

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

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



تشکیل بیوفیلیم *سالمونلا تیفی* موریوم در سطح استیل زنگ‌زن در مدل گوشت قرمز و اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلیم باکتری

حسین تاجیک، مهران مرادی، مصطفی علیپور، هادی قاسم‌مهدی

گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

زمینه و هدف: استفاده از باکتریوفاژ در کنترل و حذف بیوفیلیم عوامل باکتریایی روشی جدید است. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلیم *سالمونلا تیفی* موریوم مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک تشکیل شده در سطح استیل زنگ‌زن در مدل برات گوشت گاو است.

مواد و روش کار: بیوفیلیم ۱ و ۷ روزه باکتری در سه دمای انکوباسیون ۴، ۸ و ۱۵ درجه سلسیوس روی استیل زنگ‌زن در برات 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 بیوفیلیم تشکیل شده، بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که *سالمونلا* توانایی تشکیل بیوفیلیم در استیل زنگ‌زن در برات گوشت را دارد و این توانایی تحت تأثیر دمای انکوباسیون است، به طوری که به ترتیب در دمای ۱۵، ۴ و ۸ درجه سلسیوس بیشترین تشکیل بیوفیلیم مشاهده شد. تجمع باکتری در بیوفیلیم یک‌روزه، یک سیکل لگاریتمی کمتر از بیوفیلیم ۷ روزه بود. باکتریوفاژ در سه غلظت به کاررفته، اثر معنی‌داری بر بیوفیلیم ۱ و ۷ روزه *سالمونلا* در مقایسه با گروه کنترل نشان نداد ($P > 0.05$). همچنین، افزایش زمان تماس از ۱۰ به ۱۵ دقیقه، اثر معنی‌داری در کاهش بیوفیلیم باکتری از سوی باکتریوفاژ نشان نداد.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج این مطالعه نشان داد که باکتریوفاژ به کاررفته اثر مشخصی بر بیوفیلیم ایزوله مقاوم به چند آنتی‌بیوتیک *سالمونلا* تشکیل شده در سطح استیل در مدل گوشت قرمز نداشت و بایستی از روش‌های ترکیبی و افزایش زمان تماس برای بهبود اثر ضدبیوفیلیمی باکتریوفاژ استفاده کرد.

کلمات کلیدی: باکتریوفاژ، *سالمونلا تیفی* موریوم، بیوفیلیم، گوشت قرمز

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۳۹۶/۰۱/۲۰

پذیرش: ۱۳۹۷/۰۴/۱۱

انتشار آنلاین: ۱۳۹۷/۰۷/۱۹

موضوع:

میکروبی شناسی بالینی

IJMM1397;12(3): 179-188

نویسنده مسئول:

مهران مرادی

گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی،
دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه،

ارومیه، ایران

تلفن: ۰۴۴-۳۱۹۴۳۶۳۳

پست الکترونیک:

moradi.mehran@yahoo.com

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروبی شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

آنها با عوامل ضد میکروبی می‌شود. میکروارگانیسم‌ها از جمله میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و ایجادکننده فساد، توانایی تشکیل بیوفیلیم‌ها را دارند. این ویژگی نقشی کلیدی در بسیاری از عفونت‌ها و آلودگی‌های ناشی از محصولات غذایی دارد. تشکیل بیوفیلیم برای باکتری تحت شرایط محیطی سخت، استراتژی‌ای برای زنده ماندن محسوب می‌شود (۱،۲). توانایی باکتری در اتصال به سطوح بی‌جان و تشکیل بیوفیلیم دغدغه بسیاری از صنایع از جمله فرآوری محصولات گوشتی است. در این صنایع، پاک‌سازی

بیوفیلیم ساختار پلی‌ساکارییدی 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 بیوفیلیم تابع عوامل متعددی از جمله نوع باکتری، خصوصیات سطح، ویژگی‌های محیطی از جمله pH، میزان مواد مغذی و دما است. سلول‌های تولیدکننده بیوفیلیم در مقایسه با شکل آزاد باکتری، مقاومت بالایی نسبت به عوامل ضد میکروبی دارند؛ چراکه دارای ویژگی‌هایی هستند که باعث کاهش و یا جلوگیری از تماس

نانوامولسیون و سورفکتانت‌ها مورد توجه قرار گرفته‌اند. باکتریوفاژها نیز به‌عنوان دشمن طبیعی باکتری‌ها از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با قابلیت حذف و کنترل بیوفیلیم شناخته شده‌اند (۱). باکتریوفاژها، از پروتئین و اسید نوکلئیک تشکیل شده و محصولات حاصل از شکستن آنها، اسیدهای آمینه و اسید نوکلئیک است؛ بنابراین به‌عنوان یک زنبیوتیک (Xenobiotics) مطرح نیستند.

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

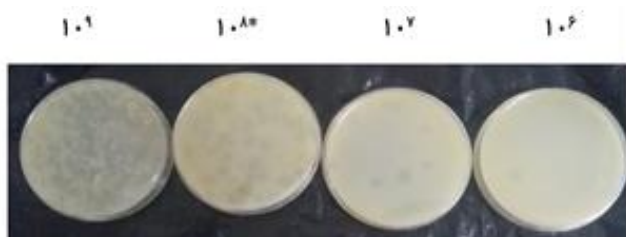
پاک‌سازی و ضد عفونی سطوحی که روی آن فرآوری مواد غذایی انجام می‌شود از آلودگی محصولات غذایی به عوامل بیماری‌زا جلوگیری می‌کند. استفاده از ضد عفونی‌کننده‌های شیمیایی به ایجاد مقاومت در تعدادی از عوامل بیماری‌زا منجر شده است؛ بنابراین به‌کارگیری روش‌های جدید برای ضد عفونی کردن سطوح لازم است. اما زمانی که باکتری‌ها روی سطوح بیوفیلیم تشکیل می‌دهند، زدودن آنها با ضد عفونی‌کننده‌ها سخت می‌شود. در سال‌های اخیر مطالعاتی برای جایگزینی مواد شیمیایی با باکتریوفاژها به‌منظور حذف عوامل تولیدکننده بیوفیلیم از سطوح انجام شده است. بر این اساس مطالعات مختلفی در زمینه استفاده از باکتریوفاژ در حذف و کنترل بیوفیلیم 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 بیوفیلیم تحت تأثیر ویژگی‌های باکتریوفاژ، محیط تشکیل بیوفیلیم و نوع و خصوصیات باکتری مدنظر است. در حال حاضر، استفاده تجاری از باکتریوفاژ در کنترل عواملی بیماری‌زای با خواستگاه غذایی از محدودیت خاصی برخوردار است. این محدودیت، در وهله اول مربوط به نبود اطلاعات کافی و جامع درباره کاربرد این عوامل در مواد غذایی

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

آلودگی میکروبی در کارخانه‌های فرآوری و کشتارگاه‌های دام، عمدتاً به دلیل آلودگی متقاطع بین وسایل با لاشه در بخش‌های مختلف فرآوری اتفاق می‌افتد. امکان آلودگی محصولات خام به باکتری‌هایی با توانایی تشکیل بیوفیلیم که به‌صورت مختلط از مجموعه‌ای از باکتری‌ها تشکیل یافته‌اند، وجود دارد. برای کنترل بیوفیلیم در چنین واحدهایی، داشتن دانش لازم در زمینه محل تشکیل بیوفیلیم و میکروارگانیسم‌های دخیل ضروری است. از آنجایی که در ماشین‌آلات صنایع غذایی، سطوح در تماس با مواد غذایی اغلب از جنس استیل زنگ‌نزن است، استفاده مکرر از این سطوح، باعث ایجاد خراشیدگی و زبری شده و به این خاطر لکه مواد غذایی روی این سطوح باقی مانده و باعث افزایش توانایی باکتری‌ها در اتصال، رشد و تشکیل بیوفیلیم می‌شود. رشد این میکروارگانیسم‌ها روی تجهیزات و مواد غذایی، 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 بیوفیلیم سالمونلا در مواد غذایی 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 بیوفیلیم باکتری‌ها می‌شود. در کنار ترکیبات گیاهی، استفاده از ترکیبات ضد بیوفیلیم مثل آنزیم‌ها، مهارکننده‌های سیستم حدنصاب (Quorum sensing)، باکتریوسین‌ها،

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 درجه سلسیوس زیر صفر نگهداری شد (۲۰).



شکل ۱. رقت سازی باکتریوفاژ و تشکیل پلاگ در رقت های مختلف. رقت کشت داده شده در پلیت نشان داده شده با علامت ستاره، به عنوان رقت اصلی برای تهیه استوک استفاده شد.

تهیه براث گوشت گاو

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

تشکیل بیوفیلم

کوپن های (Coupon) از جنس استیل زنگ نزن و در اندازه ۲۰ × ۱۰ × ۱ میلی متر تهیه شدند. برای تمیز کردن کوپن ها از روش Valeriano و همکاران استفاده شد (۲۲). برای این منظور، ابتدا کوپن ها در استون خالص به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته و پس از شست و شو با آب مقطر، به مدت یک ساعت در داخل سود یک درصد گذاشته شدند. کوپن ها چندین بار دیگر با آب مقطر شست و شو شدند و سپس با الکل ۷۰ سطح کوپن ها پاک شد. پس از خشک شدن در فور، در اتوکلاو استریل و تا زمان استفاده در ظروف استریل نگهداری شدند. برای تشکیل بیوفیلم، ابتدا در میکروتیوپ های ۵ میلی لیتری، ۴/۵ میلی لیتر براث گوشت استریل اضافه شد و سپس مقداری از سوسپانسیون باکتری به (۱۰^۷ باکتری در هر میلی لیتر) تلقیح شد. در ادامه در هر فالكون یک عدد کوپن استریل قرار داده شد و فالكون به مدت ۷ روز در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سلسیوس (به ترتیب دمای یخچال، دمای نامناسب یخچال و دمای محیط فرآوری و بسته بندی محصولات مختلف گوشتی در کارخانه های مواد غذایی) نگهداری شد. در فواصل هر دو روز یک بار تا روز هفتم، کوپن ها از داخل براث

است. تاکنون مطالعه ای در زمینه 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 تیپیفی موریوم مقاوم به آنتی بیوتیک تشکیل شده روی استیل زنگ نزن در مدل براث گوشت گاو انجام پذیرفت.

مواد و روش ها

تهیه و آماده سازی باکتری

این مطالعه در سال ۱۳۹۴ در دانشکده دام پزشکی دانشگاه ارومیه انجام گرفت. باکتری سالمونلا تیپیفی موریوم با کد ST38 از کلکسیون میکروبی گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دام پزشکی 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 دومرحله ای در محیط لوریا برتانی براث انجام شد؛ به طوری که باکتری دو بار متوالی در محیط کشت لوریا برتانی براث به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس کشت داده شد. برای به دست آوردن تعداد ۱۰^۸ × ۱/۵ باکتری در هر میلی لیتر (کدورت نیم مک فارلند)، از روش تعیین جذب نوری در طول موج ۶۰۰ نانومتر به وسیله اسپکتوفتومتر و کشت باکتری استفاده شد.

تهیه استوک باکتریوفاژ

باکتریوفاژ STP38 لیتیک متعلق به خانواده میرووریده از گروه بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی دانشکده دام پزشکی دانشگاه ارومیه دریافت شد. برای تهیه استوک باکتریوفاژ خالص ابتدا باکتریوفاژ در SM بافر (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄·7H₂O, pH ۷/۵ و حاوی ۰/۰۱ درصد ژلاتین رقت سازی شد و سپس به روش کشت دولایه کشت داده شد. پس از بستن لایه رویی، پلیت ها به صورت وارونه در ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد. از بین پلیت ها، پلیتی که در آن پلاگ های باکتریوفاژ باهم ادغام نشده و به صورت کاملاً جدا نیز نیستند (بین آنها مرزی از باکتری وجود دارد) انتخاب شد (شکل ۱). در این مرحله، تیتراژ به روش شمارش تعداد پلاگ نیز مشخص شد که حدود ۱۰^{۱۰} پلاگ در هر میلی لیتر بود. سپس ۵ میلی لیتر SM بافر روی پلیت ریخته شد و پلیت در انکوباتور شیکردار یخچال دار در دمای ۱۷ درجه سلسیوس با دور ۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. سپس مایع روی پلیت جمع آوری و مایع جمع شده در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مایع رویی

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) تجزیه و تحلیل شد. تحلیل واریانس با روش ANOVA و آزمون Newman-Keuls post در سطح معنی‌دار $P < 0.05$ صورت گرفت.

یافته‌ها

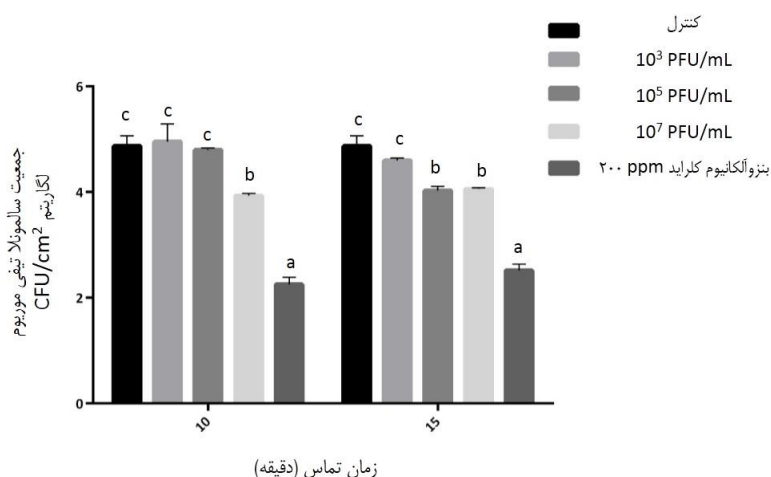
نتایج اثرات باکتریوفاژ ST38 و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سلسیوس در اشکال ۲، ۳ و ۴ آورده شده است. نتایج نشان داد، بنزوآلکانیوم کلراید اثرات جالب‌توجهی بر بیوفیلیم دارد؛ به‌طوری که در هر دو دوره زمانی تماس ۱۰ و ۱۵ دقیقه، اثر آن در هر سه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

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

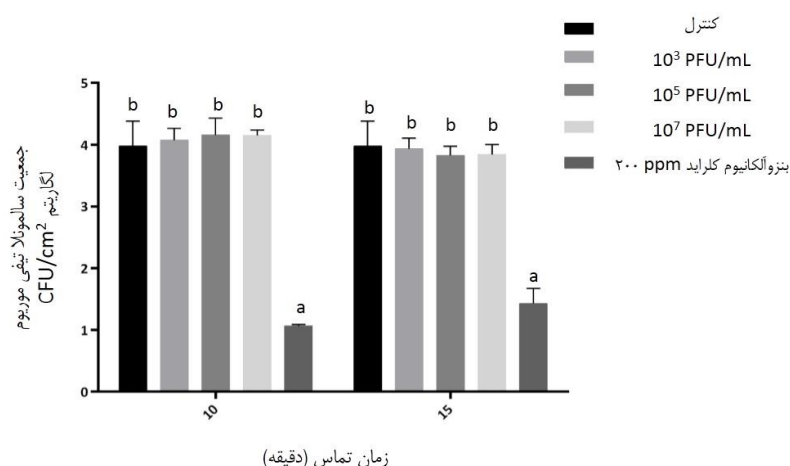
اثرات فاژ بر کلنی‌های دارای بیوفیلیم

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 پیتون واتر ۰/۱ درصد حاوی ۰/۸۵ درصد کلرید سدیم شد. در مرحله بعد، کوپن‌ها طی فواصل زمانی ۱۰ و ۱۵ دقیقه، در معرض ۳ غلظت متفاوت از باکتریوفاژ (۱۰^۴، ۱۰^۶ و ۱۰^۸ پلاگ در هر میلی‌لیتر) قرار گرفتند. لازم به توضیح است که انتخاب این غلظت‌ها براساس مطالعه اولیه و بررسی غلظت‌های مختلف بود. در مرحله بعد و برای تعیین اثرات باکتریوفاژ بر کلنی باکتری دارای بیوفیلیم، ابتدا کوپن‌ها در پیتون 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. نمونه کنترل بدون تیمار باکتریوفاژ نیز آماده و تعداد باکتری روی آن شمارش شد (۱۶).

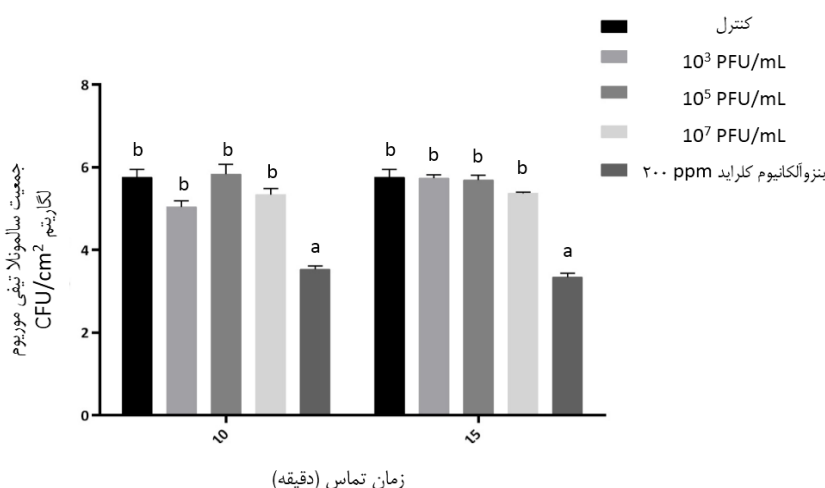
از محلول آماده بنزوآلکانیوم کلراید (۲۰۰ ppm) به‌عنوان ماده معمول ضدعفونی‌کننده کاربردی در صنایع غذایی، به‌عنوان کنترل برای مقایسه اثرات ضدبیوفیلیم باکتریوفاژ با ضدعفونی‌کننده‌های معمول استفاده شد. برای استریل کردن محلول، از فیلترهای سرسنگی ۰/۲۲ میکرونی استفاده شد.



شکل ۲. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلیم یک‌روزه سالمونلا تیفی‌موریوم تشکیل‌شده در پراث گوشت گاو در دمای ۴ درجه سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضد میکروب در هر زمان تماس است.



شکل ۳. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در برات گوشت گاو در دمای ۸ درجهٔ سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضد میکروب در هر زمان تماس است.



شکل ۴. اثرات سه غلظت مختلف از باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم یک‌روزه *سالمونلا تیفی‌موریوم* تشکیل‌شده در برات گوشت گاو در دمای ۱۵ درجهٔ سلسیوس. حروف کوچک نشان‌دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار ($P < 0.05$) بین غلظت‌های مختلف فاژ و ترکیب ضد میکروب در هر زمان تماس است.

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 تیفی‌موریوم* در دمای ۸ درجهٔ سلسیوس مشاهده شد (جدول ۱). در این دما، در زمان‌های تماس ۱۰ دقیقه و ۱۵ دقیقه اختلاف دوزهای ۱۰۵، ۱۰۳ و ۱۰۷ پلاگ در هر میلی‌لیتر با نمونه کنترل نزدیک بین ۰/۷ تا یک سیکل لگاریتمی بود. نتایج اثر باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷روزه

در جدول ۱، نتایج مربوط به اثرات باکتریوفاژ بر بیوفیلم ۷روزه *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

به کاررفته ۱۰۳، ۱۰۵ و ۱۰۷ پلاگ در هر میلی لیتر از باکتریوفاژ نشان دهنده تأثیرگذار نبودن فاژ بر بیوفیلم در این دما بود.

باکتری *سالمونلا تیفی* موریوم در دمای ۱۵ درجه سلسیوس (جدول ۱) نشان داد که تیمار بنزوآلکانیوم کلراید اختلافی بیشتر از ۱ سیکل لگاریتمی با نمونه کنترل دارد. نتایج غلظت های

جدول ۱. اثرات باکتریوفاژ و بنزوآلکانیوم کلراید بر بیوفیلم ۷ روزه *سالمونلا تیفی* موریوم تشکیل شده در براث گوشت گاو در سه دمای ۴، ۸ و ۱۵ درجه سلسیوس

بنزوآلکانیوم کلراید ۲۰۰ ppm	کنترل (بدون فاژ)	غلظت فاژ (PFU/mL)			مدت زمان تماس (دقیقه)	دمای گرمخانه گذاری (سلسیوس)
		۱۰۷	۱۰۵	۱۰۳		
صفر	۵/۵۰ ± ۰/۱ ^b	۴/۴۹ ± ۰/۷ ^a	۴/۹۹ ± ۰/۷ ^a	۴/۹۶ ± ۰/۳ ^a	۱۰	۴
صفر	۵/۵۰ ± ۰/۱ ^c	۴/۱۵ ± ۰/۴ ^a	۴/۸۰ ± ۰/۸ ^b	۴/۲ ± ۰/۳ ^a	۱۵	
صفر	۴/۶۹ ± ۰/۹ ^c	۴/۰۴ ± ۰/۵ ^b	۳/۳۱ ± ۰/۴ ^a	۳/۹۵ ± ۰/۳ ^b	۱۰	۸
صفر	۴/۶۹ ± ۰/۹ ^c	۴/۳۴ ± ۰/۴ ^{bc}	۳/۳۱ ± ۰/۷ ^a	۴/۱۶ ± ۰/۶ ^b	۱۵	
۵/۲۹ ± ۰/۳ ^a	۶/۵۲ ± ۰/۲ ^b	۶/۳۷ ± ۰/۴ ^b	۶/۴۱ ± ۰/۲ ^b	۶/۴۴ ± ۰/۲ ^b	۱۰	۱۵
۵/۰۶ ± ۰/۳ ^a	۶/۵۲ ± ۰/۲ ^a	۶/۴۱ ± ۰/۳ ^a	۶/۷۱ ± ۰/۱ ^a	۶/۶۲ ± ۰/۳ ^a	۱۵	

روز را داشت که احتمالاً به خاصیت فنوتیپی و یا ژنوتیپی خاص این جدایه مربوط می شود.

در صنعت گوشت قرمز، باقی مانده مواد آلی موجود در سطوح مختلف، محلی مناسب برای تجمع و تشکیل بیوفیلم باکتری است و به عنوان نقطه ای 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، پدیده پیچیده ای است. در این شرایط، نوع غذا و محتویات آن، باقی مانده های آلی روی سطوح، میکروفلور طبیعی گوشت و دیگر عوامل بر روند تشکیل بیوفیلم باکتری اثرگذار هستند (۲۳). میزان جذب و اتصال باکتری تحت تأثیر نوع باقی مانده های آلی و غیرآلی روی سطوح است. مواد آلی همچون چربی، پروتئین و کربوهیدرات موجود در محصول غذایی که در قسمت های مختلف کارخانه های فرآوری گوشت پخش بوده، می تواند در تشکیل بیوفیلم باکتری مؤثر باشد. نتایج نشان می دهد میزان اتصال باکتری *شرشیا کلی* O157:H7 به استیل زنگ نزن و سطوح پلی اتیلن با دانسیته بالا در حضور گوشت چرخ کرده و هموزن چربی گاو بیشتر از محیط کشت است (۲۳).

Brown و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند تشکیل بیوفیلم کمپلو باکترئوزنی روی شیشه، پلی استیلن و استیل زنگ نزن در مدل براث گوشت طیور افزایش پیدا می کند؛ به طوری که میزان تشکیل این بیوفیلم در براث گوشت طیور نسبت به محیط کشت

بحث

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

باکتری *سالمونلا* تمایل بیشتری به اتصال به سطوح هیدروفوب دارد؛ بنابراین تشکیل بیوفیلم روی پلاستیک بسیار بیشتر از استیل زنگ نزن است. در تحقیقی که روی ۳۰ واریته مختلف *سالمونلا* انجام گرفت، نشان داده شد که بعد از ۴۸ انکوباسیون در ۳۰ درجه سلسیوس، ۹۷ درصد واریته ها روی پلی اتیلن بیوفیلم تشکیل می دهند. این میزان در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، ۹۳ درصد و در دمای ۲۲ درجه سلسیوس، ۹۰ درصد گزارش شد (۱۵). در مطالعه حاضر، *سالمونلا* استفاده شده قدرت تشکیل بیوفیلم مناسب روی استیل در محیط براث گوشت در ۷

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 *سالمونلا* 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 آلفاتروپومیتونین در ماهی باعث هیدروفل شدن سطح استیل می‌شود؛ لذا اتصال باکتری به آن سطح را آسان می‌کند (۱۸).

باکتریوفاژ به‌عنوان یک ترکیب ضد میکروب طبیعی غیرسمی، جایگاهی ویژه در صنایع غذایی یافته است. یکی از استفاده‌های نوین باکتریوفاژ، استفاده از آن بر علیه 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 تیپیفی موریوم* 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 (۱۰۸، ۱۰۷، ۱۰۶، ۱۰۵ پلاگ در هر میلی‌لیتر) بر بیوفیلم تشکیل‌شده از سوی *لیستریا مونوسیتوژنز* (پس از ۷۲ ساعت از تشکیل) روی سطح استیل زنگ‌زن 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* ۲۰ روزه نیز مؤثر است. لازم به توضیح است که باکتریوفاژ توانایی تولید پلی‌ساکارید دپلیمرز 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 ۷ روزه 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 سنتز نشدن آنزیم‌هایی مثل اندولیزین و یا پلی‌ساکارید دپلیمرز 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 *کلیسیلا پنومونیا* بررسی و نشان داده شد که بعضی ترکیبات از جمله آهن، کبالت و روی، اثر آنتاگونیستی بر علیه 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 مہاری دارد) (۱۱). در مطالعهٔ Ganegama و همکاران (۲۰۱۳) اثر فاژ بر علیه بیوفیلم *لیستریا مونوسیتوژنز* تشکیل‌شده روی استیل زنگ‌زن 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، پایین بودن 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 مورد استفاده 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

است که نشان می‌دهد بلوغ در بیوفیلم باعث مقاوم‌تر شدن ساختار نسبت به ضدعفونی‌کننده‌ها می‌شود. در مجموع می‌توان گفت که فقط استفاده از باکتریوفاژ *سالمونلا* به‌کاررفته در این مطالعه، اثربخشی لازم روی هر دو بیوفیلم ۱ و ۷ روزه *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 دانشکده دامپزشکی دانشگاه ارومیه به‌خاطر همکاری و تأمین بودجه اجرای این پژوهش کمال امتنان را به‌عمل می‌آورند.

تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

References

- 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> PMID:PMC4790368
- 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>
- 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
- 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>
- Paulson DS. *Applied biomedical microbiology*. CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
- 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.
- Habimana O, Heir E, Langsrud S, Asli AW, Moretro T. Enhanced surface colonization by *Escherichia coli*

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 دیواره سلول باکتری اثر می‌گذارند و یا باعث تخریب لایه 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 آگزوپلی 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 ۷ روزه است که نشان از رشد و بلوغ بیوفیلم در طول زمان دارد. اثر بنزوآلکانیوم کلراید در بیوفیلم ۷ روزه که بیوفیلم بالغ قلمداد می‌شود، کمتر از بیوفیلم یک‌روزه

- 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 PMID:PMC2897464
- 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>
- 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 PMID:PMC3536431
- Razavi Rohani SM, Moradi M. *Food application of natural antimicrobial compounds*. Tehran: Jahad Daneshgahi Publishing; 2017. p.225-9.
- 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 PMID:PMC3726515
- 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>
- 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*

- 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_r_eport.
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