

## اثر نیزین بر تعدادی از باکتریهای بیماریزای تشکیل دهنده بیوفیلم با استفاده از روش میکروتیترپلیت

منیژه مهدوی\*، دکتر محمد جلالی\*\*، دکتر روحا کسری کرمانشاهی\*\*\*

\*دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی- گروه زیست شناسی دانشگاه اصفهان، \*\*استادیار گروه تغذیه - دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، \*\*\*استاد گروه زیست شناسی- دانشگاه اصفهان.

تاریخ دریافت: ۱۵/۱۲/۷ تاریخ تایید: ۱۶/۵/۱۰

### چکیده:

زمینه و هدف: بعضی از باکتریهای پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی قادر می باشند به سطوح در تماس با مواد غذایی متصل شده و تشکیل بیوفیلم دهند، از این جهت به عنوان منبع آلودگی محصولات غذایی و انتقال بیماری ها در نظر گرفته می شوند. نیزین، باکتریوسین پپتیدی می باشد که برای کنترل بیولوژیکی بیوفیلم های میکروبی استفاده می گردد. همچنین امروزه نیزین در ادغام با مواد بسته بندی، مواد غذایی را از خطر فساد و ورود عوامل بیماریزا محافظت می کند. هدف از این مطالعه بررسی اثر غلظت های مختلف نیزین بر روی برخی از باکتریهای بیماریزای غذایی بوده است.

روش بررسی: در این تحقیق تجربی اثرات غلظت های مختلف نیزین بر باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم و بیماریزای *Staphylococcus aureus*، *Listeria monocytogenes* و *Salmonella enteritidis* با روش میکروتیترپلیت بررسی شد. میزان کاهش سلول های تشکیل دهنده بیوفیلم با استفاده از دستگاه الیزا ریدر و میزان کشته شدن سلول ها با به کار بردن رنگ TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) تعیین شد. داده ها با استفاده از آزمون های آنالیز واریانس و آزمون مقایسه ای Tukey-Kramer و به کمک نرم افزار Minitab تجزیه و تحلیل شد.

یافته ها: نتایج نشان داد نیزین در غلظتی که مصرف آن مجاز است ( $10^2 \times 4$  IU/ml)، بر بیوفیلم *S. enteritidis* نسبت به بیوفیلم باکتری های *L. monocytogenes* و *Staph. aureus* به ترتیب با ۸۷، ۵۷ و ۳۰ درصد موثرتر می باشد ( $P < 0/05$ ).

نتیجه گیری: بر اساس نتایج این مطالعه افزایش غلظت بیش از حد مجاز نیزین تاثیری در میزان حذف و کشته شدن باکتری های مورد مطالعه ندارد و در حد مجاز بیشترین تاثیر را بر حذف بیوفیلم باکتری های *S. enteritidis* دارد.

واژه های کلیدی: بیوفیلم، ضد میکروبی، نیزین، میکروتیتر پلیت، مواد پلیمریک.

### مقدمه:

پلیمریک خارج سلولی که ایجاد مانع در برابر نفوذ عوامل ضد میکروبی می کند، به بسیاری از شرایط سخت مقاوم می باشد (۵) و می تواند به انواع سطوح موجود در تجهیزات مانند پلاستیک، شیشه، فلز، چوب و محصولات غذایی متصل شوند (۶، ۷، ۸).

اولین بار Zottola و Sasahara به اتصال باکتری های بیماری زای غذایی (Foodborne) مانند

در صنایع غذایی اتصال باکتری های پاتوژن و فاسد کننده مواد غذایی با سطوح در تماس با مواد غذایی در فرآیندهای تولید و بسته بندی آنها و نهایتاً، تشکیل بیوفیلم های میکروبی، می تواند منبع بالقوه آلودگی و فساد محصولات و فرآورده های غذایی و نیز انتقال بیماریهای ناشی از غذا باشد (۴-۱). بیوفیلم ها به دلیل ساختار خاص خود و وجود مواد

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی - دانشکده بهداشت- گروه تغذیه - تلفن: ۰۳۱۱-۷۹۲۲۷۸۱ - E-mail: Jalali@mui.ac.ir

پلیمرهای بسته‌بندی می‌تواند نیزین، سوربیک اسید، پروپیونیک اسید، پراکساید، کلرین‌اکساید، اوزون، سینامالدهید، آلایل ایزوتیوسیانات و لیزوزیم باشد. همچنین امروزه جدیدترین روش برای بیوکنترل تشکیل بیوفیلم، علاوه بر روشهای شیمیایی و فیزیکی معمول، جذب ترکیبات فعال زیستی مانند باکتریوسین‌ها به سطوح در تماس با مواد غذایی می‌باشد که می‌تواند از اتصال باکتری‌ها جلوگیری کند (۳).

باکتریوسین نیزین، یک پپتید ضد میکروبی است که اثرات ضد باکتریایی آن بر بسیاری از پاتوژن‌های غذایی و باکتری‌های فاسد کننده، بخصوص تشکیل‌دهنده‌های اسپور به اثبات رسیده است. نیزین هم اکنون در کشورهای متعددی به عنوان ماده‌ی محافظ طبیعی در صنایع غذایی به کار می‌رود و از مدت‌ها قبل جزء لیست GRAS (Generally Recognized As Safe) قرار گرفته است. این باکتریوسین به عنوان ماده‌ی محافظ طبیعی در غذاهای کم اسید و حرارت دیده استفاده می‌شود (۱۶).

باکتری‌های مورد آزمایش در این تحقیق از عوامل مهم بیماری‌های ناشی از غذا هستند. *L. monocytogenes* موجب عفونت لیستریوزیز، سپتیمی، مننژیت، سقط جنین و مسمومیت غذایی می‌گردد (۱۷). *S. enteritidis* مسمومیت غذایی و عفونت‌های روده‌ای را باعث می‌شود (۴) و نیز *Staph. aureus* عامل اتیولوژیک دامنه‌ی وسیعی از بیماریها مانند اندوکاردیت، اوستئومیلیت، سندرم شوک سمی، مسمومیت‌های غذایی و عفونت‌های پوستی می‌باشد (۱۸). اطلاعات بسیار اندکی در مورد سویه‌های جدا شده از مواد غذایی در ایران که قادر به تشکیل بیوفیلم هستند وجود دارد. لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات غلظت‌های مختلف نیزین بر تعدادی از باکتری‌های بیماری‌زای غذایی تشکیل‌دهنده بیوفیلم مانند *Staph. aureus*، *L. monocytogenes* و *S. enteritidis* بود.

*Pseudomonas fragi* به سطوح استیل در سیستم‌های غذایی پی‌بردند (۹). بعد از آن Mafu و همکاران نیز اتصال لیستریا مونوسیٹوژنز (*Listeria monocytogenes*) را به سطوح استیل، شیشه، پلی‌پروپیلن و سطوح پلاستیکی در مدت ۲۰ دقیقه گزارش کردند (۱۰). لیستریا مونوسیٹوژنز بر بسیاری سطوح از جنس بسته‌بندی مواد غذایی می‌تواند تشکیل بیوفیلم دهد. بنابراین گونه‌های لیستریا برای رشد و بقا بر روی جایگاه‌های متفاوتی که در تجهیزات تولید مواد غذایی یافت می‌شود، بسیار مناسب می‌باشند (۱۱). *Salmonella* نیز بر روی بسیاری سطوح از جنس پلاستیک و استیل می‌تواند تشکیل بیوفیلم دهد (۱۲، ۱۳). در سال ۱۹۹۶ تحقیقی در فرانسه نشان داد که ۴۰/۵ درصد از عفونت‌های ناشی از مواد غذایی در ارتباط با آلودگی وسایل و موادی است که خطر تشکیل بیوفیلم در آنها وجود دارد (۱۴). در سال ۱۹۹۸ در آمریکا آلودگی گوشت‌های همبرگر با *E. coli* و ورود لیستریا مونوسیٹوژنز در سیستم‌های تولید شیر پاستوریزه و پنیر گزارش شد (۱۵).

هدف از بسته‌بندی مواد غذایی، افزایش مدت زمان نگهداری مواد غذایی با جلوگیری از ورود عوامل فساد می‌باشد. به عبارت دیگر بسته‌بندی، محافظ و نگهدارنده‌ی محصول در برابر عوامل مختلفی مانند ضربه، شرایط اقلیمی (رطوبت و دما)، بو، گاز و میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. از این رو بسته‌بندی‌های مختلف با کارایی‌های متفاوت و بیشتر در مورد مواد غذایی به وجود آمده است. یکی از این انواع بسته‌بندی، بسته‌بندی ضد میکروبی می‌باشد که در واقع یک نوع بسته‌بندی فعال است (۳). در این نوع بسته‌بندی با ادغام مواد ضد میکروبی مواد بسته‌بندی، کارایی آن افزایش می‌یابد. افزایش مدت نگهداری ماده غذایی همراه با حفظ کیفیت و سلامتی با جلوگیری از رشد میکروبی از مزایای چنین نوع بسته‌بندی‌هایی می‌باشد. مواد ضد میکروبی ادغام در

## روش بررسی:

هر چاهک اضافه شد. همچنین هر ۸ چاهک در یک ستون، تیمار مشابه دریافت کردند. به دلیل این که احتمال می‌رود تراکم بالای سلول‌ها در بیوفیلم، عامل ضد میکروبی بکار رفته با این حجم (۲۵۰ میکرولیتر) را خنثی کند، در هر بیست دقیقه یک بار عوض (Refresh) شدند. علاوه بر این ستون‌های تیمار شده، ستون‌های کنترل (حاوی بیوفیلم و بدون تیمار) و همچنین ستون‌های شاهد (حاوی محیط براث استریل) در هر پلیت در نظر گرفته شد.

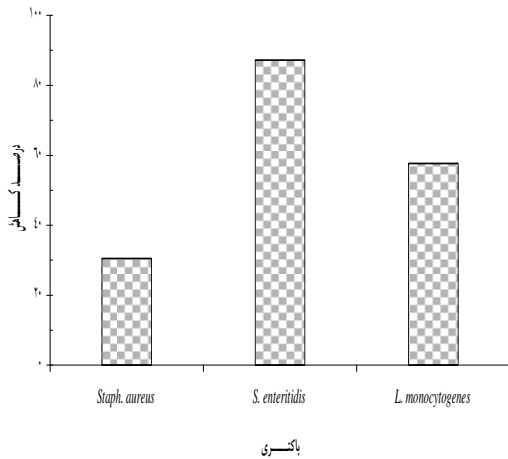
بعد از گذشت یک ساعت، عامل ضد میکروبی از چاهک‌ها شسته و خارج شد و با ۲۰۰ میکرولیتر کریستال یوله ۲ درصد به مدت ۵ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند. کریستال یوله رنگی است که می‌تواند کل بیوفیلم را رنگ کند و رنگ مناسبی برای سنجش حذف بیوفیلم می‌باشد. بعد از ۵ دقیقه، چاهک‌ها با آب شیر شسته شدند و هاله‌های ارغوانی رنگ در چاهک‌های میکروپلیت مشاهده شدند. سپس چاهک‌ها با ۲۰۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ۳۳ درصد پر شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. بعد از آن پلیت‌ها به شدت تکان داده شدند و جذب نوری آنها در طول موج ۴۹۲ نانومتر خوانده شد. سنجش کارایی بیوساید یا درصد کاهش بیوفیلم (Reduction Percent) از طریق جذب نوری چاهک‌های تیمار شده، کنترل و شاهد محاسبه گردید (۲۰).

**میزان کشتن سلول‌های بیوفیلم توسط نیزین:** جهت تعیین میزان سلول‌های زنده باقی‌مانده بیوفیلم از روش Smith و همکاران استفاده گردید (۲۱). بدین منظور از یک رنگ تنفسی به نام ۲، ۳ و ۵- تری فیل تترازولیم کلراید (TTC) استفاده شد. TTC محلول در آب می‌باشد، پتانسیل ردوکس آن در حدود ۰/۰۸V- می‌باشد و می‌تواند به عنوان پذیرنده الکترون برای هیدروژنازهای متفاوت عمل کند.

**باکتری‌ها و محیط‌های کشت:** باکتری‌های مورد استفاده در این تحقیق، *Staph. aureus* جداسازی شده از سطح اسلایسر کارخانه فرآورده گوشتی، *L. monocytogenes* RITCC1293serotype 4a و *S. enteritidis* RITCC1624 بود. دو سویه باکتری اخیر از موسسه تحقیقات و سرم سازی رازی، کرج تهیه شد. باکتری *Staph. aureus* و *S. enteritidis* *L. monocytogenes* به ترتیب بر روی محیط کشت‌های اختصاصی *PALCAM*(Merck) و *XLD*(Merck) و بردپارکر (Merck) همراه با ساپلیمنت‌های مربوطه جهت اطمینان از خالص بودن، کشت و در یخچال نگهداری شدند.

**محلول فحیره نیزین:** ۱۰۰ میلی گرم از نیزین (نیزاپلن Sigma/۲/۵) در ۱۰ میلی لیتر اسید کلریدریک ۰/۰۲ نرمال حل شد تا غلظت آن به ۱۰<sup>۴</sup> IU/ml برسد (۱Mg = ۴۰IU). سپس با استفاده از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتری استریل شد. این محلول در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد فریز گردید و برای تهیه رقت‌های مختلف از آب مقطر استریل استفاده شد (۱۹).

**توانایی نیزین در حذف بیوفیلم:** برای سنجش اثر ضد میکروبی نیزین در حذف بیوفیلم از روش Stepanovic و همکاران استفاده گردید (۱۵، ۲۰). بعد از آماده سازی کشت ۱۸ تا ۲۰ ساعته و فعال سازی باکتری‌ها، سوسپانسیون میکروبی معادل ۰/۵ مک فارلند از هر کدام از ایزوله‌ها تهیه شد. سپس این سوسپانسیون به نسبت ۱ به ۱۰۰ در تریپتیکاز سوی براث استریل رقیق شد و تمام چاهک‌ها در یک پلیت ۹۶ خانه‌ای با ۲۵۰ میکرولیتر از این محیط پر شدند (۱۰<sup>۴</sup>cfu/well × ۲۵). سپس، سطح پلیت‌ها پوشیده شد و به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد انکوبه گردیدند. بعد از خالی کردن محتویات چاهک‌ها و شستشوی آنها به میزان ۲۵۰ میکرولیتر نیزین به مدت یک ساعت به



تقریباً تمام میکروارگانیسم‌ها توانایی احیاء TTC را به تری فیل فورمازان (TPF) دارند. از این توانایی جهت رنگ‌سنجی در طول موج ۴۵۰ nm استفاده شد. تمام مواد و وسایل لازم برای تعیین قدرت حذف بیوفیلم، در این آزمایش نیز به کار رفتند، با این تفاوت که به جای رنگ کریستال ویوله از رنگ تری فیل تترازولیوم کلراید ۲ درصد استفاده می‌شود. در نهایت بعد از شستشوی چاهک‌ها و استفاده از اسیداستیک گلاسیال ۳۳ درصد و انکوباسیون به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتیگراد جذب نوری چاهک‌ها در ۴۵۰ نانومتر توسط دستگاه خوانده شد.

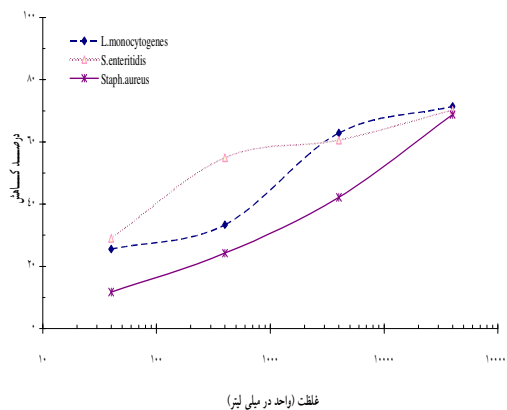
**نمودار شماره ۲:** مقایسه اثر حذفی غلظت  $4 \times 10^3$  IU/ml نیزیین بر بیوفیلم باکتریها.  $P < 0/05$  در تمام باکتری‌ها

داده‌ها با استفاده از آزمون های آماری آنالیز واریانس (ANOVA) و مقایسه‌ای Tukey-Kramer و به کمک نرم‌افزار Excel و Minitab مورد بررسی قرار گرفت.

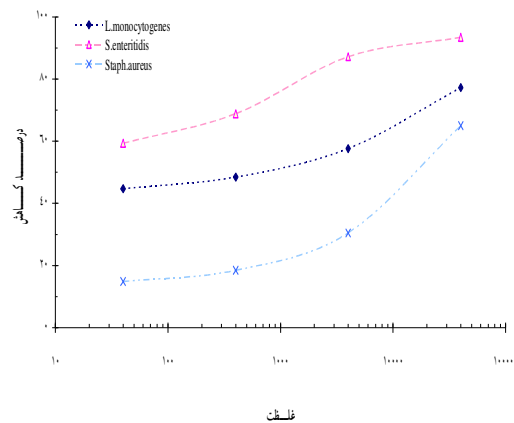
غلظت مجاز آن در صنایع غذایی می‌باشد. حداکثر غلظت مجاز نیزیین در مواد غذایی  $4 \times 10^3$  IU/ml می‌باشد. با افزایش غلظت نیزیین نزدیک به ۱۰۰ درصد بیوفیلم های باکتریایی مورد آزمایش از بین رفته‌اند (نمودار شماره ۱). اثر حذفی نیزیین در غلظت  $4 \times 10^4$  IU/ml بر باکتری های *Staph. aureus*، *S. enteritidis* و *monocytogenes*. یکسان می‌باشد ( $P > 0/05$ ).

### یافته‌ها:

در این تحقیق اثر ضد میکروبی ماده محافظ نیزیین در غلظت های متفاوت بر باکتریهای تشکیل دهنده بیوفیلم با روش میکروتیتیر پلیت بررسی گردید. غلظت های متفاوت مورد استفاده نیزیین بر اساس دامنه



**نمودار شماره ۳:** اثر نیزیین بر میزان کشته شدن سلول های بیوفیلم.  $P > 0/05$  در همه غلظت ها.



**نمودار شماره ۱:** اثر نیزیین بر میزان حذف سلول های بیوفیلم  $P < 0/05$  در غلظت های  $4 \times 10^3$  IU/ml.

$S. enteritidis$  با اختلاف معنی داری بر  $4 \times 10^3$  IU/ml) نسبت به بقیه باکتریها بیشتر می باشد و نزدیک به ۹۰ درصد سلولهای آن از بین رفته اند و ۶۰ درصد کشته شده اند در حالی که درصد کشته شدن و حذف سلولهای باکتریایی مختلف در غلظت  $4 \times 10^4$  IU/ml اختلاف معنی دار وجود نداشت.

در این پژوهش اثر حذفی و کشندگی افزایش غلظت نیزین بر سلولهای بیوفیلم باکتریهای *Staph. aureus* و *S. enteritidis* معنی دار نمی باشد. بنابراین افزایش غلظت بیش از حد مجاز تأثیری در میزان حذف و کشته شدن این باکتری ها ندارد. اما با این حال می توان گفت که نیزین بیشترین تأثیر را بر حذف بیوفیلم باکتریهای *S. enteritidis* داشته است. از آنجایی که این باکتری بیماری زای غذایی است (۸) و با ورود به محیط های غذایی و تشکیل بیوفیلم به عنوان منبع آلودگی محصولات غذایی عمل می کند، این موضوع بسیار حائز اهمیت می باشد (۱۳، ۲۳).

در ضمن اثر حذفی نیزین بر *L. monocytogenes* نیز قابل توجه است (۵۷٪) و نزدیک به همین میزان درصد کشته شدن سلولهای بیوفیلم آن دیده می شود (۶۲٪). به عبارتی می توان گفت که درصد حذف و کشته شدن سلول های بیوفیلم این باکتری بر اثر نیزین مشابه بوده است. *L. monocytogenes* در محیط های تولیدی فرآورده های گوشتی یافت می شود. معمولاً پاستوریزاسیون یا پختن شرایط عدم حضور این میکروارگانیزم را فراهم می کند، اما با این حال با تشکیل بیوفیلم بر روی سطوح می تواند تا مدتها زنده بماند و در نهایت در حین بسته بندی، فرآورده گوشتی را آلوده کند (۷). Gudbjornsdottir و همکاران در کارخانه فرآورده گوشتی آلودگی ۲/۳ درصد از محصولات با *L. monocytogenes* را نشان دادند (۲۴). برش گوشت های پخته شده موجب انتقال این باکتری و سایر عوامل بیماری زا می گردد.

اما در غلظت  $4 \times 10^3$  IU/ml بیشترین اثر حذفی نیزین با اختلاف معنی دار ابتدا بر *S. enteritidis* و سپس بر *Staph. aureus* و *L. monocytogenes* می باشد (P<۰/۰۵) (نمودار شماره ۲).

اثر کشندگی غلظت های مختلف نیزین بر باکتری های مورد آزمایش یکسان بود (P>۰/۰۵) (نمودار شماره ۳).

## بحث:

حذف ناقص بیوفیلم موجب رشد مجدد (Regrowth) قسمت باقیمانده بیوفیلم روی سطوحی که هنوز دارای تعدادی سلول های زنده هستند، می گردد. این پدیده باعث می شود که میکروارگانیزم ها بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی به حالت اولیه خود برگردند، ساختمان خود را تعمیر کنند و دوباره سبب آلودگی سیستم شوند. از این رو توجه به این نکته ضروری است که بعد از اثر عوامل ضد میکروبی چه میزان و یا چه تعداد از سلولهای بیوفیلم هنوز زنده هستند و توانایی رشد و تکثیر را دارند. در تحقیق حاضر با درصد کشته شدن همه باکتریها با افزایش غلظت نیزین معنی دار نمی باشد، بنابراین اثر کشندگی غلظت های مختلف نیزین بر باکتری های مورد آزمایش برابر است و همه حساسیت مشابهی نشان می دهند. همچنین از آنجایی که میزان کشته شدن باکتری های مختلف معنی دار نمی باشد، اثر کشندگی نیزین بر باکتری های مختلف هم یکسان نمی باشد. Nel و همکاران توانستند با استفاده از غلظت  $3000$  IU/ml نیزین تمام سلولهای زنده بیوفیلم را بکشند، در حالی که حدود ۴۲-۴۹ درصد باکتریها هنوز در اتصال به سطح استیل باقی مانده بودند (۲۲). در این تحقیق غلظت  $4000$  IU/ml نیزین در کشتن باکتریها بر سطوح چندان موفق نبود، ولی اکثر آنها را از سطوح برداشت به طوری که اثر حذفی غلظت مجاز نیزین

باکتری های مهم بیماریزای غذایی با افزایش غلظت، یکسان ارزیابی شد. همچنین اثر حذفی غلظت  $4 \times 10^3$  IU/ml نیزیین بر باکتری *S. enteritidis* و *L. monocytogenes* نسبت به *Staph. aureus* بیشتر بود. لذا ادغام نیزیین در حد مجاز در بسته بندی های ضد میکروبی می تواند به طور موثری مانع از تشکیل بیوفیلم باکتری ها و در نتیجه فساد مواد غذایی و انتقال عوامل بیماریزا گردد.

### تشکر و قدردانی:

بدینوسله از تمامی کسانی که ما را در این طرح یاری نمودند قدردانی می گردد.

Arajjo و Carballo اثر نیزیین را بر اتصال *L. monocytogenes* به سطوح مختلف بررسی کردند. آنها به این نتیجه رسیدند که جذب  $0.62 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  نیزیین به سطوح پلاستیک بیشترین کاهش را در اتصال باکتریها ایجاد می کند (۲۵) که نتایج این تحقیق به خوبی نشان می دهد نیزیین تا حد زیادی می تواند از تشکیل بیوفیلم باکتری های بیماری زا جلوگیری کند و یا حتی بیوفیلم آنها را از بین ببرد. لذا ادغام آن در سطوح بسته بندی به عنوان بسته بندی ضد میکروبی با غلظت مجاز آن ( $4 \times 10^3$  IU/ml) پیشنهاد می گردد.

### نتیجه گیری:

در این تحقیق اثرات حذفی و کشندگی نیزیین بر بیوفیلم

### منابع:

1. Cunliffe DA. Bacterial nitrification in chloraminated water supplies. Appl Environ Microbiol. 1991 Nov; 57(11): 3399-402.
2. Trachoo N. Biofilms and the food industry. J Sci Technol. 2003; 25(6): 807-15.
3. Han JH. Antimicrobial food packaging. Food Technol. 2000; 54(3): 56-65.
4. Sinde E, Carballo J. Attachment of Salmonella spp and *L. monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. Food Microbiology. 2000 Agu; 17(4): 439-47.
5. den Aantrekker ED, Boom RM, Zwietering MH, van Schothorst M. Quantifying recontamination through factory environments: a review. Int J Food Microbiol. 2003 Jan; 80(2): 117-30.
6. Mittelman MW. Structure and functional characteristics of bacterial biofilms in fluid processing operations. J Dairy Sci. 1998 Oct; 81(10): 2760-4.
7. Jessen B, Lammert L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. Int Biodeterior Biodegradation. 2003; 51(4): 265-9.
8. Sharma M, Anand SK. Characterization of constitutive microflora of biofilms in dairy processing lines. Food Microbiol. 2002; 19: 627-36.
9. Zottola EA, Sasahara KC. Microbial biofilms in the food processing industry: should they be a concern? Int J Food Microbiol. 1994 Oct; 23(2): 125-48.
10. Mafu AA, Roy D, Goulet J, Savoie L, Roy R. Efficiency of sanitizing agents for destroying *Listeria monocytogenes* on contaminated surfaces. J Dairy Sci. 1990 Dec; 73(12): 3428-32.
11. Chae MS, Scraft H. Cell viability of *Listeria monocytogenes* biofilms. Food Microbiol. 2001; 18(1): 103-12.
12. Neil HM. Reflections on Salmonella and other "wee Beasties" in foods. Food Technol. 2001; 55: 61-7.

13. Joseph B, Otta SK, Karunasagar I, Karunasagar I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol.* 2001 Mar; 64(3): 367-72.
14. Bryers JD. *Biofilms II: process analysis and application.* New York: John Wiley and Sons; 2000. p: 154-63.
15. Djordjevic D, Wiedmann M, McLandsborough LA. Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Jun; 68(6): 2950-8.
16. Sindt RH. Agency response letter GRAS notice. 2001 Apr. Available on [http:// www. cfsan. fda. gov/ rdb/ opa- g065. html](http://www.cfsan.fda.gov/rdb/opa-g065.html).
17. Farber JM, Peterkin PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev.* 1991 Dec; 55(4): 752.
18. Mack D, Rohde H, Dobinsky S, Riedewald J, Nedelmann M, Knobloch JK, et al. Identification of three essential regulatory gene loci governing expression of *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin and biofilm formation. *Infect Immun.* 2000 Jul; 68(7): 3799-807.
19. McAuliffe O, Ross RP, Hill C. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev.* 2001 May; 25(3): 285-308.
20. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. A modified microtiter-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods.* 2000 Apr; 40(2): 175-9.
21. Smith JJ, McFeters GA. Mechanisms of INT (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl tetrazolium chloride), and CTC (5-cyano-2,3-ditoly tetrazolium chloride) reduction in *Escherichia coli* K-12. *J Microbiol Methods.* 1997; 29(3): 161-75.
22. Nel HA, Bauer R, Wolfoordt GM, Dicks LMT. Effect of bacteriocins pediocin PD-1, plantaricin 423, and nisin on biofilms of *Oenococcus oeni* on a stainless steel surface. *Amer J Enol Vitic.* 2002; 53(3): 191-6.
23. Giaouris D, Nychas E. The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: the importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *J Food Microbiol.* 2006 Dec; 23(8): 747-52.
24. Gudbjornsdottir B, Suihko ML, Gustavsson P, Thorkelsson G, Salo S, Sjoberg AM, et al. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in Nordic countries. *Food Microbiol.* 2004; 21: 217-25.
25. Carballo L, Arajjo AB. Influence of surface characteristics of food contact materials on bacterial attachment. *Biomicro world. Int Conference of Biofilms in Spain.* 2005.