۵میلی‌لیتری، ۴/۵ میلی‌لیتر براث گوشت استریل اضافه شد و سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری به ($۱۰^{۷}$ باکتری در هر میلی‌لیتر) تلقیح شد. در ادامه در هر فالکون یک عدد کوپن استریل قرار داده شد و فالکون به‌مدت ۷ روز در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس (به‌ترتیب دمای یخچال، دمای نامناسب یخچال و دمای محیط فرآوری و بسته‌بندی محصولات مختلف گوشتی در کارخانه‌های موادغذایی) نگهداری شد. در فواصل هر دو روز یک بار تا روز هفتم، کوپن‌ها از داخل براث



www.SID.ir

Archive of SID


Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

برداشته و به یک براث گوشت تازه بدون باکتری منتقل می‌شدند (۲۲).

### اثرات فاژ بر کلنی‌های دارای بیوفیلم

۲۴ ساعت و همچنین ۷ روز پس از تلقیح باکتری، کوپن استیل از سوسپانسیون باکتری خارج و برای زدودن اشکال آزاد باکتری، اقدام به شست‌وشو در پپتون واتر ۰/۱ درصد حاوی ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم شد. در مرحلهٔ بعد، کوپن‌ها طی فواصل زمانی ۱۰ و ۱۵ دقیقه، در معرض ۳ غلظت متفاوت از باکتریوفاژ ($10^4$، $10^6$ و $10^8$ پلاگ در هر میلی‌لیتر) قرار گرفتند. لازم به توضیح است که انتخاب این غلظت‌ها براساس مطالعهٔ اولیه و بررسی غلظت‌های مختلف بود. در مرحلهٔ بعد و برای تعیین اثرات باکتریوفاژ بر کلنی باکتری دارای بیوفیلم، ابتدا کوپن‌ها در پپتون سالین واتر شست‌وشوی دوباره شدند؛ سپس شمارش باکتریایی سطحی کوپن با استفاده از روش سوآب‌برداری، رقت‌سازی و روش پخش خطی (Track) در محیط کشت آگار لوریا برتانی تعیین شد. نمونهٔ کنترل بدون تیمار باکتریوفاژ نیز آماده و تعداد باکتریِ روی آن شمارش شد (۱۶).

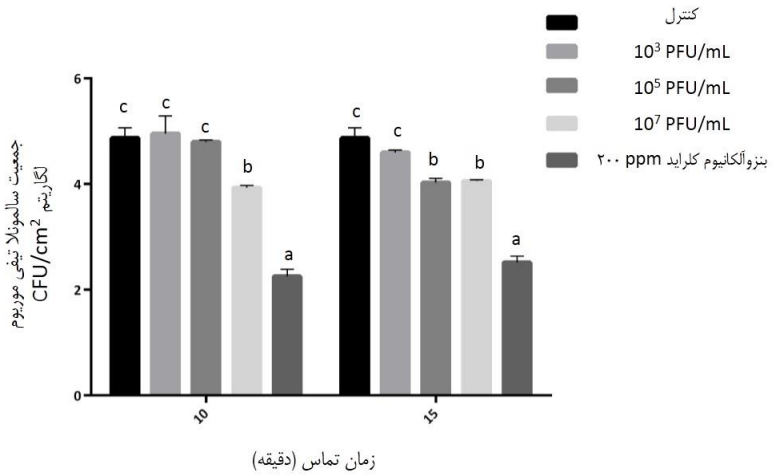
از محلول آمادهٔ بنزوآلکانیوم کلراید (۲۰۰ppm) به‌عنوان مادهٔ معمول ضدعفونی‌کنندهٔ کاربردی در صنایع غذایی، به‌عنوان کنترل برای مقایسهٔ اثرات ضدبیوفیلم باکتریوفاژ با ضدعفونی‌کننده‌های معمول استفاده شد. برای استریل‌کردن محلول، از فیلترهای سرسرنگی ۰/۲۲میکرونی استفاده شد.

### روش آماری

آزمایش‌ها، در حداقل سه تکرار انجام شد. اطلاعات به‌دست‌آمده، از طریق نرم‌افزار GraphPad (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) تجزیه‌وتحلیل شد. تحلیل واریانس با روش ANOVA و آزمون Newman-Keuls post در سطح معنی‌دار $P < ۰/۰۵$ صورت گرفت.

### یافته‌ها

نتایج اثرات باکتریوفاژ ST38 و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در دمای ۴ ، ۸ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس در اشکال ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد، بنزآلکانیوم کلراید اثرات جالب‌توجهی بر بیوفیلم دارد؛ به‌طوری که در هر دو دورهٔ زمانی تماس ۱۰ و ۱۵ دقیقه، اثر آن در هر سه دما به‌ترتیب ۲، ۳ و ۲ سیکل لگاریتمی کمتر از اثر باکتریوفاژ استفاده‌شده بود. بین تشکیل بیوفیلم در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس، اختلاف معناداری وجود نداشت. در بیوفیلم تشکیل‌شده در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در زمان تماس ۱۵ دقیقه، باکتریوفاژ با دوز $10^5$ و $10^7$ پلاگ در هر میلی‌لیتر، اثر مختصر بر بیوفیلم داشت؛ به‌طوری که ۰/۵ تا ۰/۷ سیکل لگاریتمی در بیومس بیوفیلم باکتری کاهش مشاهده شد (شکل ۲). درمجموع، افزایش زمان تماس از ۱۰ به ۱۵ دقیقه، اثر معنی‌داری در کاهش بیوفیلم باکتری از طریق فاژ و بنزوآلکانیوم کلراید نشان نداد.




**شکل ۲. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در براث گوشت گاو در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضدمیکروب در هر زمان تماس است.**

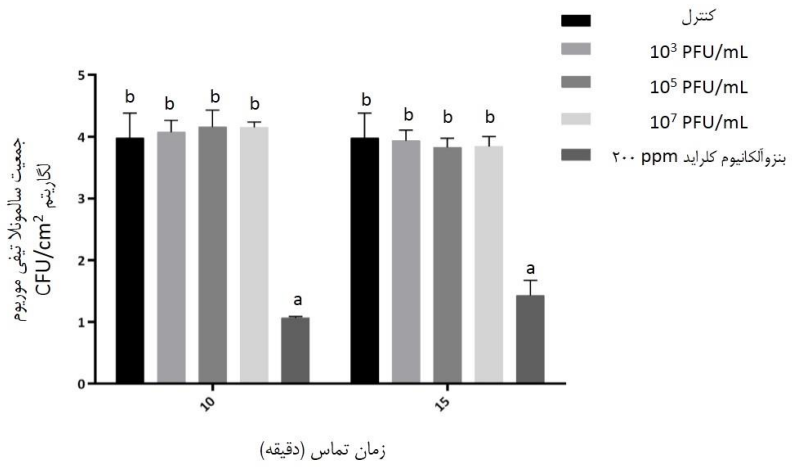


www.SID.ir

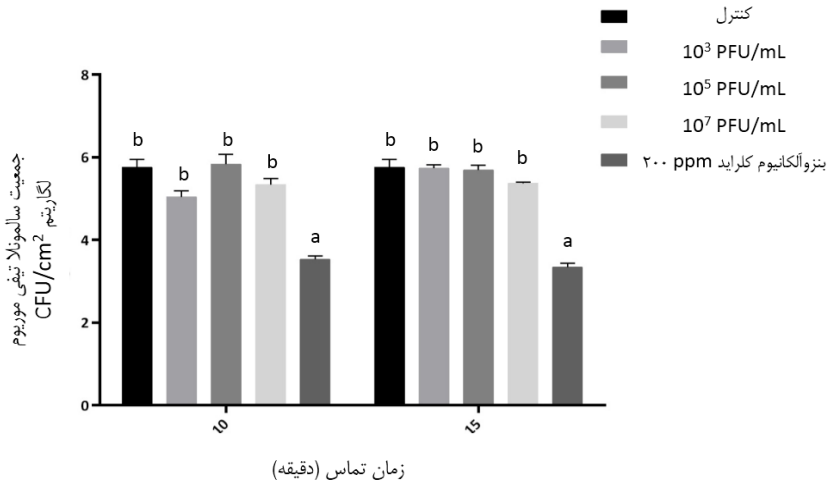
Archive of SID



Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018




**شکل ۳. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در براث گوشت گاو در دمای ۸ درجهٔ سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضدمیکروب در هر زمان تماس است.**




**شکل ۴. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در براث گوشت گاو در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < ۰/۰۵$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضدمیکروب در هر زمان تماس است.**

در جدول ۱، نتایج مربوط به اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلم ۷روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس آورده شده است. میزان بنزوآلکانیوم کلراید استفاده‌شده، اثر بسیار قوی روی بیوفیلم نشان داد؛ به‌طوری که در شمارش، باکتری رشد نکرد و اختلاف آن با نمونهٔ کنترل بیشتر از ۵ سیکل لگاریتمی بود. این در حالی است که اثر باکتریوفاژ روی بیوفیلم مختصر و در ۱۰ دقیقه، در هر ۳ غلظت از فاژ استفاده‌شده اختلافی کمتر از ۱ سیکل لگاریتمی با نمونهٔ کنترل نشان داد. در ۱۵ دقیقه تیمارهای مربوط به باکتریوفاژ کمتر از ۰/۵ سیکل لگاریتمی با نمونهٔ کنترل اختلاف دارند که نشان‌دهندهٔ تأثیرنداشتن زمان بر اثر باکتریوفاژ بر بیوفیلم بود. نتایج مشابهی در خصوص اثرات بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷روزه *سالمونلا تیفی موریوم* در دمای ۸ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد (جدول ۱). در این دما، در زمان‌های تماس ۱۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه اختلاف دوزهای $۱۰^{۵}$،$۱۰^{۳}$و $۱۰^{۷}$ پلاگ در هر میلی‌لیتر با نمونه کنترل نزدیک بین ۰/۷ تا یک سیکل لگاریتمی بود. نتایج اثر باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷روزهٔ



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس (جدول ۱) نشان داد که تیمار بنزوآلکانیوم کلراید اختلافی بیشتر از ۱ سیکل لگاریتمی با نمونهٔ کنترل دارد. نتایج غلظت‌های به‌کاررفتهٔ $10^3$، $10^5$ و $10^7$ پلاگ در هر میلی‌لیتر از باکتریوفاژ نشان‌دهندهٔ تأثیرگذار نبودن فاژ بر بیوفیلم در این دما بود.

**جدول ۱. اثرات باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در براث گوشت گاو در سه دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجهٔ سلسیوس**

| دمای گرمخانه‌گذاری (سلسیوس) | مدت‌زمان تماس (دقیقه) | غلظت فاژ (PFU/mL) $10^3$ | غلظت فاژ (PFU/mL) $10^5$ | غلظت فاژ (PFU/mL) $10^7$ | کنترل (بدون فاژ) | بنزوآلکانیوم کلراید ۲۰۰ ppm |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ۴ | ۱۰ | ۴/۹۶ ± ۰/۳$^{a}$ | ۴/۹۹ ± ۰/۷$^{a}$ | ۴/۴۹ ± ۰/۷$^{a}$ | ۵/۵۰ ± ۰/۱$^{b}$ | صفر |
| | ۱۵ | ۴/۲ ± ۰/۳$^{a}$ | ۴/۸۰ ± ۰/۸$^{b}$ | ۴/۱۵ ± ۰/۴$^{a}$ | ۵/۵۰ ± ۰/۱$^{c}$ | صفر |
| ۸ | ۱۰ | ۳/۹۵ ± ۰/۳$^{b}$ | ۳/۳۱ ± ۰/۴$^{a}$ | ۴/۰۴ ± ۰/۵$^{b}$ | ۴/۶۹ ± ۰/۹$^{c}$ | صفر |
| | ۱۵ | ۴/۱۶ ± ۰/۶$^{b}$ | ۳/۳۱ ± ۰/۷$^{a}$ | ۴/۳۴ ± ۰/۴$^{bc}$ | ۴/۶۹ ± ۰/۹$^{c}$ | صفر |
| ۱۵ | ۱۰ | ۶/۴۴ ± ۰/۲$^{b}$ | ۶/۴۱ ± ۰/۲$^{b}$ | ۶/۳۷ ± ۰/۴$^{b}$ | ۶/۵۲ ± ۰/۲$^{b}$ | ۵/۲۹ ± ۰/۳$^{a}$ |
| | ۱۵ | ۶/۶۲ ± ۰/۳$^{a}$ | ۶/۷۱ ± ۰/۱$^{a}$ | ۶/۴۱ ± ۰/۳$^{a}$ | ۶/۵۲ ± ۰/۲$^{a}$ | ۵/۰۶ ± ۰/۲$^{a}$ |

## بحث

*سالمونلا* توانایی زیادی در تشکیل بیوفیلم در سطوح مختلف مثل پلاستیک، رزین، شیشه و استیل زنگ‌نزن دارد و فیمیریه باکتری نقش مهمی در تشکیل بیوفیلم ایفا می‌کند. تأثیر دما بر روند تشکیل بیوفیلم متفاوت است، به‌طوری که توانایی باکتری در تشکیل بیوفیلم روی شیشه کم و وابسته به دما نیست؛ در حالی که در استیل زنگ‌نزن در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس و در پلی ونیل کلراید در دمای ۲۰ درجهٔ سلسیوس بیشترین تشکیل بیوفیلم مشاهده شد. تشکیل بیوفیلم در استیل زنگ‌نزن در دمای ۱۶ درجهٔ سلسیوس بسیار حائز اهمیت است؛ زیرا دوام *سالمونلا* در این سطح می‌تواند منشأ ایجاد آلودگی در طیور شود و پتانسیل آلودگی غذا را افزایش دهد. این دما، دمای محیط فرآوری و بسته‌بندی محصولات مختلف گوشتی است (۱۵).

باکتری *سالمونلا* تمایل بیشتری به اتصال به سطوح هیدروفوب دارد؛ بنابراین تشکیل بیوفیلم روی پلاستیک بسیار بیشتر از استیل زنگ‌نزن است. در تحقیقی که روی ۳۰ واریتهٔ مختلف *سالمونلا* انجام گرفت، نشان داده شد که بعد از ۴۸ انکوباسیون در ۳۰ درجهٔ سلسیوس، ۹۷ درصد واریته‌ها روی پلی‌اتیلن بیوفیلم تشکیل می‌دهند. این میزان در دمای ۳۷ درجهٔ سلسیوس، ۹۳ درصد و در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس، ۹۰ درصد گزارش شد (۱۵). در مطالعهٔ حاضر، *سالمونلای* استفاده‌شده قدرت تشکیل بیوفیلم مناسب روی استیل در محیط براث گوشت در ۷ روز را داشت که احتمالاً به خاصیت فنوتیپی و یا ژنوتیپی خاص این جدایه مربوط می‌شود.

در صنعت گوشت قرمز، باقی‌ماندهٔ مواد آلی موجود در سطوح مختلف، محلی مناسب برای تجمع و تشکیل بیوفیلم باکتری است و به‌عنوان نقطه‌ای برای انتقال متقاطع مطرح است (۲). اتصال و تشکیل بیوفیلم باکتری *سالمونلا* در محیط کشت آزمایشگاهی تحت شرایط مختلف محیطی مطالعه شد؛ ولی روند تشکیل بیوفیلم در شرایط واقعی و در محیط فرآوری گوشت، پدیدهٔ پیچیده‌ای است. در این شرایط، نوع غذا و محتویات آن، باقی‌مانده‌های آلی روی سطوح، میکروفلور طبیعی گوشت و دیگر عوامل بر روند تشکیل بیوفیلم باکتری اثرگذار هستند (۲۳). میزان جذب و اتصال باکتری تحت‌تأثیر نوع باقی‌مانده‌های آلی و غیرآلی روی سطوح است. مواد آلی همچون چربی، پروتئین و کربوهیدرات موجود در محصول غذایی که در قسمت‌های مختلف کارخانه‌های فرآوری گوشت پخش بوده، می‌تواند در تشکیل بیوفیلم باکتری مؤثر باشد. نتایج نشان می‌دهد میزان اتصال باکتری *اشرشیا کلی* O157:H7 به استیل زنگ‌نزن و سطوح پلی‌اتیلن با دانسیته بالا در حضور گوشت چرخ‌کرده و هموژن چربی گاو بیشتر از محیط کشت است (۲۳).

Brown و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند تشکیل بیوفیلم *کمپلو باکترژوژنی* روی شیشه، پلی‌استیلن و استیل زنگ‌نزن در مدل براث گوشت طیور افزایش پیدا می‌کند؛ به‌طوری که میزان تشکیل این بیوفیلم در براث گوشت طیور نسبت به محیط کشت



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

آزمایشگاهی بیشتر بود. این یافته بیانگر این واقعیت است که براث گوشت با ایجاد یک لایه روی سطح، امکان اتصال باکتری و تشکیل بیوفیلم را تقویت می‌کند (۱۷). برای اتصال بیوفیلم به سطوح، بایستی ابتدا یک لایه روی سطح تشکیل شود تا به‌عنوان پایه برای تشکیل بیوفیلم عمل کند. این فرضیه دربارهٔ باکتری *سالمونلای* استفاده‌شده در این مطالعه صدق نمی‌کند. یکی از مهم‌ترین دلایل آن، به نوع مدل غذایی استفاده‌شده بستگی دارد. در اتصال باکتری‌ها به سطوح در تماس با غذا نوع ترکیبات و ویژگی‌های مادهٔ غذایی بسیار مهم است (pH، دما و غیره)؛ برای مثال پروتئینی به نام آلفاتروپومتیونین در ماهی باعث هیدروفیل شدن سطح استیل می‌شود؛ لذا اتصال باکتری به آن سطح را آسان می‌کند (۱۸).

باکتریوفاژ به‌عنوان یک ترکیب ضدمیکروب طبیعی غیرسمی، جایگاهی ویژه در صنایع غذایی یافته است. یکی از استفاده‌های نوین باکتریوفاژ، استفاده از آن برعلیه باکتری‌های تولیدکنندهٔ بیوفیلم است. با وجود برخی تحقیقات انجام‌شده در زمینهٔ اثر باکتریوفاژ در محیط کشت آزمایشگاهی، تاکنون مطالعهٔ خاصی در زمینهٔ کنترل باکتری *سالمونلا تیفی‌موریوم* با استفاده از باکتریوفاژ در مدل گوشت قرمز انجام نشده است. عوامل مختلفی در توانایی باکتریوفاژ در حذف باکتری متصل به این سطوح نقش دارد. از میان آنها، نسبت باکتریوفاژ به سلول یا شاخص تعدد عفونت (multiplicity of infection :MOI) یک فاکتور اساسی است (۲۴). هرچقدر میزان باکتریوفاژ زیاد باشد، اثربخشی فاژ بر بیوفیلم نیز افزایش می‌یابد (۲۵). در مطالعه‌ای که دربارهٔ اثر تعداد باکتریوفاژ P100 ($10^{8}$،$10^{7}$،$10^{6}$،$10^{5}$ پلاگ در هر میلی‌لیتر) بر بیوفیلمِ تشکیل‌شده از سوی *لیستریا مونوسیتوژنز* (پس از ۷۲ ساعت از تشکیل) روی سطح استیل زنگ‌نزن انجام گرفت (۱۲)، کاهش مشخصی در میزان تودهٔ بیوفیلم به میزان ۵/۲۹ سیکل لگاریتمی در هر سانتی‌متر مربع استیل در ۸ ساعت اول پس از مواجههٔ باکتریوفاژ و بیوفیلم مشاهده شد. مطالعات نشان داده است حتی بالارفتن سن بیوفیلم، باعث کاهش حساسیت باکتری نسبت به باکتریوفاژ نمی‌شود؛ به‌طوری که باکتریوفاژ شناخته‌شده F116، حتی بر بیوفیلم *سودوموناس آئروژینوزای* ۲۰روزه نیز مؤثر است. لازم به توضیح است که باکتریوفاژ توانایی تولید پلی‌ساکارید دِپلیمراز که قادر به تجزیهٔ ماتریس اگزوپلی ساکاریدی بیوفیلم است را دارد (۱).

نتایج مطالعهٔ حاضر نشان داد که اثربخشی باکتریوفاژ روی بیوفیلم با سن بیوفیلم رابطهٔ مستقیم دارد. با وجود اثر ضعیف باکتریوفاژ بر بیوفیلم، این اثر دربارهٔ بیوفیلم ۷روزه بسیار ناچیز و کمتر از بیوفیلم یک‌روزه بود. عوامل گوناگونی در شکست در استفاده از باکتریوفاژ در کنترل بیوفیلم متصور است. اثربخش نبودن باکتریوفاژ مطالعه‌شده در این تحقیق بر بیوفیلم ممکن است به‌دلیل سنتزنشدن آنزیم‌هایی مثل اندولیزین و یا پلی‌ساکارید دِپلیمراز باشد که نقش مهمی در اثرات حذف بیوفیلم باکتریوفاژ دارد. در مطالعهٔ Chhibber و همکاران (۲۰۱۳)، نقش آنتاگونیستی آهن بر اثربخشی باکتریوفاژ علیه بیوفیلم باکتری *کلبسیلا پنومونیا* بررسی و نشان داده شد که بعضی ترکیبات از جمله آهن، کبالت و روی، اثر آنتاگونیستی برعلیه اثر باکتریوفاژ بر بیوفیلم دارند. مثلاً در فرآوردهٔ گوشتی، میزان آهن بسیار بالا است که می‌تواند یکی از دلایل اثربخش نبودن باکتریوفاژ در این مطالعه باشد. مکانیسم این اثر تاکنون مشخص نشده است (آهن بر تشکیل بیوفیلم هم اثر مهاری دارد) (۱۱). در مطالعهٔ Ganegama و همکاران (۲۰۱۳) اثر فاژ بر علیه بیوفیلم *لیستریا مونوسیتوژنز* تشکیل‌شده روی استیل زنگ‌نزن در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس در مدل پروتئین ماهی بررسی شد که نتایج نشان داد استفاده از ۳ نوع باکتریوفاژ به‌صورت کوکتل باعث کاهش ۳ تا ۴ سیکل لگاریتمی باکتری تحت مطالعه می‌شود. خاصیت ضدبیوفیلمی باکتریوفاژ نسبت به ترکیبات دیگر بسیار کم است که به‌علت ناتوانی باکتریوفاژ در از بین بردن لایهٔ پلی‌ساکاریدی بیوفیلم است؛ لذا به‌منظور اثربخشی بهتر روی بیوفیلم نیاز است قبل از استفاده از باکتریوفاژ و دیگر روش‌ها، تخریب اولیهٔ بیوفیلم انجام پذیرد (۱۸).

یکی دیگر از دلایل اثربخش نبودن باکتریوفاژ استفاده‌شده، پایین‌بودن فعالیت متابولیک سلول‌های داخل بیوفیلم است. به نظر می‌رسد باکتریوفاژ به‌کاررفته قدرت لیتیک بالایی نسبت به باکتری استفاده‌شده که یک سویهٔ مقاوم به چند دارو است، دارد. از طرفی خود نوع براث گوشت مورداستفاده نیز از اثربخشی بالایی برخوردار است. خصوصیات بیوسیدی باکتریوفاژ در محیط غذایی با محیط کشت متفاوت است، محیط‌های طبیعی غذایی حاوی ترکیباتی مانند آب، پروتئین، چربی و دیگر ترکیبات مغذی، می‌تواند روی اثربخشی باکتریوفاژ بر بیوفیلم اثر بگذارد (۱۸).

شکست در استفاده از باکتریوفاژ در کنترل بیوفیلم، همچنین می‌تواند ناشی از ناتوانی باکتریوفاژ در نفوذ به بخش‌های زیرین بیوفیلم و یا غیرفعال شدن باکتریوفاژ از سوی آنزیم‌های پروتئولیتیک موجود در ماتریس بیوفیلم باشد (۲۶). مکانیسم‌های مختلفی برای اثربخشی باکتریوفاژ بر بیوفیلم بیان شده است. براساس برخی نظریه‌ها، ژنوم بسیاری از باکتریوفاژها حاوی ژن‌های



www.SID.ir

Archive of SID


Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

آنزیم‌هایی هستند که توانایی تخریب مواد موجود در ماتریس بیوفیلم را دارند. این آنزیم‌ها اغلب محلول در آب بوده و پس از آزادشدن از باکتریوفاژ بر دیوارهٔ سلول باکتری اثر می‌گذارند و یا باعث تخریب لایهٔ پلی‌ساکاریدی بیوفیلم می‌شوند (۳).

طبق نتایج به‌دست‌آمده، باکتریوفاژ استفاده‌شده در این مطالعه، اثری معنی‌دار بر بیوفیلم *سالمونلا تیفی‌موریوم* هدف، نداشت و فقط اندکی کاهش رشد در بیوفیلم یک‌روزه دیده شد که می‌تواند ناشی از بلوغ ناکافی بیوفیلم و اگزوپلی ساکارید جوان بیوفیلم باشد. مدت‌زمان تماس باکتریوفاژ با بیوفیلم هم اثری معنی‌دار روی کاهش بیوفیلم نداشت و در زمان ۱۰ و ۱۵ دقیقه بدون توجه به سن و دمای تشکیل بیوفیلم، نتایج مشابهی گزارش شد. نتایج همچنان نشان داد، میزان بیومس بیوفیلم یک‌روزه به‌مراتب کمتر از بیوفیلم ۷روزه است که نشان از رشد و بلوغ بیوفیلم در طول زمان دارد. اثر بنزوآلکانیوم کلراید در بیوفیلم ۷روزه که بیوفیلم بالغ قلمداد می‌شود، کمتر از بیوفیلم یک‌روزه است که نشان می‌دهد بلوغ در بیوفیلم باعث مقاوم‌تر شدن ساختار نسبت به ضدعفونی‌کننده‌ها می‌شود. در مجموع می‌توان گفت که فقط استفاده از باکتریوفاژ *سالمونلای* به‌کاررفته در این مطالعه، اثربخشی لازم روی هر دو بیوفیلم ۱ و ۷روزهٔ *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در براث گوشت قرمز را ندارد و نیاز است روش‌های ترکیبی دیگر همراه با باکتریوفاژ به کار رود و یا استفاده از کوکتل چندین باکتریوفاژ در این زمینه بررسی شود.

## سپاسگزاری

نویسندگان مقاله، از دانشکدهٔ دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌خاطر همکاری و تأمین بودجهٔ اجرای این پژوهش کمال امتنان را به‌عمل می‌آورند.

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Harper D, Parracho H, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, et al. Bacteriophages and biofilms. Antibiotics. 2014;3(3):270-84. https://doi.org/10.3390/antibiotics3030270 PMCID:PMC4790368

2. Srey S, Jahid IK, Ha S-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. Food Control. 2013;31(2):572-85. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001

3. Giaouris E, Heir E, Hébraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Moretro T, et al. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. Meat Sci. 2014;97(3):298-309. https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2013.05.023 PMID:23747091

4. Moretro T, Heir E, Nesse LL, Vestby LK, Langsrud S. Control of Salmonella in food related environments by chemical disinfection. Food Res Int. 2012;45(2):532-44. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.002

5. Paulson DS. Applied biomedical microbiology. CRC Press/Taylor & Francis; 2010.

6. Arnold JW. Biofilms in poultry processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW (Eds). Biofilms in the Food and beverage industries. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing; 2009. p.455-73.

7. Habimana O, Heir E, Langsrud S, Asli AW, Moretro T. Enhanced surface colonization by Escherichia coli O157:H7 in biofilms formed by an Acinetobacter calcoaceticus isolate from meat-processing environments. Appl Environ Microbiol. 2010;76(13):4557-9. https://doi.org/10.1128/AEM.02707-09 PMID:20453142 PMCID:PMC2897464

8. Mukhopadhyay S, Ramaswamy R. Application of emerging technologies to control Salmonella in foods: A review. Food Res Int. 2012;45(2):666-77. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.016

9. Sillankorva SM, Oliveira H, Azeredo J. Bacteriophages and their role in food safety. Int J Microbiol. 2012;2012:863945. https://doi.org/10.1155/2012/863945 PMID:23316235 PMCID:PMC3536431

10. Razavi Rohani SM, Moradi M. Food application of natural antimicrobial compounds. Tehran: Jahad Daneshghahi Publishing; 2017. p.225-9.

11. Chhibber S, Nag D, Bansal S. Inhibiting biofilm formation by Klebsiella pneumoniae B5055 using an iron antagonizing molecule and a bacteriophage. BMC Microbiol. 2013;13(1):174. https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-174 PMID:23889975 PMCID:PMC3726515

12. Monta-ez-Izquierdo VY, Salas-Vázquez DI, Rodríguez-Jerez JJ. Use of epifluorescence microscopy to assess the effectiveness of phage P100 in controlling Listeria monocytogenes biofilms on stainless steel surfaces. Food Control. 2012;23(2):470-7. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.08.016

13. Gabisoniya TG, Loladze MZ, Nadiradze MM, Chakhunashvili NK, Alibegashvili MG, Tamarashvili NG, et al. Effects of bacteriophages on biofilm formation by strains of Pseudomonas aeruginosa. Prikl Biokhim



www.SID.ir

Archive of SID



Downloaded from ijmm.ir at 9:36 +0330 on Sunday December 23rd 2018

Mikrobiol. 2016; 52(3): 293-7. https://doi.org/10.1134/S0003683816030042 PMID:29509387

14. Gutierrez D, Fernandez L, Martinez B, Ruas-Madiedo P, Garcia P, Rodriguez A. Real-time assessment of Staphylococcus aureus biofilm disruption by phage-derived proteins. Front Microbiol. 2017;8:1632. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01632 PMID:28883818 PMCID:PMC5573737

15. De Oliveira DCV, Fernandes Júnior A, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Silva NCC, et al. ability of salmonella spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(6):478-83. https://doi.org/10.1089/fpd.2013.1710 PMID:24720488

16. Duong HNN, Formation of Salmonella Typhimurium biofilm under various growth conditions and its sensitivity to industrial sanitizers [dissertation]. Lower Kent Ridge Rd, Singapore: National university of Singapore; 2012.

17. Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AH. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of Campylobacter jejuni. Appl Environ Microbiol. 2014;80(22):7053-60. https://doi.org/10.1128/AEM.02614-14 PMID:25192991 PMCID:PMC4249011

18. Ganegama Arachchi GJ, Cridge AG, Dias-Wanigasekera BM, Cruz CD, McIntyre L, Liu R, et al. Effectiveness of phages in the decontamination of Listeria monocytogenes adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. J Ind Microbiol Biotechnol. 2013;40(10):1105-16. https://doi.org/10.1007/s10295-013-1313-3 PMID:23907252

19. Ghasemmahdi H, Tajik H, Moradi M, Mardani K, Modaresi R, Badali A, et al. Antibiotic resistance pattern and biofilm formation ability of clinically isolates of Salmonella enterica serotype typhimurium. Int J Enteric Pathog. 2015;3(2):e27372. https://doi.org/10.17795/ijep27372

20. Clokie MRJ, Kropinski AM. Bacteriophages, methods and protocols. New York: Springer Publishers: 2009.

21. Kim SH, Wei CI. Biofilm formation by multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Typhimurium phage type DT104 and other pathogens. J Food Prot. 2007;70(1):22-9. https://doi.org/10.4315/0362-028X-70.1.22 PMID:17265855

22. Valeriano C, de Oliveira TLC, de Carvalho SM, Cardoso MdG, Alves E, Piccoli RH. The sanitizing action of essential oil-based solutions against Salmonella enterica serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. Food Control. 2012;25(2):673-7. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.015

23. Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, et al. Attachment and biofilm formation by Escherichia coli O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. Int J Food Microbiol. 2011;149(3):262-8. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004 PMID:21802758

24. Carpentier B. Biofilms in red meat processing. In: Fratamico PM, Annous BA, Gunther NW, editors. Biofilms in the food and beverage industries. Sawston, Cambridge: Woodhead Publishing; 2009. p.375-95.

25. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/DocumentSet/Zoon_report.

26. Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. J Ind Microbiol. 1996;16(6):331-41. https://doi.org/10.1007/BF01570111 PMID:8987490



www.SID.ir