

بررسی اثرات همزمان دما، pH و غلظت نمک بر قدرت تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سالمونلا در سطح پلی‌استیرن و فعالیت ضد بیوفیلمی نانوامولسیون دارچین

نویسندگان: فاطمه دادخواه، دکتر جواد علی اکبرلو، پروفیسور حسین تاجیک

چکیده

مقدمه: تعدادی از پاتوژن ها که مسول بسیاری از بیماری ها با منشا غذایی هستند قادر به تشکیل بیوفیلم می باشند. تعدادی از فاکتور های محیطی در تشکیل بیوفیلم موثر هستند. هدف از این پژوهش، بررسی تاثیر همزمان دما، pH و غلظت نمک بر تشکیل بیوفیلم سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم و بررسی اثرات همزمان دما، زمان تماس و غلظت های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین در مهار و حذف بیوفیلم این دو باکتری بود.

مواد و روش: در ابتدا با استفاده از روش سطح پاسخ، قدرت تشکیل بیوفیلم سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم در محیط کشت BHI برات با استفاده از سطح پلی استیرین در سه دمای متفاوت (3، 25، و 37 درجه سانتیگراد)، سه سطح اسیدیته ی متفاوت (5، 6/5، و 8) و سه سطح غلظت نمک (0/5، 4/5 و 8/5 درصد) بررسی شد. در ادامه با استفاده از روش میکرودایلوشن، حداقل غلظت ممانعت کننده از رشد (MIC) نانوامولسیون اسانس دارچین علیه باکتری ها مشخص شد. سپس اثرات ضدبیوفیلمی نانوامولسیون اسانس دارچین مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج: افزایش زمان و غلظت نانوامولسیون اسانس دارچین باعث افزایش معنی دار اثر ضدبیوفیلمی آن میگردد، به طوری که در غلظت 4MIC نانوامولسیون و در زمان تماس 25 دقیقه بیشترین درصد کاهش بیوفیلم مشاهده شد. همچنین کاهش دمای نانوامولسیون نیز باعث افزایش اثربخشی آن شد، بطوری که در دمای 8 درجه سانتیگراد کاهش بیوفیلم بیشتری نسبت به دمای 25 درجه اتفاق افتاد. در غلظت 4MIC و زمان تماس 25 دقیقه و دمای 8 درجه سانتیگراد، بیوفیلم 48 ساعته این باکتری ها بترتیب 71/32٪ و 61/15٪ از بین رفتند.

بحث و نتیجه گیری: نانوامولسیون اسانس دارچین اثرات ضدبیوفیلمی مناسبی روی سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم دارد و این اثرات تابعی از غلظت، دما و زمان تماس نانوامولسیون با بیوفیلم است.

کلمات کلیدی: بیوفیلم، pH، دارچین، دما، سالمونالا انتریتیدیس، سالمونالا تیفیموریوم، سدیم کلرید، نانوامولسیون.

مقدمه

انتروباکتریاسه‌ها گروه بزرگی از باسیل‌های گرم منفی رودهای هوازی و بیهوازی اختیاری بوده و قادر به تولید اسپور نمی‌باشند، و در روده حیوانات، روده انسان، خاک، آب، غبار هوا، برخی از فرآورده‌های غذایی و نیز سبزیجات آلوده وجود دارند. باکتری سالمونلا یکی از اعضای خانواده انتروباکتریاسه می‌باشد که یک پاتوژن با منشأ غذایی است و به عنوان دومین عامل بیماریزا در انسان مورد بحث است (Wang, et al.2016; Moghadam, et al.2017). از عوامل حداث این سویه می‌توان به وجود کپسول، مقاومت در برابر آنتی بیوتیک، ساختمان آنتی ژنی خاص، وجود اندوتوکسین نام برد. سالمونلا در مواد خام غذایی و همچنین محیط‌های فرآوری شده غذایی نیز وجود دارد (Denis, et al.2016; Moraes, et al.2018). در ایران، سالمونلا بعد از شیگلا، بعنوان دومین عامل با منشأ غذایی ایجادکننده اسهال شناخته شده است. سالمونلاها عمدتاً از راه دهان، دستگاه تنفس و مخاطات وارد بدن شده و در روده جایگزین می‌شوند و مکانیسم بیماریزایی خود را آغاز می‌کنند. اکثر افراد آلوده به سالمونلا، 72-12 ساعت بعد از عفونت دچار تب، اسهال و گرفتگی‌های شکمی می‌شوند و بیماری معمولاً 4 الی 9 روز به طول می‌انجامد. بیوفیلیم عبارت است از تجمع میکروارگانیسم‌ها، محصولات خارج سلولی و مواد موجود در فضای مابین آنها که به یک سطح متصل شده‌اند. به عبارتی دیگر زمانی که میکروارگانیسم‌ها به صورت جداگانه به سطحی می‌چسبند و به مرور زمان تجمعی از میکروارگانیسم‌ها ایجاد می‌شود، شاهد تشکیل بیوفیلیم هستیم که هم از حیث ایمنی غذایی و هم در صنعت غذا مورد توجه است. مواد پلیمریک خارج سلولی و ساختار خاص بیوفیلیم‌ها مانعی در برابر نفوذ عوامل ضد میکروبی می‌باشند (Abbasvali, et al.2017; Ribaud, et al.2017). فرم بیوفیلیم پاتوژن‌های با منشأ غذایی به صورت گسترده در سطوح فرآوری غذا از جمله صنایع لبنی، شیلات، طیور و مواد غذایی آماده مصرف مشاهده شده است (Srey, et al.2013). قابلیت باکتری‌ها در اتصال به سطوح و تشکیل بیوفیلیم مشکلی بزرگ برای صنایع تولید مواد غذایی می‌باشد. بیوفیلیم قدرت باکتری را برای زندگی در شرایط سخت بالا برده و باعث بروز مشکلات زیادی در بخش‌های مختلف از جمله صنایع لبنی، شیلات، طیور (RTE)، وسایل پزشکی و سیستم‌های انتقال آب آشامیدنی می‌گردد. شکل‌گیری بیوفیلیم، تحت تاثیر عواملی از جمله نوع میکروارگانیسم، خصوصیات استاتیک سطح، شرایط محیطی، pH، دما و مواد مغذی در دسترس می‌باشد. بیوفیلیم‌ها با شوینده‌ها و پاک‌کننده‌ها به سادگی از بین نمی‌روند و بر روی سطوح در تماس با مواد غذایی باقی می‌مانند که متعاقباً احتمال زنده ماندن باکتری‌های بیماریزا و فسادزا و سپس آلودگی و انتقال بیماری‌های با منشأ غذایی بیشتر می‌شود.

امروزه کنترل و پیشگیری بیوفیلیم‌های میکروبی، به خصوص بیوفیلیم باکتری‌های بیماریزا با منشأ غذایی در صنعت غذا بسیار حائز اهمیت است. روشهای رایج پاکسازی و ضدعفونی، احتمال ایجاد مقاومت به ترکیبات ضد میکروبی و مواد ضد عفونی کننده را نیز به همراه دارد. بسیاری از ترکیبات ضد عفونی کننده معمول مورد استفاده برای پاکسازی و ضد عفونی کارخانه‌ها، از جمله ترکیبات آمونیوم چهارتایی و هیپوکلریت، تاثیر الزام بر حذف بیوفیلیم به خصوص در دماهای پایین و در حضور ترکیبات آلی را ندارند. علاوه بر این حضور باقیمانده ترکیبات شیمیایی و تشکیل ترکیبات سمی به واسطه استفاده از برخی مواد شیمیایی مشکل را جدی تر می‌کند. توانایی تشکیل بیوفیلیم سالمونلا، خطر ابتلا به سالمونلوزیس را افزایش می‌دهد (Dimakopoulou-Papazoglou, et al.2016).

در سالهای اخیر، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی هم از نظر مصرف کنندگان و هم در صنایع غذایی مورد توجه زیادی قرار گرفته است. علت اصلی این امر، وجود عوارض جانبی احتمالی ضد میکروب‌های مصنوعی و تاثیر بر سلامت و همچنین ایجاد مقاومت آنتی بیوتیکی باکتری‌هاست (Almadiy, et al.2016). ترکیبات ضد میکروبی طبیعی که بصورت گسترده در صنایع غذایی مورد

استفاده قرار میگیرند عبارتند از: اسانس‌ها با منشا گیاهی، اسیدهای آلی، باکتریوسین‌ها، پلیمرهای طبیعی و آنزیم‌های با منشا حیوانی (Amrutha, et al. 2017). فعالیت بیوسیدها در مقابل بیوفیلیم بستگی به عوامل مختلف دارد. تاثیرگذاری عوامل فیزیکی و شیمیایی بیوسیدها تابع فاکتورهای غلظت، زمان تماس، دما و pH می‌باشد بطوریکه اثربخشی ضدعفونی‌کننده در برابر بیوفیلیم معمولا با افزایش غلظت و زمان افزایش می‌یابد. اسانس‌های گیاهی را روغن‌های اتری یا فرآر نیز می‌گویند که از مهمترین نگهدارنده‌های طبیعی محسوب میشوند. حدود 300 نوع اسانس گیاهی شناخته شده وجود دارد که تقریبا 30 نوع از آنها اهمیت تجاری دارند (Burt, 2004). اسانس‌ها خانواده متنوعی از ترکیبات آلی با وزن مولکولی کم و با فعالیت‌های ضد میکروبی متفاوتی هستند. ترکیبات فعال اسانس‌ها بر اساس ساختار شیمیایی به ترپن‌ها، ترپنوئیدها، فنیلپروپین، و دیگر ترکیبات تقسیم می‌شوند. خاصیت آبرگریزی اسانس‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشد که موجب نفوذ اسانس به لیپیدهای غشاء سلول باکتری و میتوکندری‌ها می‌شود و سبب اختلال در ساختمان‌های آنها و ایجاد نفوذپذیری بیشتر می‌گردد که متعاقبا باعث خروج و نشت یون‌ها و سایر محتویات سلولی می‌شود. اسانس‌های با منشا گیاهی، GRAS هستند و خاصیت سمی ندارند (Oishi, et al. 2017). گیاه دارچین بدلیل وجود ترکیبات فرآر (سینامالدهید، اوژنول و سینامیک اسید) موسیالژها، دیترپن‌ها و پروآنتوسیانیدین‌ها دارای خواص مطلوب ضدسرطانی، ضدتوموری، ضد میکروبی، ضد قارچی و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد (Cava, et al. 2007; Chorianopoulod, et al. 2008). ترکیبات نامبرده شده در اسانس دارچین قابل مشاهده است که از میان آنها سینامالدهید بیشترین مقدار را دارا می‌باشد. سینامالدهید با گروه‌های کربونیلی موجود در زنجیره‌های اسیدآمینه پروتئین‌ها پیوند برقرار می‌کند و بدین ترتیب کربوکسیلز دایی اسیدآمینه را مختل کرده و از این طریق خاصیت ضد میکروبی خود را اعمال می‌کند. امولسیون کردن یکی از روش‌های ریزپوشانی می‌باشد که به دلایلی از جمله حفظ ترکیبات مختلف غذایی، پایدار کردن آنها، جلوگیری از تجزیه شدن آنها و حفظ فعالیت زیستی برخی اجزاء به کار می‌رود. اگر اندازه ذرات بزرگتر از 100 نانومتر باشد، محلول، میکروامولسیون و اگر قطر ذرات کوچکتر از 100 نانومتر باشد محلول، نانوامولسیون نامیده می‌شود. نانوامولسیون اسانس، مخلوط روغن و سورفاکتانت و کوسورفاکتانت است که به صورت روغن/آب یا آب/روغن می‌باشد و اندازه ذرات نانوامولسیون بین 10 تا 100 نانومتر است (Letsididi, et al. 2015) که پایداری آبی خوبی داشته و در نتیجه خاصیت ضد میکروبی بیشتری دارد (Duncan, et al. 2018). در نانوامولسیون کردن اسانس، اندازه ذرات کاهش یافته و سطح تماس افزایش می‌یابد که از اینرو محلول نانوامولسیون تماس بیشتری با ماده هدف، از جمله باکتری خواهد داشت (Ghosh, et al. 2013). در 20 سال گذشته، مطالعات مختلفی در زمینه کاربرد اسانس‌های گیاهی در کنترل اشکال رویشی عوامل بیماری‌زای مواد غذایی صورت گرفته است. ولی در سالیان اخیر، گزارشات مطالعات صورت گرفته در مورد خاصیت ضد بیوفیلیمی اسانس‌ها و ترکیبات تشکیل دهنده آن افزایش چشمگیری یافته است (oliveira, et al. 2010; Valeriano, et al. 2012).

از جمله پژوهش‌های اخیر در این زمینه می‌توان به مطالعه‌ی چوسیانگ و همکاران در سال 2019 اشاره کرد. در این مطالعه به فعالیت ضد میکروبی نانوامولسیون اسانس دارچین را علیه باکتری‌های اشریشیا کلی، سالمونالا تیفیموریوم، استافیلوکوکوس اورئوس و ویبریو پاراهمولیتیکوس پرداخته شده است. مشاهداتشان بیانگر این امر بود که MIC نانوامولسیون اسانس دارچین بیشتر از اسانس خالص بود و این موضوع مرتبط با اندازه ذرات نانوامولسیون می‌باشد (Chuesiang et al, 2019; Xue et al, 2015).

هدف از این مطالعه، بررسی عوامل دخیل (دما، pH و غلظت نمک) در تشکیل بیوفیلیم باکتری‌های سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم در سطح پلی‌استیرن بود. همچنین اثربخشی نانوامولسیون اسانس دارچین در کنترل و حذف بیوفیلیم سالمونالا انتریتیدیس

و سالمونالا تیفیموریوم تشکیل شده در شرایط بهینه از لحاظ دما، pH و غلظت نمک در دمای 8 و 25 درجه سانتیگراد و زمان‌های تماس 5، 15 و 25 دقیقه و غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس دارچین به روش تقطیر با آب: پوست دارچین از بازار عطاری ارومیه خریداری و با استفاده از آسیابکن برقی، آسیاب گردید. سپس به نسبت 10:1 پودر دارچین و آب مقطر داخل بالن کلونجر ریخته شد. بعد از گذشت زمان مناسب اسانس بدست آمده، جمع‌آوری گردید و بعد از استریلیزاسیون با فیلتر سرسرنگی 0/22 میکرونی، تا زمان مصرف در ظرف تیره در دمای 4 درجه سانتیگراد قرار گرفت.

آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین: آنالیز ترکیبات شیمیایی به وسیله دستگاه GC-MS انجام شد. در ابتدا دمای آون به مدت سه دقیقه در 80 درجه سانتیگراد قرار داشت و سپس با سرعت 8 درجه سانتیگراد بر دقیقه تا دمای 180 درجه سانتیگراد افزایش یافت و مجدداً سه دقیقه در همان دما ثابت ماند. گاز حامل در دستگاه، گاز هلیوم بود. دمای دریچه تزریق در 250 درجه سانتیگراد تنظیم شده بود. شناسایی ترکیبات با استفاده از اطلاعات موجود در کتابخانه wiley انجام شد.

تهیه نانوامولسیون دارچین: نانو امولسیون دارچین برای مجموع 100 گرم، تهیه گردید. ابتدا توئین به اسانس اضافه شد و مخلوط با استفاده از همزن مگنتدار با دور 500 rpm به مدت 30 دقیقه هم زده شد. سپس بافر با سرعت جریان 2 میلی لیتر بر دقیقه به آن اضافه گردید و در نهایت مخلوط دوباره با سرعت 500 rpm به مدت 60 دقیقه همزده شد و سپس به مدت 20 دقیقه در حمام اولتراسوند قرار داده شد. نانوامولسیون به دست آمده در دمای اتاق نگهداری شد.

تهیه و آماده‌سازی باکتری: باکتری مورد استفاده، ایزوله خالص سازی شده سالمونالا تیفیموریوم و سالمونالا انتریتیدیس بودند که از سطوح قصابی شهر ارومیه جداسازی شده بودند. باکتری در کرایوتیوب‌های حاوی گلیسرول در دمای 70- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شد. برای فعال کردن باکتری، ابتدا 30 میکرولیتر از سوسپانسیون باکتری به 5 میلی لیتر محیط تریپتیک سوی براث انتقال داده شد و در انکوباتور 37 درجه قرار داده شد. در ادامه با آنس حلقوی در محیط تریپتیک سوی آگار کشت داده شد. بعد از گذشت 24 ساعت، از هر جدایه، کلونی تک به 10 میلی لیتر محیط BHI براث منتقل و به مدت 24-18 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوامولسیون دارچین علیه سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم: به منظور تعیین MIC از روش میکرودايلوشن و میکروپلیتهای 96خانه‌ای استفاده گردید. در ادامه 48 میکرولیتر نانوامولسیون به 2 میلی لیتر DMSO 10 درصد اضافه گردید. سپس با رقت سازی، غلظت‌های 12، 6، 3، 1.5، 0.75، 0.37 میکرولیتر بر میلی لیتر تهیه شد. برای هر باکتری یک میکروپلیت در نظر گرفته شد. در چند چاهک از میکروپلیت، 200 میکرولیتر محیط کشت BHI براث به منظور کنترل استریلیتی و 180 میکرولیتر BHI براث و 20 میکرولیتر باکتری به‌منظور کنترل رشد اضافه شد. برای هر غلظت نانوامولسیون شش تکرار در میکروپلیت وجود داشت. سپس میکروپلیت‌ها در میکروپلیت-انکوباتور با دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه شدند. پس از گذشت 24 ساعت، MIC هر دو باکتری به روش چشمی و مشاهده

کدورت و رنگ آمیزی با رزازورین 0/01 درصد تعیین گردید. برای تعیین حداقل غلظت کشندگی نیز از چاهک MIC و دو چاهک بالاتر (غلظت بیشتر) استفاده شد. بدین منظور، 10 میکرولیتر از چاهک‌های مورد نظر برداشته شده و در محیط کشت جامد تریپتیک سوی آگار بوسیله پیپت پاستور L شکل پخش شد و به مدت 24 ساعت در دمای 37 درجه سانتیگراد انکوبه گردید. هر دو تست حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی با تکرارهای بیش از سه بار انجام شد.

بررسی توانایی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سالمونلا تیفیموریوم و سالمونلا انتریتیدیس در سطح پلی‌استیرن: با اندکی تغییر به روش Koutsoumanis و Lianou، تشکیل بیوفیلم در میکروپلیت 96 خانه ته‌صاف بررسی شد. ابتدا در چاهک‌ها 180 میکرولیتر محیط کشت BHI برات با pH های 5، 6/5 و 8 و غلظت نمک 0/5، 4/5 و 8/5 ریخته شد و سپس 20 میکرولیتر از باکتری اضافه شد. تعدادی از چاهک‌ها به منظور کنترل استریلیتی، کنترل رشد انتخاب شد. میکروپلیت‌ها با تیمارهای مختلف تحت دماهای 13، 25، و 37 درجه سانتیگراد به مدت 48 ساعت در انکوباتور نگهداری شدند و پس از اتمام انکوباسیون، محتوای میکروپلیت دور ریخته شد و چاهک‌ها یکبار با محلول PBS استریل شستشو داده شد. باکتری‌های چسبیده با متانول 99 درصد سرد در هر چاهک تثبیت شدند. پس از گذشت چند دقیقه میکروپلیت‌ها با وارونه کردن خالی شدند و در مجاورت هوا خشک گردیدند. سپس کریستال ویوله یک درصد در هر چاهک ریخته شد و در دمای محیط انکوبه شد. سپس میکروپلیت خالی شد و با محلول PBS استریل سه بار شستشو داده شد و در مجاورت هوا خشک شد. در انتها در هر چاهک اتانول خالص 96٪ اضافه و پس از گذشت زمان مورد نیاز، جذب نوری OD آن با استفاده از دستگاه الایزا ریدر در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش بیش از 5 بار و هر بار با شش تکرار انجام گرفت.

تهیه محلول بنزالکانیوم کلراید: به منظور مقایسه اثرات ضدبیوفیلمی نانوامولسیون دارچین با ضد عفونی‌کننده‌های معمول، از بنزالکانیوم کلراید با غلظت MIC استفاده شد. محلول در روز آزمایش به صورت تازه تهیه می‌شد و با استفاده از فیلتر 0/22 میکرونی استریل و مورد استفاده قرار می‌گرفت.

تهیه محلول خنثی‌کننده: برای جلوگیری از اثرات ترکیبات ضد میکروب مورد استفاده در این پژوهش، محلول خنثی‌کننده در روز آزمایش به صورت تازه تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. محلول پس از استریل شدن با استفاده از فیلتر سرسرنگی 0/22 میکرونی، به صورت تازه استفاده شد.

بررسی خاصیت مهارتی نانوامولسیون دارچین بر تشکیل بیوفیلم: برای هر باکتری یک میکروپلیت در نظر گرفته شد. ابتدا 20 میکرولیتر از محلول باکتری در هر خانه ریخته شد. سپس به هر چاهک محیط کشت BHI برات با شرایط بهینه هر باکتری (و 20 میکرولیتر از غلظت‌های 2MIC، MIC، 1/2MIC، 1/4MIC، 1/8MIC و 1/16MIC نانوامولسیون و بنزالکانیوم کلراید ریخته شد. چاهک‌هایی به منظور کنترل استریلیتی و کنترل رشد در نظر گرفته شد. برای هر غلظت نانوامولسیون شش تکرار در میکروپلیت وجود داشت. میکروپلیت مربوط به باکتری سالمونلا انتریتیدیس در دمای 27/5 درجه سانتیگراد و میکروپلیت مربوط به باکتری سالمونلا تیفیموریوم در دمای 29/9 درجه سانتیگراد به مدت 24 ساعت انکوبه شدند. پس از اتمام انکوباسیون، محتوای میکروپلیت دور ریخته شد و چاهک‌ها با محلول PBS استریل شستشو داده شد. باکتری‌های چسبیده با متانول 99٪ سرد در هر چاهک تثبیت شدند. پس از گذشت زمان مناسب میکروپلیت‌ها با وارونه کردن خالی شدند و در مجاورت هوا خشک گردیدند. سپس کریستال ویوله یک درصد در هر چاهک ریخته شد و در دمای محیط انکوبه شدند. سپس میکروپلیت خالی شد و با محلول PBS

استریل شست‌وشو داده شد و در مجاورت هوا خشک شد. در انتها در هر چاهک اتانول خالص 96٪ اضافه و پس از گذشت زمان مناسب OD آن با استفاده از دستگاه الیزا ریدر در طول موج 570 نانومتر اندازه‌گیری شد. این آزمایش بیش از 5 بار و هر بار با شش تکرار انجام گرفت. درصد مهار تشکیل بیوفیلم طبق فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{درصد مهار بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(C-T)}{(C-B)} \times 100$$

B = میانگین جذب نوری در چاهک‌های حاوی براث خالی

C = جذب نوری در چاهک‌های حاوی براث و باکتری

T = جذب نوری چاهک‌های تیمار

بررسی خاصیت حذف بیوفیلم نانومولسیون اسانس دارچین: بهترین شرایط تشکیل بیوفیلم از نظر دما، غلظت نمک و pH که در آزمایش تشکیل بیوفیلم مشخص شده بود انتخاب گردید و جهت بررسی اثر ضد بیوفیلیمی نانومولسیون اسانس دارچین بکار برده شد. با استفاده از میکروپلیت 96 خانه، ابتدا در هر چاهک به مقدار مورد نیاز محلول باکتری ریخته شد و سپس محیط کشت BHI برآث اضافه گردید. چاهک‌های به عنوان کنترل استریلیتی و کنترل رشد انتخاب شد. بعد از 24 و 48 ساعت انکوباسیون در شرایط بهینه تشکیل بیوفیلم، محتوی میکروپلیت‌ها دور ریخته شد و میکروپلیت‌ها با PBS شست و شو داده شد. سپس در مجاورت هوا خشک شد. در مرحله بعد، از نانومولسیون اسانس دارچین با غلظت‌های MIC، 2MIC و 4MIC و بنزالکانیوم کلراید در چاهک‌ها ریخته شد و به مدت 5، 15 و 25 دقیقه در دمای 8 و 25 انکوبه شدند. سپس محتویات میکروپلیت‌ها تخلیه شد و به هر چاهک محلول خنثی کننده اضافه گردید. سپس محتویات میکروپلیت‌ها دور ریخته شد و با محلول PBS استریل شست‌وشو داده شدند و سپس در مجاورت هوا خشک شد. در ادامه به هر چاهک کریستال ویوله یک درصد جهت رنگ آمیزی بیوفیلم اضافه شد. میکروپلیت‌ها بعد از گذشت زمان مورد نیاز با آب معمولی شسته و در دمای محیط خشک شدند. اتانول 95٪ در چاهک‌هایی که حاوی نمونه بودند، ریخته شد و سپس OD570 به کمک دستگاه الیزا ریدر اندازه‌گیری شد. درصد کاهش بیوفیلم با فرمول ذیل محاسبه می‌گردد:

$$\text{درصد کاهش بیوفیلم} = \frac{(C-B)-(C-T)}{(C-B)} \times 100$$

B = میانگین جذب نوری در چاهک‌های حاوی براث خالی

C = جذب نوری در چاهک‌های حاوی براث و باکتری

T = جذب نوری چاهک‌های تیمار

آنالیز آماری: تمامی آزمایشات در حداقل چهار تکرار انجام شدند. اثرات همزمان pH (5، 6/5 و 8) دمای انکوباسیون (13، 25 و 37) درجه سانتیگراد و غلظت نمک (0/5، 4/5 و 8) درصد بر تشکیل بیوفیلم جدایه‌های سالمونال با استفاده از طرح Behnken-Box و به کمک نرم افزار Expert-Design نسخه 11 بررسی شد. نتایج داده‌های به‌دست‌آمده مربوط به آزمون اثرات ضد بیوفیلمی نانوامولسیون اسانس دارچین با نرم‌افزار SPSS نسخه 18 و با روش GLM انجام گرفته و مقایسه میانگین‌ها به روش tuckey انجام شد.

نتایج

نتایج آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین: آنالیز ترکیبات اسانس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی، وجود 31 ترکیب مختلف را نشان داد که سینامیک آلدهید با 93/69 درصد، دلتا کادینن با 5/19 درصد و آلفا کوپان با 4/85 درصد ترکیبات اصلی اسانس را تشکیل می‌دهند.

نتایج آزمون حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانوامولسیون دارچین: جدول 1 نشان‌دهنده حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس دارچین و نانوامولسیون آن بر علیه سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم است.

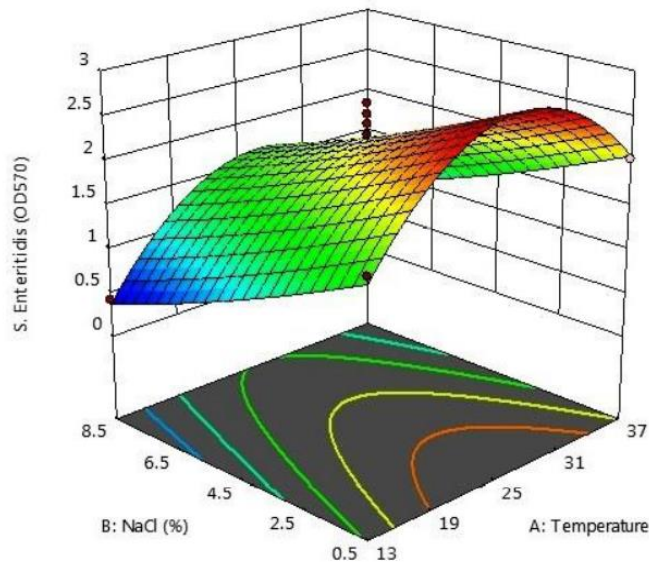
جدول 1: حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس و نانوامولسیون دارچین

نانوامولسیون دارچین		اسانس دارچین		باکتری
MBC ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	MIC ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	MBC ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	MIC ($\mu\text{l}/\text{mL}$)	
0.6	0.6	0.6	0.6	سالمونالا انتریتیدیس
1.2	0.6	1.2	0.6	سالمونالا تیفی موریوم

نتایج اندازه ذرات نانوامولسیون دارچین و پتانسیل زتا: اندازه ذرات این نانوامولسیون طبق گزارش مطالعه قبل، 66/6 نانومتر و پتانسیل زتا، 2/3- میلی ولت بود.

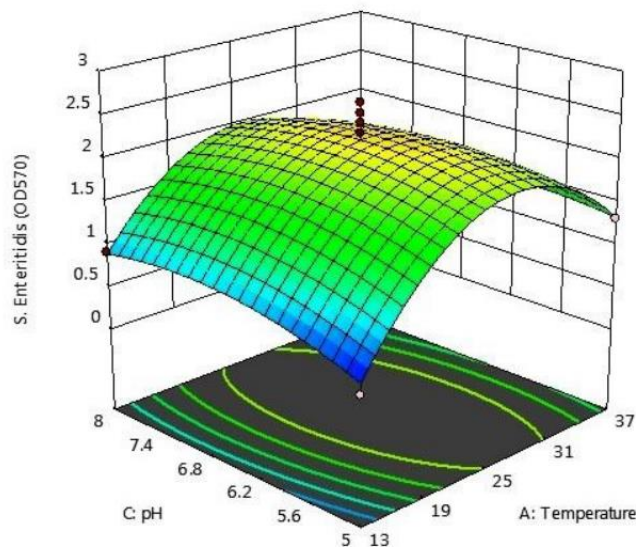
با توجه به داده‌های بدست‌آمده تاثیر همزمان فاکتورهای دما، pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم باکتری سالمونالا انتریتیدیس و سالمونالا تیفیموریوم بررسی شد و نتایج در ادامه بصورت نمودارهایی در ادامه آمده است.

شکل 1 نشان‌دهنده اثر همزمان درجه حرارت و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری سالمونالا انتریتیدیس می‌باشد. با توجه به این شکل میتوان به این نکته پی برد که در سطوح پایین غلظت نمک (0/5 تا 2/7 درصد)، با افزایش دما، میزان تشکیل بیوفیلم نیز افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار تشکیل بیوفیلم در محدوده دمای 19-34 درجه سانتیگراد است. همچنین با افزایش درصد غلظت نمک، قدرت تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد. بیشترین کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم، در سطح پایین (13 درجه سانتی گراد) و در سطح بالا (37 درجه سانتی گراد) مشاهده می‌شود.



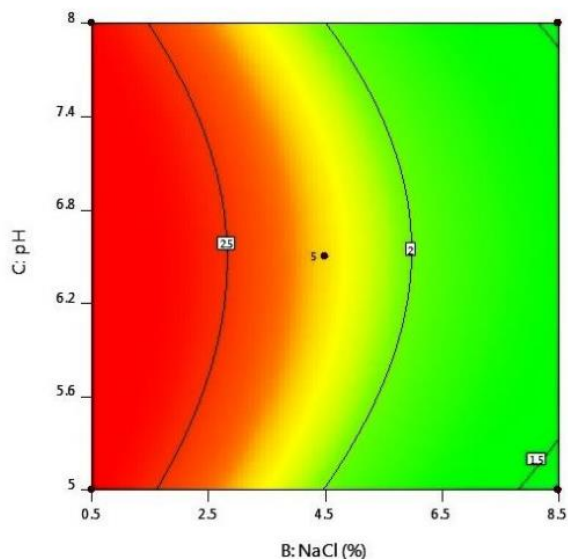
شکل 1: اثرات همزمان درجه حرارت و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس در میکروپلیت پلی استیرین

شکل 2 بیان می کند که سطوح مختلف فاکتور pH در تشکیل بیوفیلم تاثیر چندانی نداشته است، هرچند با کاهش pH میزان تشکیل بیوفیلم نیز کاهش می یابد ولی تاثیر تغییرات دمایی بسیار قابل توجه بوده است. درجه حرارت در سطوح میانی (21-31) درجه سانتیگراد بیشترین تاثیر مثبت را بر میزان تشکیل بیوفیلم گذاشته است.



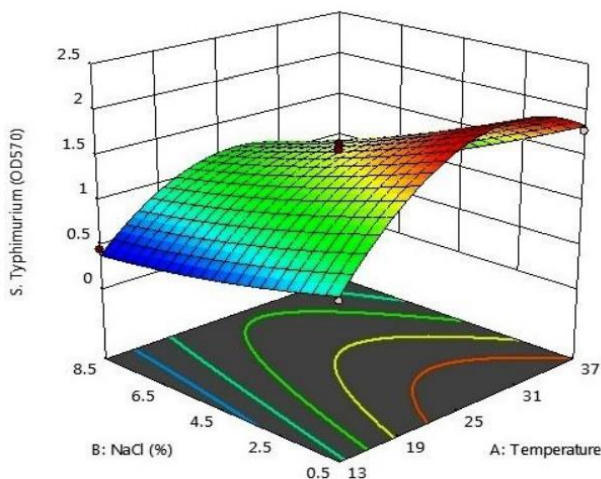
شکل 2: اثرات همزمان دما و pH بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس در میکروپلیت پلی استیرین

شکل 3 تاثیر همزمان pH و غلظت NaCl را نشان می‌دهد. در سطوح پایین غلظت نمک (0/5 تا 2/5 درصد) بیشترین میزان بیوفیلم مشاهده می‌شود. در این بررسی نیز سطوح مختلف pH تاثیر چندانی در میزان تشکیل بیوفیلم از خود نشان نداد.



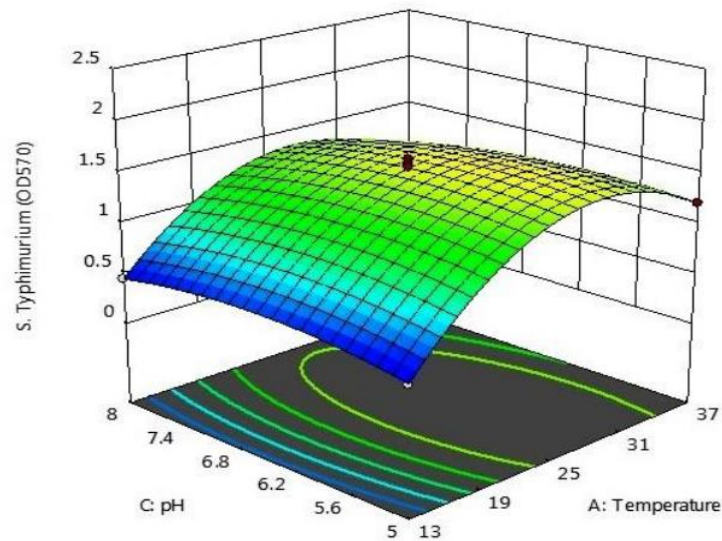
شکل 3: اثرات همزمان pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونال انتریتیدیس در میکروپلیت پلی استیرین

شکل 4 نشان دهنده‌ی اثر همزمان درجه حرارت و غلظت نمک را بر میزان تشکیل بیوفیلم توسط باکتری سالمونلا تیفیموریوم نشان می‌دهد. در سطوح پایین غلظت نمک (0/5 تا 1/2 درصد)، با افزایش دما، میزان تشکیل بیوفیلم نیز افزایش می‌یابد و بیشترین مقدار تشکیل بیوفیلم در محدوده دمای 24 تا 34 درجه سانتیگراد است. همچنین با افزایش درصد غلظت نمک، میزان تشکیل بیوفیلم کاهش می‌یابد. بیشترین کاهش قدرت تشکیل بیوفیلم، در سطح پایین (13 درجه سانتی گراد) و در سطح بالا (37 درجه سانتیگراد) مشاهده می‌شود.



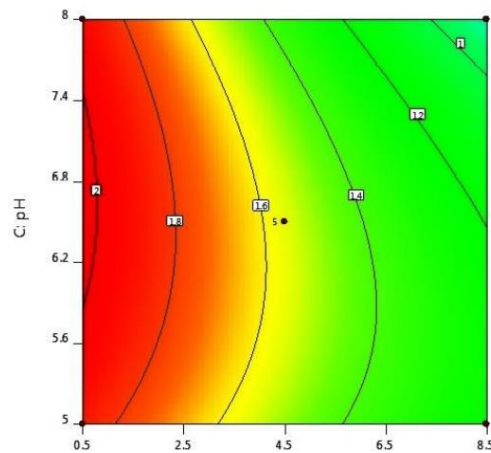
شکل 4: اثرات همزمان دما و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم در میکروپلیت پلی استیرین

شکل 5 نشان می‌دهد که سطوح مختلف فاکتور pH در تشکیل بیوفیلم تاثیر چندانی نداشته است بدین صورت که هم در pH های پایین و هم در pH های بالا، با افزایش دما میزان تشکیل بیوفیلم افزایش می‌یابد. درجه حرارت در سطوح میانی (31-25 درجه سانتیگراد) بیشترین تاثیر را بر میزان تشکیل بیوفیلم را داشته است.



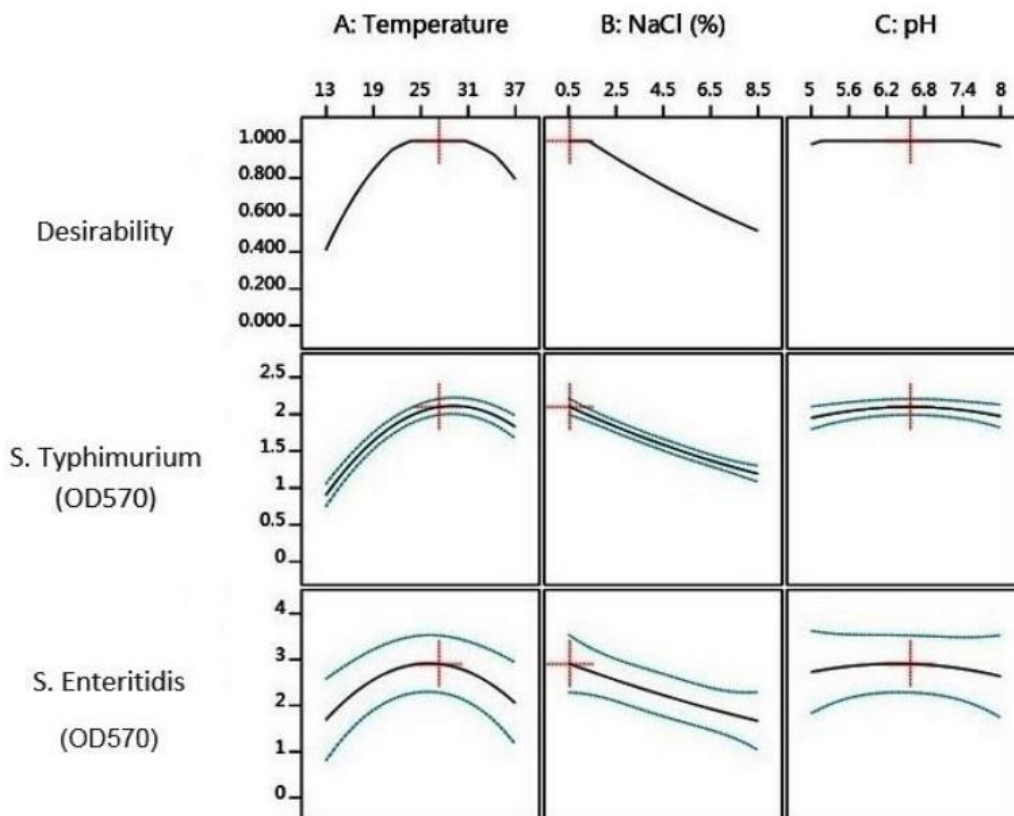
شکل 5: اثرات همزمان دما و pH بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم در میکروپلیت پلی استیرین

شکل 6 نشانگر آن است که در سطح پایین غلظت نمک، هنگامی که pH در محدوده 6/2 تا 7/2 باشد، بیشترین میزان بیوفیلم تشکیل میشود. در این بررسی نیز سطوح مختلف pH تاثیر چندانی در میزان تشکیل بیوفیلم نداشت و با افزایش غلظت نمک، به تدریج از میزان تشکیل بیوفیلم کاسته می‌شود.



شکل 6: اثرات همزمان pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم در میکروپلیت پلی استیرین

پس از بررسی راه‌حل‌های ارائه شده توسط نرم افزار، با استفاده از نمودارهای ارائه شده، بهترین شرایط تشکیل بیوفیلم باکتری‌های سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفیموریوم انتخاب شدند.



شکل 7: اثرات همزمان دما، pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفیموریوم در میکروپلیت پلی استیرن

نتایج مربوط به بررسی تاثیر همزمان دما، pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفیموریوم که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، نشان داد در صورتی که دما در حدود 27/5 درجه سانتیگراد، غلظت نمک معادل 0/7٪ و pH معادل 6/5 بود، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس و در شرایطی که دما در حدود 29/9 درجه سانتیگراد، غلظت نمک معادل 0/6٪ و pH معادل 6/8 بود، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم مشاهده شد.

بررسی اثرات ضدبیوفیلمی نانوامولسیون اسانس دارچین: همانطور که در جدول 2 مشاهده می‌شود غلظت‌های MIC، 2MIC و 1/2 MIC تاثیر چشم‌گیری در جلوگیری از جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری سالمونلا انتریتیدیس دارد ولی بین این غلظت‌ها به جهت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، تفاوت آماری معنی دار مشاهده نمی‌شود ($p > 0.05$). از طرفی حتی غلظت‌های پایین نانوامولسیون دارچین از جمله 1/2 MIC، 1/4 MIC و 1/8 MIC اثر ضدبیوفیلمی بهتری نسبت به بنزالکانیوم کلراید با غلظت MIC از خود نشان داده‌اند بطوری که نانوامولسیون اسانس دارچین با غلظت 1/8 MIC توانسته است میزان تشکیل بیوفیلم را 72/92 درصد کاهش دهد که بطور معنی‌داری بیشتر از اثر بنزالکانیوم کلراید با غلظت MIC (60.19) درصد می‌باشد.

جدول 2: اثرات غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس در میکروپلیت پلی استیرن در دمای 27/5 درجه سانتیگراد

کاهش بیوفیلم (درصد)	تیمار	
98/81±2/14 ^a	2MIC	نانوامولسیون
98/44±1/69 ^a	MIC	
97/53±0/89 ^a	1/2MIC	
87/54±2/80 ^b	1/4MIC	
72/92±2/93 ^c	1/8MIC	
54/42±4/22 ^e	1/16MIC	
39/44±4/84 ^f	1/32MIC	
60/19±0.57 ^d	بنزالکانیوم کلراید (MIC)	

همانطور که در جدول 3 مشاهده می‌شود، غلظت‌های 2MIC، MIC و 1/2 MIC تاثیر زیادی در جلوگیری از تشکیل بیوفیلم باکتری سالمونلا تیفی موریوم دارند ولی بین این غلظت‌ها به جهت جلوگیری از تشکیل بیوفیلم، تفاوت آماری مشاهده نمی‌شود (p>0.05). همچنین غلظت‌های پایین نانوامولسیون اسانس دارچین از جمله 1/2 MIC و 1/4 MIC اثر ضدبیوفیلمی بیشتری نسبت به بنزالکانیوم کلراید با غلظت MIC از خود نشان داده‌اند. با کاهش غلظت نانوامولسیون دارچین به مقدار MIC 1/16 و 1/32 MIC توانایی ممانعت از تشکیل بیوفیلم نانوامولسیون، بسیار کاهش می‌یابد (p<0.05) و تفاوت معناداری در میزان کاهش بیوفیلم بین این دو غلظت مشاهده نمی‌شود (p>0.05) و تفاوت معناداری در میزان کاهش بیوفیلم بین این دو غلظت مشاهده نمی‌شود (p>0.05).

جدول 3: اثرات غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین بر ممانعت از تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم در میکروپلیت پلیاستیرن در دمای 29/9 درجه سانتیگراد.

کاهش بیوفیلم (درصد)	تیمار	
96/23±21 ^a	2MIC	نانوامولسیون
95/78±1/88 ^a	MIC	
94/33±1/46 ^a	1/2MIC	
76/25±0/74 ^b	1/4MIC	
34/33±3/6 ^d	1/8MIC	
5/83±0/2 ^e	1/16MIC	
5/50±0/99 ^e	1/32MIC	
64/86±0/41 ^c	بنزالکانیوم کلراید (MIC)	

نتایج ارزیابی آزمون حذف بیوفیلم: بر اساس نتایج بدست آمده افزایش معنی‌داری در قدرت حذف بیوفیلم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین مشاهده گردید و با افزایش غلظت نانوامولسیون و زمان تماس، درصد حذف بیوفیلم افزایش یافته است.

در غلظت MIC بین زمانهای 15 و 25 دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$). در زمان 25 دقیقه بین تیمارهای MIC و 2 MIC تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ولی با افزایش غلظت نانوامولسیون به 4 MIC کاهش معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$). بیشترین تاثیر را نانوامولسیون با غلظت 4 MIC گذاشته است که موجب حذف 96/85 درصد بیوفیلیم شده است. همچنین در مورد بنزالکانیوم کلراید هم، با افزایش زمان از 5 به 25 دقیقه، میزان حذف بیوفیلیم افزایش معنی‌داری داشت ($p<0.05$). همچنین افزایش معنی‌داری در قدرت حذف بیوفیلیم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین مشاهده گردید و با افزایش غلظت نانوامولسیون و زمان تماس، درصد حذف بیوفیلیم افزایش یافته است بطوری که نانوامولسیون با غلظت 4 MIC قادر به حذف 97/42 درصد بیوفیلیم بود. این در حالی است که در غلظت 4 MIC با افزایش زمان از 5 دقیقه به 15 و 25 دقیقه تفاوت معنی‌داری در درصد حذف بیوفیلیم مشاهده نشد ($p>0.05$). همچنین در مدت زمان 25 دقیقه بین غلظت‌های 2 MIC و 4 MIC تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p<0.05$). همچنین در بنزالکانیوم کلراید، با افزایش زمان از 5 به 15 دقیقه، نتیجه معنی‌دار بود ($p<0.05$) اما با افزایش زمان به 25 دقیقه افزایش معنی‌داری در درصد حذف بیوفیلیم مشاهده نشد ($p>0.05$).

با افزایش غلظت و زمان تماس نانوامولسیون، افزایش معنی‌داری در درصد حذف بیوفیلیم مشاهده شد ($p<0.05$). در هر دو دمای 8 و 25 درجه سانتیگراد و در تمامی زمان‌های تماس، نانوامولسیون با غلظت 4 MIC بیشترین تاثیر بر درصد کاهش بیوفیلیم را داشته است. بر اساس نتایج بدست آمده، افزایش معنی‌داری در قدرت حذف بیوفیلیم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین دیده شد. با افزایش زمان و غلظت نانوامولسیون، درصد حذف بیوفیلیم بیشتر و تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$). کمترین تاثیر متعلق به غلظت MIC در مدت زمان 5 دقیقه معادل 54/57 درصد کاهش و بیشترین تاثیر متعلق به غلظت 4 MIC در مدت زمان 25 دقیقه معادل 71/32 درصد کاهش بود. در مورد بنزالکانیوم، با افزایش زمان به 15 دقیقه کاهش معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$) ولی بین زمان‌های 15 و 25 دقیقه تفاوت معنی‌دار نبود ($p>0.05$).

اثرات نانوامولسیون اسانس دارچین در دمای 25 درجه سانتیگراد بر بیوفیلیم 48 ساعته سالمونلا انتریتیدیس تشکیل شده در میکروپلیت، در دمای 29/9 درجه سانتیگراد و pH معادل 6/5 و در زمانهای تماس 5، 15 و 25 دقیقه نشان داد که افزایش معنی‌داری در قدرت حذف بیوفیلیم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین وجود دارد. با افزایش زمان و غلظت نانوامولسیون، درصد حذف بیوفیلیم بیشتر و تفاوت معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$). در تیمار MIC بین زمانهای 5 و 15 دقیقه تفاوت معنی‌داری نبود ($p>0.05$) ولی با افزایش زمان به 25 دقیقه کاهش معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$).

اثرات نانوامولسیون اسانس دارچین در دمای 8 درجه سانتیگراد بر بیوفیلیم 48 ساعته سالمونلا تیپیموریوم تشکیل شده در میکروپلیت، در دمای 29/9 درجه سانتیگراد و pH معادل 6/8 و در زمانهای تماس 5، 15 و 25 دقیقه نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌داری در قدرت حذف بیوفیلیم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین بود. در غلظت‌های MIC و 2 MIC با افزایش زمان، افزایش معنی‌داری در میزان حذف بیوفیلیم مشاهده شد ولی در غلظت 4 MIC با افزایش زمان از 15 به 25 دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0.05$). در بنزالکانیوم کلراید، با افزایش زمان از 5 به 15 دقیقه، نتیجه معنی‌دار نبود اما با افزایش زمان به 25 دقیقه کاهش معنی‌دار مشاهده شد ($p<0.05$).

اثرات نانوامولسیون اسانس دارچین در دمای 25 درجه سانتیگراد بر بیوفیلیم 48 ساعته سالمونلا تیپیموریوم تشکیل شده در میکروپلیت، در دمای 29/9 درجه سانتیگراد و pH معادل 6/8 و در زمانهای تماس 5، 15 و 25 دقیقه نشان دهنده‌ی افزایش معنی‌دار در قدرت حذف بیوفیلیم توسط غلظت‌های مختلف نانوامولسیون اسانس دارچین بود. بیشترین درصد کاهش را تیمار 4 MIC داشته است که موجب کاهش 35/95 درصد بیوفیلیم شده است. در این غلظت بین زمان‌های 5 و 15 دقیقه کاهش معنی‌دار مشاهده

نشد ولی با افزایش زمان به 25 دقیقه کاهش معنی دار بود ($p < 0.005$). اثرات ضدبیوفیلمی بنزالکانیوم کلراید به طور معنی داری نسبت به سه تیمار اسانس بیشتر بود ($p < 0.05$).

بحث، نتیجه گیری

امروزه باکترهای پاتوژن که دارای مقاومت آنتی بیوتیکی هستند در حال گسترش هستند. بسیاری از پاتوژن‌ها منشأ غذایی دارند که از سطوح فرآوری مواد غذایی وارد چرخه غذایی انسان می‌شوند. تشکیل اشکال بیوفیلمی باکتریها متأثر از دما، درجه اسیدی، شرایط تغذیه‌ای و غلظت نمک است. نتایج مربوط به آنالیز ترکیبات شیمیایی اسانس دارچین به وسیله دستگاه GC/MS نشان داد که سینامیک آلدئید با مقدار 69/93٪، دلتا کادینن با 5/19٪ و آلفاکوپان با 4/85٪ بیشترین ترکیب موجود بوده‌اند. MIC و MBC اسانس دارچین برای باکتری سالمونلا انتریتیدیس معادل 0/6 میکرولیتر بر لیتر و برای باکتری سالمونلا تیفیموریوم بترتیب برابر با 0/6 و 1/2 میکرولیتر بر لیتر میباشد. نتایج مربوط به نانوامولسیون دارچین برای هر دو باکتری با نتایج بدست آمده با اسانس دارچین یکسان است. نتایج مربوط به بررسی تاثیر همزمان دما، pH و غلظت نمک بر میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفیموریوم نشان داد در صورتی که دما در حدود 27/5 درجه سانتی-گراد، غلظت نمک معادل 0/7 و pH معادل 6/5 بود، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا انتریتیدیس و در شرایطی که دما در حدود 29/9 درجه سانتیگراد، غلظت نمک معادل 0/6 و pH معادل 6/8 بود، بیشترین میزان تشکیل بیوفیلم سالمونلا تیفیموریوم مشاهده شد. نتایج آزمون مهار تشکیل بیوفیلم حاکی از آن بود که نانوامولسیون اسانس دارچین اثر مهاری بسیار زیادی داشت و در غلظت‌های پایین نیز اثر ممانعت‌کنندگی بیشتری نسبت به بنزالکانیوم با غلظت MIC از خود نشان داد. نتایج آزمون حذف بیوفیلم نشان داد که افزایش زمان و غلظت نانوامولسیون اسانس دارچین باعث افزایش معنی دار اثر ضدبیوفیلمی هر سه غلظت می‌گردد، به طوری که در غلظت 4 MIC نانوامولسیون و در زمان تماس 25 دقیقه بیشترین درصد کاهش بیوفیلم مشاهده شد. همچنین کاهش دمای نانوامولسیون نیز باعث افزایش اثربخشی آن شد، بطوری که در دمای 8 درجه کاهش بیوفیلم بیشتری نسبت به دمای 25 درجه اتفاق افتاد. میتوان ترکیبات ضد میکروبی گیاهی را جایگزین مواد ضد عفونیکننده صنعتی کرد. گیاه دارچین به دلیل خواص ضد میکروبی مطلوب خود برای از بین بردن اشکال بیوفیلمی باکتری سالمونلا انتریتیدیس و سالمونال تیفیموریوم مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمایشات ضدبیوفیلمی نشان داد که میتوان از نانوامولسیون اسانس دارچین به عنوان یک محلول مناسب جهت مهار تشکیل و یا حذف بیوفیلم جدایه‌های سالمونلا در سطح پلی‌استیرن استفاده کرد.

منابع

آخوندزاده، ا و همکاران، 1393. اثر ترکیبی لیزوزیم و اسانس آویشن شیرازی بر باکتری ویبریو پاراهمولیتیکوس. فصلنامه گیاهان دارویی. سال سیزدهم. دوره دوم. شماره مسلسل پنجاهم. صفحات: 27-34.

آدامز آ و موس، ام، 1381. میکروبیولوژی مواد غذایی. (ترجمه مرتضوی، ع و ماهونک، ع). مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی

جی، جیمز ام، 1382. میکروبیولوژی غذایی مدرن. (ترجمه مرتضوی، سید علی و معتمدزادگان، علی و گوهری اردبیلی، اشرف و اعلمی، مهران). مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد.

ر ضویلر، ودود و همکاران، 1387. میکروب های بیماری زا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی م سمومیت های غذایی. چاپ اول، تهران: موسسه انتشارات دانشگاه.

رکنی، ن، 1375. اصول بهداشت مواد غذایی، چاپ دهم، تهران: انتشارات دانشگاه تهران.

- زرگری، ع.، 1376. گیاهان دارویی، جلد چهارم، چاپ ششم، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: 306-303.
- زینسر اچ و ولفگانگ، جی.، 1397. میکروبی شناسی زینسر. (ترجمه رحیمی، م.) تهران: انتشارات آبیژ.
- علیاکبرلو، ج.، 1387. بهینه‌سازی فاکتورهای فرآوری بمنظور کاهش آمینهای بیوژن در پنیر سفید ایرانی. مقطع دکترا. دانشگاه ارومیه.
- فریزیر و وستهوف، د.، 1381. میکروبیولوژی مواد غذایی. (ترجمه مرتضوی، س. ع.، کاشانی نژاد، م. و ضیا الحق، س.) چاپ دوم، مشهد: انتشارات دانشگاه فردوسی مشهد، صفحات: 76-74.
- فتاحی م و فتاحی، ب.، 1389. مبانی گیاهان دارویی. تهران: انتشارات جهاد دانشگاهی تهران.
- کوئین، پی و همکاران.، 1388. میکروبی‌شناسی دامپزشکی و بیماریهای میکروبی. (ترجمه تقی زهرایی صالحی و جلال شایق)، تهران: انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: 188-176.
- محمودزاده، پ.، 1398. اثر ضد باکتریایی نانوامولسیون دارچین بر علیه اشرشیا کلی و لیستریا مونوسیتوزنز در شیر. مقطع ارشد. دانشگاه ارومیه.
- معصومی، و.، 1394. اثرات ضد میکروبی نانوامولسیون آویشن شیرازی بر علیه اشرشیا کلی. H7:O157 مقطع ارشد. دانشگاه ارومیه.
- مورای، پی. آر.، روزنتال، کی. اس و مایکل، پی. آی.، 1396. باکتری شناسی مورای. (ترجمه عباس بهادر و فاطمه بهادر)، تهران: نشر خسروی.

Abbasvali, M., Ebrahimi Kahrizsangi, A., and Shahriari, F., 2017. Evaluation of the Inhibitory Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Biofilm Formation of Some Foodborne Bacterial Pathogens. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 11(5), 115–124.

Abdallah, M., Benoliel, C., Drider, D., Dhulster, P., and Chihib, N. E., 2014. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of Microbiology*, 196(7), 453–472. <https://doi.org/10.1007/s00203-014-0983-1>.

Aliakbarlu, J., Sadaghiani, S. K., and Mohammadi, S., 2013. Comparative evaluation of antioxidant and anti food-borne bacterial activities of essential oils from some spices commonly consumed in Iran. *Food Science and Biotechnology*, 22(6), 1487–1493. <https://doi.org/10.1007/s10068-013-0242-2>.

Almadiy, A. A., Nenaah, G. E., Al Assiuty, B. A., Moussa, E. A., and Mira, N. M., 2016. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils and major fractions of four *Achillea* species and their nanoemulsions against foodborne bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 529–537.

Amrutha, B., Sundar, K., and Shetty, P. H., 2017. Spice oil nanoemulsions: Potential natural inhibitors against pathogenic *E. coli* and *Salmonella* spp. from fresh fruits and vegetables. *LWT - Food Science and Technology*, 79, 152–159. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.01.031>.

Angelini, P., Pagiotti, R., Menghini, A., and Vianello, B., 2006. Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Annals of Microbiology*, 56(1), 65–69. <https://doi.org/10.1007/BF03174972>.

Anton, N., Benoit, J. P., and Saulnier, P., 2008. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *Journal of Controlled Release*, 128(3), 185–199. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>.

- Ariaifar, M. N., Buzrul, S., and Akçelik, N., 2016. Modeling and predicting the biofilm formation of *Salmonella* Virchow with respect to temperature and pH. *Acta Biologica Hungarica*, 67(1), 99–111. <https://doi.org/10.1556/018.67.2016.1.8>.
- Authority, E. F. S., and Control, E. C. for D. P. and., 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal*, 14(12), e04634.
- Borges, A., Simoes, L. C., Saavedra, M. J., and Simoes, M., 2014. The action of selected isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 86, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2013.01.015>.
- Burt, S., 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223–253. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>.
- Cava, R., Nowak, E., Taboada, A., and Marin-Iniesta, F., 2007. Antimicrobial activity of clove and cinnamon essential oils against *Listeria monocytogenes* in pasteurized milk. *Journal of Food Protection*, 70(12), 2757–2763.
- CDC. 2018. <https://www.cdc.gov/salmonella/index.html/>, Accessed date: 1 February 2018.
- Cerca, N., and Jefferson, K. K., 2008. Effect of growth conditions on poly-N-acetylglucosamine expression and biofilm formation in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 283(1), 36–41. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01142.x>
- Chang, Y., McLandsborough, L., and McClements, D. J., 2013. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(37), 8906–8913. <https://doi.org/10.1021/jf402147p>.
- Chen, H., and Zhong, Q., 2017. Lactobionic acid enhances the synergistic effect of nisin and thymol against *Listeria monocytogenes* Scott A in tryptic soy broth and milk. *International Journal of Food Microbiology*, 260(April), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.08.013>.
- Chorianopoulos, N. G., Giaouris, E. D., Skandamis, P. N., Haroutounian, S. A., and Nychas, G., 2008. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. *Journal of Applied Microbiology*, 104(6), 1586–1596.
- Chuesiang, P., Siripatrawan, U., Sanguandekul, R., Yang, J. S., McClements, D. J., and McLandsborough, L., 2019. Antimicrobial activity and chemical stability of cinnamon oil in oil-in-water nanoemulsions fabricated using the phase inversion temperature method. *LWT*, 110, 190–196.
- Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., and Wyllie, S. G., 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (Tea tree oil). *Journal of Applied Microbiology*, 88(1), 170–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>.
- Cui, H. Y., Zhou, H., Lin, L., Zhao, C. T., Zhang, X. J., Xiao, Z. H., and Li, C. Z., 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil and its application in milk. *The Journal of Animal & Plant Sciences*, 2, 532–541.
- Da Costa, P. M., Loureiro, L., and Matos, A. J. F., 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(1), 278–294. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010278>
- de Melo, A. N. F., de Souza, G. T., Schaffner, D., de Oliveira, T.

- C. M., Maciel, J. F., de Souza, E. L., and Magnani, M., 2017. Changes in thermo-tolerance and survival under simulated gastrointestinal conditions of *Salmonella* Enteritidis PT4 and *Salmonella* Typhimurium PT4 in chicken breast meat after exposure to sequential stresses. *International Journal of Food Microbiology*, 251, 15–23.
- Denis, N., Zhang, H., Leroux, A., Trudel, R., and Bietlot, H., 2016. Prevalence and trends of bacterial contamination in fresh fruits and vegetables sold at retail in Canada. *Food Control*, 67, 225–234.
- Díez-García, M., Capita, R., and Alonso-Calleja, C., 2012. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*, 31(2), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>.
- Dimakopoulou-Papazoglou, D., Lianou, A., and Koutsoumanis, K. P., 2016. Modelling biofilm formation of *Salmonella enterica* ser. Newport as a function of pH and water activity. *Food Microbiology*, 53, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.09.002>.
- Drancourt, M., Bollet, C., Carlioz, A., Martelin, R., Gayral, J. P., and Raoult, D., 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(10), 3623–3630.
- Duarte, J. L., Amado, J. R. R., Oliveira, A. E. M. F. M., Cruz, R. A. S., Ferreira, A. M., Souto, R. N. P., Falcão, D. Q., Carvalho, J. C. T., and Fernandes, C. P., 2015. Evaluation of larvicidal activity of a nanoemulsion of *rosmarinus officinalis* essential oil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 25(2), 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.02.010>.
- Duncan, B., Li, X., Landis, R. F., Kim, S. T., Gupta, A., Wang, L. S., Ramanathan, R., Tang, R., Boerth, J. A., and Rotello, V. M., 2015. Nanoparticle-Stabilized Capsules for the Treatment of Bacterial Biofilms. *ACS Nano*, 9(8), 7775–7782.
- Dunne, W. M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155–166.
- EFSA. 2015. European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control. *EFSA J*, 13, 4329.
- Eurosurveillance editorial team. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 17(10). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- Evrendilek, G. A., and Balasubramaniam, V. M., 2011. Inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* in yogurt drink applying combination of high pressure processing and mint essential oils. *Food Control*, 22(8), 1435–1441.
- Ezeuko, C. C., Sen, A., Grigoryan, A., and Gates, I. D., 2011. Pore-network modeling of biofilm evolution in porous media. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(10), 2413–2423. <https://doi.org/10.1002/bit.23183>.
- Fisher, K., and Phillips, C., 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends in Food Science and Technology*, 19(3), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.11.006>.
- Fratamico, P. M., Annous, B. A., and Guenther, N. W., 2009. *Biofilms in the food and beverage industries*. Elsevier.

- Freitas, W., Zobaa, A. F., Vieira, J. C. M., and McConnach, J. S., 2005. Issues related to wind energy conversion systems. *International Journal of Energy Technology and Policy*, 3(4), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.10.015>.
- Ghosh, V., Saranya, S., Mukherjee, A., and Chandrasekaran, N., 2013. Cinnamon oil nanoemulsion formulation by ultrasonic emulsification: Investigation of its bactericidal activity. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13(1), 114–122. <https://doi.org/10.1166/jnn.2013.6701>.
- Gill, A., and Holley, R. a., 2004. Mechanisms of bactericidal action of cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750–5755. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.10.5750>.
- Gill, A., Tamber, S., and Yang, X., 2019. Relative response of populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* to exposure to thermal, alkaline and acidic treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 293(September 2018), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.01.007>.
- Gu, L., Chen, Q., Guo, A., Liu, W., Ruan, Y. A. O., Zhang, X., and Nou, X., 2020. Differential Effects of Growth Medium Salinity on Biofilm Formation of Two *Salmonella enterica* Strains. *Journal of Food Protection*, 83(2), 196–203.
- Hasenhuettl, G. L., and Hartel, R. W., 2008. *Food emulsifiers and their applications* (Vol. 19). Springer.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., and Meyer, R. L., 2012. Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>.
- Iliadis, I., Daskalopoulou, A., Simões, M., and Giaouris, E., 2018. Integrated combined effects of temperature, pH and sodium chloride concentration on biofilm formation by *Salmonella enterica* ser. Enteritidis and Typhimurium under low nutrient food-related conditions. *Food Research International*, 107 (February), 10–18.
- Jalalpour, S. H., Kasra, K. R., Nouhi, A. A., Zarkesh, E. S. H., and Abousaeidi, H., 2009. Comparing the frequency of β -lactamase enzyme existence in isolated nosocomial infection bacteria. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences and Health Services*, 3 (32), 203-214.
- Jayaprakasha, G. K., Mohan Rao, L. J., and Sakariah, K. K., 2003. Volatile constituents from *Cinnamomum zeylanicum* fruit stalks and their antioxidant activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(15), 4344–4348. <https://doi.org/10.1021/jf034169i>.
- Jia, P., Xue, Y. J., Duan, X. J., and Shao, S. H., 2011. Effect of cinnamaldehyde on biofilm formation and *sarA* expression by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 53(4), 409–416.
- Jordán, M. J., Martínez, R. M., Goodner, K. L., Baldwin, E. A., and Sotomayor, J. A., 2006. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. *Industrial Crops and Products*, 24(3), 253–263. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2006.06.011>.
- Karatan, E., and Watnick, P., 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73(2), 310–347.
- Koluman, A., Celik, G., and Unlu, T., 2012. *Salmonella* identification from foods in eight hours: A prototype study with *Salmonella Typhimurium*. *Iranian Journal of Microbiology*, 4(1), 15.

- Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Coote, P. J., and Nychas, G., 2001. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 453–462.
- Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G., and Nijland, R., 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 813–823. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2468-8>
- Letsididi, K. S., Lou, Z., Letsididi, R., Mohammed, K., and Maguy, B. L., 2018. Antimicrobial and antibiofilm effects of trans-cinnamic acid nanoemulsion and its potential application on lettuce. *Lwt*, 94, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.018>
- Lianou, A., and Koutsoumanis, K. P., 2012. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 160(2), 171–178. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.002>
- Ma, Q., Davidson, P. M., and Zhong, Q., 2016. Antimicrobial properties of microemulsions formulated with essential oils, soybean oil, and Tween 80. *International Journal of Food Microbiology*, 226, 20–25.
- Mason, T. G., Wilking, J. N., Meleson, K., Chang, C. B., and Graves, S. M., 2006. Nanoemulsions: Formation, structure, and physical properties. *Journal of Physics Condensed Matter*, 18(41). <https://doi.org/10.1088/0953-8984/18/41/R01>
- McClements, D. J., 2015. *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.
- McClements, D. J., and Rao, J., 2011. Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(4), 285–330. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.559558>
- Miladi, H., Mili, D., Slama, R. Ben, Zouari, S., Ammar, E., and Bakhrouf, A., 2016. Antibiofilm formation and anti-adhesive property of three mediterranean essential oils against a foodborne pathogen *Salmonella* strain. *Microbial Pathogenesis*, 93, 22–31.
- Milanov, D., Prunić, B., and Ljubojević, D., 2017. Istraživanje sposobnosti tvorbe biofilma u sojeva *Salmonella enterica* serovar Tennessee izdvojenih iz hrane za životinje. *Veterinarski Arhiv*, 87(6), 691–702. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.160609>
- Moghadam, A., Nazarian, S., and Amani, J., 2017. Identification and assessment of *Salmonella typhimurium*, *infantis* and *enteritidis* serotypes in clinical samples from medical centers of Kerman province. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 11(2), 1–8.
- Mohamed, A. I. A., Hussein, I. A., Sultan, A. S., and Al-Muntasheri, G. A., 2018. Use of organoclay as a stabilizer for water-in-oil emulsions under high-temperature high-salinity conditions. *Journal of Petroleum Science and Engineering*, 160(November), 302–312. <https://doi.org/10.1016/j.petrol.2017.10.077>
- Moosavy, M. H., Shahbazi, Y., and Shavisi, N., 2015. The combined effect of *Mentha spicata* essential oil and nisin against *listeria monocytogenes*. *Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 178–183. <https://doi.org/10.15171/PS.2015.34>
- Moraes, J. O., Cruz, E. A., Pinheiro, Í., Oliveira, T. C. M., Alvarenga, V., Sant'Ana, A. S., and Magnani, M., 2019. An ordinal logistic regression approach to predict the variability on biofilm formation stages by

five *Salmonella enterica* strains on polypropylene and glass surfaces as affected by pH, temperature and NaCl. *Food Microbiology*, 83, 95–103.

Moraes, J. O., Cruz, E. A., Souza, E. G. F., Oliveira, T. C. M., Alvarenga, V. O., Peña, W. E. L., Sant'Ana, A. S., and Magnani, M., 2018. Predicting adhesion and biofilm formation boundaries on stainless steel surfaces by five *Salmonella enterica* strains belonging to different serovars as a function of pH, temperature and NaCl concentration. *International Journal of Food Microbiology*, 281(May), 90–100.

Mortazavi, N., and Aliakbarlu, J., 2019. Antibacterial Effects of Ultrasound, Cinnamon Essential Oil, and Their Combination Against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in Milk. *Journal of Food Science*, 00. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14914>

Nguyen, H. D.N., Yang, Y. S., and Yuk, H. G., 2014. Biofilm formation of *Salmonella Typhimurium* on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. *LWT - Food Science and Technology*, 55(1), 383–388.

Nguyen, Hai Duong Ngoc, and Yuk, H. G., 2013. Changes in resistance of *Salmonella Typhimurium* biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*, 29(1), 236–240. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.06.006>

Oh, S. Y., Yun, W., Lee, J. H., Lee, C. H., Kwak, W. K., and Cho, J. H., 2017. Effects of essential oil (blended and single essential oils) on anti-biofilm formation of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Journal of Animal Science and Technology*, 59(1), 4.

Oishi, K., Yamamoto, S., Oike, H., Ohkura, N., and Taniguchi, M., 2017. Cinnamic acid shortens the period of the circadian clock in mice. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 9, 232–237. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.008>

Oliveira, M. M. M. de, Brugnera, D. F., Cardoso, M. das G., Alves, E., and Piccoli, R. H., 2010. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. *Food Control*, 21(4), 549–553. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.08.003>

Paudel, S. K., Bhargava, K., and Kotturi, H., 2019. Antimicrobial activity of cinnamon oil nanoemulsion against *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. on melons. *LWT*, 111, 682–687.

Paz-Méndez, A. M., Lamas, A., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A., and Franco, C. M., 2017. Effect of food residues in biofilm formation on stainless steel and polystyrene surfaces by *Salmonella enterica* strains isolated from poultry houses. *Foods*, 6(12), 106.

Piovezan, M., Uchida, N. S., da Silva, A. F., Grespan, R., Santos, P. R., Silva, E. L., Cuman, R. K. N., Machinski Junior, M., and Mikcha, J. M. G., 2014. Effect of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde on *Salmonella Saintpaul* biofilm on a stainless steel surface. *Journal of General and Applied Microbiology*, 60(3), 119–121.

Prakash, A., Baskaran, R., Paramasivam, N., and Vadivel, V., 2018. Essential oil based nanoemulsions to improve the microbial quality of minimally processed fruits and vegetables: A review. *Food Research International*, 111, 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.066>

Prakash, A., Vadivel, V., Rubini, D., and Nithyanand, P., 2019. Antibacterial and antibiofilm activities of linalool nanoemulsions against *Salmonella Typhimurium*. *Food Bioscience*, 28(May 2018), 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2019.01.018>

- Quale, J. M., Landman, D., Zaman, M. M., Bumey, S., and Sathe, S. S., 1996. In vitro activity of *Cinnamomum zeylanicum* against azole resistant and sensitive *Candida* species and a pilot study of cinnamon for oral candidiasis. *The American Journal of Chinese Medicine*, 24(02), 103–109.
- Rasooli, I., Rezaei, M. B., and Allameh, A., 2006. Ultrastructural studies on antimicrobial efficacy of thyme essential oils on *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Infectious Diseases*, 10(3), 236–241. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2005.05.006>
- Razavi Rohani, S. M., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S. S., and Griffiths, M. W., 2011. The effect of nisin and garlic (*Allium sativum* L.) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT - Food Science and Technology*, 44(10), 2260–2265. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.07.020>
- Ribaudo, N., Li, X., Davis, B., Wood, T. K., and Huang, Z. J., 2017. A Genome-Scale Modeling Approach to Quantify Biofilm Component Growth of *Salmonella Typhimurium*. *Journal of Food Science*, 82(1), 154–166. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13565>
- Sagar, S. S., Kumar, R., and Kaistha, S. D., 2016. Biofilm-an eternal chronicle of bacteria. *Indian Journal of Comparative Microbiology, Immunology and Infectious Diseases*, 37(2), 45– 56.
- Sallam, K. I., Mohammed, M. A., Hassan, M. A., and Tamura, T., 2014. Prevalence, molecular identification and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* serovars isolated from retail beef products in Mansoura, Egypt. *Food Control*, 38, 209–214.
- Schwarz, S., and Chaslus-Dancla, E., 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, 32(3–4), 201–225.
- Shahabi, N., Tajik, H., Moradi, M., Forough, M., and Ezati, P., 2017. Physical, antimicrobial and antibiofilm properties of *Zataria multiflora* Boiss essential oil nanoemulsion. *International Journal of Food Science and Technology*, 52(7), 1645–1652.
- Shahada, F., Chuma, T., Tobata, T., Okamoto, K., Sueyoshi, M., and Takase, K., 2006. Molecular epidemiology of antimicrobial resistance among *Salmonella enterica* serovar *Infantis* from poultry in Kagoshima, Japan. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(4), 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.07.003>
- Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., and Corke, H., 2007. Antibacterial properties and major bioactive components of cinnamon stick (*Cinnamomum burmannii*): Activity against foodborne pathogenic bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5484–5490. <https://doi.org/10.1021/jf070424d>
- Simões, M., Simões, L. C., and Vieira, M. J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 43(4), 573–583.
- Sivakumar, M., Tang, S. Y., and Tan, K. W., 2014. Cavitation technology - A greener processing technique for the generation of pharmaceutical nanoemulsions. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(6), 2069–2083. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.03.025>
- Sofos, J. N., 1993. Current microbiological considerations in food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 19(2), 87–108.
- Spanu, V., Scarano, C., Cossu, F., Pala, C., Spanu, C., and De Santis, E. P. L., 2014. Antibiotic

Spanu, V., Scarano, C., Cossu, F., Pala, C., Spanu, C., and De Santis, E. P. L., 2014. Antibiotic resistance traits and molecular subtyping of staphylococcus aureus isolated from raw sheep milk cheese. *Journal of Food Science*, 79(10), M2066–M2071. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12590>

Srey, S., Jahid, I. K., and Ha, S. Do., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31(2), 572–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.12.001>

Stankovi, D., Nebojša, Đ., Tasi, G., Dini, M., and Bogdanovi, M., 2006. Role of bacteria in intestinal obstruction mechanisms of bacterial proliferation regulation in the gastrointestinal tract pathophysiological processes in simple mechanical obstruction. *Medicine and Biology*, 13(3), 127–132.

Tadros, T., Izquierdo, P., Esquena, J., and Solans, C., 2004. Formation and stability of nanoemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science*, 108, 303–318. Tajkarimi, M. M., Ibrahim, S. A., & Cliver, D. O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, 21(9), 1199–1218.

Tango, C. N., Akkermans, S., Hussain, M. S., Khan, I., Van Impe, J., Jin, Y. G., and Oh, D. H., 2018. Modeling the effect of pH, water activity, and ethanol concentration on biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology*, 76(November 2017), 287–295. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.006>

Teixeira, P. C., Leite, G. M., Domingues, R. J., Silva, J., Gibbs, P. A., and Ferreira, J. P., 2007. Antimicrobial effects of a microemulsion and a nanoemulsion on enteric and other pathogens and biofilms. *International Journal of Food Microbiology*, 118(1), 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.05.008>

Tomicic, R., Cabarkapa, I., Vukmirovic, D., Levic, J., and Tomicic, Z., 2016. Influence of growth conditions on biofilm formation of *Listeria monocytogenes*. *Food and Feed Research*, 43(1), 19–24. <https://doi.org/10.5937/ffr1601019t>

Tondo, E. C., Machado, T. R. M., Malheiros, P. da S., Padrão, D. K., de Carvalho, A. L., and Brandelli, A., 2010. Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41(4), 1027–1037. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000400022>

Tsai, H.-C., Sheng, L., and Zhu, M.-J., 2017. Antimicrobial efficacy of cinnamon oil against *Salmonella* in almond based matrices. *Food Control*, 80, 170–175.

Ultee, A., Gorris, L. G. M., and Smid, E. J., 1998. Bactericidal activity of carvacrol towards the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85(2), 211–218. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00467.x>

Upadhyay, A., Upadhyaya, I., and Kollanoor-johny, A., 2013. Antibiofilm effect of plant derived antimicrobials on *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology* 36(1): 79-89.

Valeriano, C., de Oliveira, T. L. C., de Carvalho, S. M., Cardoso, M. das G., Alves, E., and Piccoli, R. H., 2012. The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*, 25(2), 673–677. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.015>

Van Houdt, R., and Michiels, C. W., 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology*, 109(4), 1117–1131. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x>

Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L., and Rodríguez-Herrera, J. J., 2014. Single and Sequential Application of Electrolyzed Water with Benzalkonium Chloride or Peracetic Acid for Removal of *Staphylococcus Aureus* Biofilms. *Journal of Food Safety*, 34(3), 199–210.

Vidács, A., Kerekes, E., Rajkó, R., Petkovits, T., Alharbi, N. S., Khaled, J. M., Vágvölgyi, C., and Krisch, J., 2018. Optimization of essential oil-based natural disinfectants against *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* biofilms formed on polypropylene surfaces. In *Journal of Molecular Liquids* (Vol. 255). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.01.179>

Wang, H., Wang, H., Xing, T., Wu, N., Xu, X., and Zhou, G., 2016. Removal of *Salmonella* biofilm formed under meat processing environment by surfactant in combination with bioenzyme. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.049>

Whitehurst, R. J., 2004. *Emulsifiers in food technology*. Wiley Online Library.

Xu, H., Zou, Y., Lee, H. Y., and Ahn, J., 2010. Effect of NaCl on the Biofilm Formation by Foodborne Pathogens. *Journal of Food Science*, 75(9), 580–585. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01865.x>

Xue, J., Davidson, P. M., and Zhong, Q., 2015. Antimicrobial activity of thyme oil conanoemulsified with sodium caseinate and lecithin. *International Journal of Food Microbiology*, 210, 1–8.

Ye, H., Shen, S., Xu, J., Lin, S., Yuan, Y., and Jones, G. S., 2013. Synergistic interactions of cinnamaldehyde in combination with carvacrol against food-borne bacteria. *Food Control*, 34(2), 619–623.

Yin, L. J., Chu, B. S., Kobayashi, I., and Nakajima, M., 2009. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, 23(6), 1617–1622. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.005>

Yoshikawa, T. T., Herbert, P., and Oill, P. A., 1980. Salmonellosis. *Western Journal of Medicine*, 133(5), 408.

Zhang, S., Zhang, M., Fang, Z., and Liu, Y., 2017. Preparation and characterization of blended cloves/cinnamon essential oil nanoemulsions. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 316–322. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.046>

Zhang, Y., Liu, X., Wang, Y., Jiang, P., and Quek, S., 2016. Antibacterial activity and mechanism of cinnamon essential oil against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, 59, 282–289.

Zhu, A., Zhi, W., Qiu, Y., Wei, L., Tian, J., Pan, Z., Kang, X., Gu, W., and Duan, L., 2019. Surveillance study of the prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in pork from open markets in Xuzhou, China. *Food Control*, 98, 474–480.