Food Hygiene, Vol. 12, No. 45, Spring 2022

"Research article" **DOI: 10.30495/JFH.2022.1959723.1357**

Isolation and identification of some phenotypic features of *Pseudomonas* in poultry slaughter line

Jafarzadeh, H.[1], Mirzaei, H.[2*], Hanifian, S.[3], Javadi, A.[4], Shayegh, J.[5]

1. Ph.D. Graduate in Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
3. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
4. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Tabriz Medical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
5. Assistant Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary and Agriculture, Shabestar Branch, Islamic Azad University, Shabestar, Iran

[*]Corresponding author: hmirzaei@iaut.ac.ir
(Received: 2022/5/27 Accepted: 2022/8/17)

Abstract

Pseudomonas are among psychrophilic bacteria and have been reported in various studies as the predominant spoilage bacterial in slaughter carcass. The aim of this study was to track *Pseudomonas* spp. from different stages of the slaughter line, slaughterhouse environment and equipment and drop in the packaging. Characteristics such as pigment production, movement pattern and biofilm formation capability of the isolates were also determined. For this purpose, 108 samples were sampled from three industrial poultry slaughterhouses in Tabriz. According to the results, the highest contamination was detected in the samples of the floors, abdominal cavity of carcass and drip samples, respectively. The lowest contamination was observed in the samples related to drinking water, live chicken breast swab and scalder, respectively. The average movement of the Swimming type was significantly ($p \leq 0.001$) higher than the two types of Swarming and Twitching movements. And in terms of pigment production, the dominant color was green. Moreover, most of the isolates were able to form biofilms and about 30% of the isolates had moderate and strong ability to produce biofilms. In conclusion, most of the *Pseudomonas* spp. contamination occurs through different parts of the slaughter line and also the equipment and environment of the slaughterhouse. Due to the biofilm production capacity of *Pseudomonas* isolates, the issue of proper and more effective washing and disinfection of the slaughter line and equipment is of particular importance.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Pseudomonas*, Phonotypic features, Poultry slaughterhouse, Motility pattern, Biofilm production

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2022.1959723.1357

جداسازی و شناسایی برخی ویژگی‌های فنوتیپی *سودوموناس*‌ها در خط کشتار مرغ

حسن جعفرزاده[۱]، حمید میرزایی[۲*]، شهرام حنیفیان[۳]، افشین جوادی[٤]، جلال شایق[٥]

۱. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۲. دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۳. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
٤. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
۵. استادیار دانشکده دامپزشکی، واحد شبستر، دانشگاه آزاد اسلامی، شبستر، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: hmirzaei@iaut.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱٤۰۱/۳/٦ پذیرش نهایی: ۱٤۰۱/۵/۲٦)

چکیده

سودوموناس‌ها جزو باکتری‌های سرمادوست هستند و در مطالعات مختلف به‌عنوان باکتری غالب در فساد لاشه مرغ کشتارگاهی گزارش شده‌اند. هدف از مطالعه حاضر ردیابی گونه‌های *سودوموناس* از مراحل مختلف خط کشتار مرغ، محیط و تجهیزات کشتارگاه و خونابه موجود در بسته‌بندی بود. هم‌چنین ویژگی‌هایی نظیر تولید رنگ‌دانه، الگوی حرکت و قدرت تشکیل بیوفیلم جدایه‌ها تعیین گردید. برای این منظور تعداد ۱۰۸ نمونه از سه کشتارگاه صنعتی مرغ در تبریز نمونه‌گیری شد. طبق نتایج به‌دست آمده، بیشترین میزان آلودگی به *سودوموناس* به‌ترتیب در نمونه‌های مربوط به کف سالن، محوطه شکمی لاشه و خونابه مرغ بسته‌بندی به‌دست آمد. کمترین آلودگی به‌ترتیب در نمونه‌های مربوط به آب مصرفی، سواب سینه مرغ زنده و اسکالدر مشاهده شد. میانگین حرکت نوع Swimming به‌طور معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۰۱$) بیشتر از دو نوع حرکت Swarming و Twitching بود و از نظر تولید رنگ‌دانه، رنگ غالب، سبز بود. هم‌چنین اکثر جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و حدود ۳۰ درصد جدایه‌های قابلیت متوسط و قوی در تولید بیوفیلم داشتند. در مجموع می‌توان گفت که قسمت عمده آلودگی به این باکتری از طریق قسمت‌های مختلف خط کشتار، تجهیزات و محیط کشتارگاه اتفاق می‌افتد. به‌علاوه، با توجه به قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌های *سودوموناس*، لذا بحث شستشو و ضدعفونی مناسب و مؤثرتر قسمت‌های مختلف فوق‌الذکر اهمیت ویژه‌ای دارد.

واژه‌های کلیدی: *سودوموناس*، ویژگی‌های فنوتیپی، کشتارگاه مرغ، الگوی حرکت، تولید بیوفیلم

مقدمه

سودوموناس‌ها از مهم‌ترین باکتری‌های سرمادوست عامل فساد در مواد غذایی است. این باکتری به‌واسطه ترشح انواع آنزیم‌های پروتئولتیک و لیپولیتیک باعث بروز فساد در مواد غذایی می‌شود (Stanborough *et al.*, 2018). *سودوموناس* از طرق مختلف به مواد غذایی انتقال یافته و پس از نامناسب شدن شرایط برای سایر جنس‌های باکتریایی، غالب شده و به‌واسطه تولید متابولیت‌های مختلف به‌سرعت موجب شروع فساد می‌شود (Al- Dughaym., 2000). در مطالعات مختلف حضور *سودوموناس* در فرآورده‌های نگهداری شده در یخچال گزارش شده است. به جهت نیاز تغذیه‌ای ساده و تنوع متابولیکی آن‌ها و به‌تبع آن قابلیت بالای ایجاد فساد در مواد غذایی مختلف، در سال‌های اخیر توجه ویژه‌ای به آن شده است (Rossi *et al*., 2018). اگر چه پاستوریزاسیون *سودوموناس*‌ها را غیرفعال می‌کند، اما این باکتری معمولاً از طریق آلودگی‌های بعد از فرآوری و متقاطع وارد مواد غذایی می‌شود (Vithanage *et al.*, Stanborough *et al.*, 2018; 2016). از طرفی برخی از *سودوموناس*‌ها می‌توانند در بدن اشخاص کلونیزه شده و به‌صورت فرصت‌طلب عمل نمایند و در افراد با ضعف سیستم ایمنی، ایجاد عفونت نمایند (Muner Günseren *et al.*, 1999; Otton *et al.*, 2017). در تحقیقات متعدد *سودوموناس*‌ها به‌عنوان باکتری غالب در لاشه طیور کشتارگاهی گزارش شده‌اند (Handley *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2020).

سودوموناس‌ها به‌واسطه داشتن تاژک قادر به حرکت بوده و باور بر این است که قدرت حرکت این باکتری‌ها با بیماری‌زایی آن‌ها در ارتباط باشد (Burrows, 2012; O'Toole and Kotter, 1998). برخی *سودوموناس*‌ها رنگ‌دانه‌هایی نظیر پیوسیانین، فلورسئین و پیوروبین تولید می‌کنند. این خصوصیات ممکن است به پایداری *سودوموناس*‌ها در محیط‌های فرآوری مواد غذایی کمک کند و در نتیجه موجب آلودگی محصولات غذایی شود (Rossi *et al*., 2018). در مطالعات مختلف نقش تولید رنگ‌دانه در افزایش قدرت تولید بیوفیلم (Rossi ., 2018 *et al*)، افزایش بیماری‌زایی و مقاومت باکتری در شرایط استرس اکسیداتیو (Revercho, *et al*. 2002) و تقویت میزان حرکت و قدرت اتصال باکتری به سطوح (Cude *et al.*, 2012) نشان داده شده است. *سودوموناس*‌های تولید کننده رنگ‌دانه در دماهای پائین سریع‌تر رشد کرده و اگزوپلی‌ساکاریدها را تولید می‌کنند که در تشکیل بیوفیلم‌ها مشارکت می‌کنند (Donlan and Costerton, 2001; Costerton, 2002).

بیوفیلم از مشکلات اصلی در صنعت غذا شمرده می‌شوند به‌طوری‌که در سال ۱۹۹۶ در کشور فرانسه ۴۰/۵ درصد عفونت‌های ناشی از غذا به‌علت آلودگی خطوط تولید توسط بیوفیلم‌ها برآورده شده است (Bryers, 2000). بیوفیلم‌ها در محیط مواد غذایی به‌عنوان مخزن *سودوموناس*‌های تولید کننده رنگ‌دانه عمل نموده و آن‌ها را در مقابل فشارهای محیطی مانند سرما، شرایط اسیدی، حضور نمک و ضدعفونی کننده‌ها، مقاوم می‌سازد (Rossi *et al.*, 2016). علاوه بر تهدید سلامت غذا، می‌توانند با افزایش مقاومت اصطکاکی در سطح و افزایش خوردگی در سطوح، سبب کاهش انتقال حرارت در صفحات مبدل حرارتی و لوله‌ها شوند و در فیلترهای غشایی اسمز معکوس و اولترافیلتراسیون اختلال ایجاد کنند (Anand *et al.*, 2014). لذا

*سودوموناس*ها به‌تنهایی یا با تشکیل بیوفیلم‌ها روی انواع سطوح، از جمله سطوح تجهیزات کشتارگاهی می‌تواند در طول خط کشتار، توزیع و فروش مرغ موجب افزایش آلودگی میکروبی و در نتیجه منجر به تغییرات نامطلوب در ویژگی‌های حسی و شیمیایی مرغ گردد. در تأیید این موضوع، در آمریکا حدود ۲۱ درصد از گوشت مرغ در مرحله فروش و مصرف فاسد گزارش شده‌اند (Buzby, 2014).

بر اساس جستجوی انجام شده، از ویژگی‌های فنوتیپی سودموناس‌های موجود در خط کشتار مرغ، محیط و تجهیزات کشتارگاه گزارش نشده است. لذا مطالعه حاضر با هدف جداسازی *سودوموناس*ها از مراحل مختلف خط کشتار مرغ، محیط و تجهیزات کشتارگاه و خونابه موجود در بسته‌بندی و مطالعه ویژگی‌های تولید رنگ‌دانه، نوع و قدرت حرکت و میزان قدرت تشکیل بیوفیلم توسط آن‌ها انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌گیری

تعداد ۱۰۸ نمونه مختلف در سه مرحله به فاصله زمانی دو هفته، از سه کشتارگاه صنعتی مرغ در تبریز نمونه‌گیری شد. نمونه‌های کشتارگاهی شامل: (۱) پوست ناحیه سینه مرغ زنده، (۲) آب اسکالدر، (۳) آب مورد استفاده در شستشوی لاشه، (٤) آب چیلر ۱، (۵) آب چیلر ۳، (٦) محوطه شکمی لاشه مرغ، (۷) نمونه‌های محیطی کشتارگاه شامل کف سالن و سطوح تجهیزات و (۸) خونابه مرغ بسته‌بندی بود. نمونه‌برداری از سطوح با استفاده از سواب آغشته به سرم رینگر استریل و از مساحت ۵ × ۵ سانتی‌متر انجام و سواب مربوطه به داخل لوله آزمایش حاوی ۲ میلی‌لیتر Stuart transport medium (Merck, Germany) استریل قرار داده شد و نمونه‌گیری در مورد نمونه‌های مایع (آب و خونابه) با استفاده از سرنگ استریل و به مقدار ۲-۱ میلی‌لیتر انجام شد. نمونه‌ها در جوار یخ خشک و در اسرع وقت به آزمایشگاه انتقال داده شد.

- جداسازی *سودوموناس*ها

مقدار ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به‌صورت خطی در محیط Citrimide agar (Quelab, Canada) کشت و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ تا ۳ روز گرمخانه‌گذاری شد. از هر پلیت بر اساس مرفولوژی کلنی‌ها، تا ۵ کلونی انتخاب و در Tryptic Soy Agar (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۲٤ ساعت خالص‌سازی گردید. روی جدایه‌ها، آزمون‌های غربال‌گری نظیر رنگ‌آمیزی گرم، آزمون‌های کاتالاز، اکسیداز، OF، TSI و رشد در محیط کشت مک‌کانکی آگار (Merck, Germany) انجام گرفت. جدایه‌های گرم منفی، باسیلی شکل، کاتالاز مثبت، اکسیداز مثبت، اکسیداتیو، لاکتوز منفی و گلوکز منفی و قادر به رشد در محیط کشت مک‌کانکی آگار *سودوموناس* فرض شد (Caldera *et al.*, 2016).

- قابلیت و الگوی حرکتی جدایه‌ها

برای ارزیابی توانایی حرکت (Swimming) جدایه‌ها در محیط نیمه‌جامد، از کشت تازه آن‌ها در پلیت‌های حاوی محیط Tryptone (Merck, Germany) (حاوی ۱ درصد تریپتون، ۰/۵٪ نمک و ۰/۳٪ آگار) به‌صورت نقطه‌ای کشت شد. پس از گرمخانه‌گذاری در ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱٦ ساعت، قطر هاله رشد اندازه‌گیری گردید (Déziel *et al.*, 2001). برای بررسی لغزش

(Swarming) جدایه‌ها در سطح محیط جامد، از محیط کشت نوترینت‌براث (۰/۸٪) (Merck, Germany) حاوی گلوکز (۰/۵٪) و آگار (۰/۵٪) استفاده شد. محیط‌های کشت آماده، ۱۲ساعته (Overnight) در دمای آزمایشگاه خشک و سپس به‌صورت نقطه‌ای کشت شدند. پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در ۳۰ درجه سلسیوس، قطر هاله ایجاد شده در نتیجه لغزش باکتری اندازه‌گیری شد (Rashid and Kornberg, 2000). قابلیت خیزش (Twitching) یا حرکت در زیر محیط کشت با استفاده از پلیت‌های حاوی محیط LB agar (Lauria-Bertani) (Merck, Germany) (با ۱ درصد آگار و ضخامت تقریبی ۳ میلی‌متر) بررسی شد. کشت به‌صورت عمقی (Stab) و تا رسیدن به کف محیط، انجام شد. کشت‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس و ۲٤ تا ٤۸ ساعت گرمخانه‌گذاری و قطر هاله رشد ما بین محیط کشت و کف پلیت اندازه‌گیری شد (Darzins, 1993).

- قابلیت تولید رنگ‌دانه

برای ارزیابی قابلیت تولید رنگ‌دانه، مقدار ۲۰ میکرولیتر از کشت تازه هر جدایه *سودوموناس* به‌صورت نقطه‌ای در محیط مولر هینتون آگار (Merck, Germany) کشت شد. انکوباسیون به‌مدت ۲٤ تا ٤۸ ساعت در در دمای محیط انجام گرفت.

- قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌ها

برای بررسی تولید بیوفیلم جدایه‌ها از تکنیک ارزیابی کمی در میکروپلیت (Microplate quantitative assay) استفاده شد. برای این منظور ابتدا در محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۰/۵٪ عصاره مخمر (Merck, Germany) به‌مدت ۲٤ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس تجدید کشت گردید. مقدار ۱۹۰ میکرولیتر از محیط تریپتیک سوی براث حاوی ۲ درصد گلوکز به هر گوده میکروپلیت انتقال داده شد و ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه جدایه‌ها در هر گوده تلقیح گردید. برای نمونه‌های شاهد منفی از ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت (تریپتیک سوی براث + عصاره مخمر) استریل استفاده شد. این آزمایش روی تمامی جدایه‌ها و نمونه شاهد منفی، سه مرتبه تکرار شد. میکروپلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ٤۸ ساعت گرم‌خانه‌گذاری گردید. سپس محتویات آن‌ها تخلیه و ۳ مرتبه با ۲۵۰ میکرولیتر آب یون‌زدایی شده شستشو داده شد. برای تثبیت بیوفیلم در داخل گوده‌ها، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول ۹۹ درصد به هر گوده اضافه شد و پس از ۱۵دقیقه، تخلیه و در دمای آزمایشگاه خشک گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ۲ درصد به هر گوده اضافه و بعد از ۵ دقیقه آب‌کشی و در شرایط محیطی خشک شد. کریستال‌ویوله باقیمانده با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر اسیداستیک ۳۳ درصد به هر گوده حل شد و شدت رنگ ایجاد شده با دستگاه الایزا (TECAN, Switzerland) در طول موج ٤۹۲ نانومتر اندازه‌گیری شد و میزان تولید بیوفیلم با استفاده از الگوی جدول (۱) تفسیر گردید (Djordjevic *et al.*, 2002).

جدول ۱)- میزان جذب نوری در الایزا و نحوه محاسبه میزان تولید بیوفیلم در جدایه‌های *سودوموناس*

جذب نوری*	تولید بیوفیلم
$OD_X \leq OD_T$	عدم تولید
$OD_T < OD_X \leq 2OD_T$	کم
$2OD_T < OD_X \leq 4OD_T$	متوسط
$OD_X > 4OD_T$	زیاد

*OD_T و OD_X به ترتیب جذب نوری شاهد و جذب نوری نمونه‌های مجهول می‌باشد.

- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

برای ارزیابی ویژگی‌های فنوتیپی جدایه‌ها هر کدام از آزمون‌ها ۳ بار تکرار شد. برای مقایسه بین میانگین‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه دوبه‌دوی میانگین‌ها از آزمون تعقیبی توکی استفاده شد (SPSS, Version 23). همبستگی بین متغیرهای کمی با استفاده از آزمون آماری پیرسون و رابطه بین متغیرهای کمی و رتبه‌ای با استفاده از آزمون آماری اسپیرمن مورد ارزیابی قرار گفت. تمام آزمون‌های آماری در سطح α=۰۵/۰ انجام شد.

یافته‌ها

در روش کشت از ۱۰۸ نمونه جمع‌آوری شده تعداد ۱۳۹ سویه *سودوموناس* جدا گردید. از جدایه‌های حاصله تعداد ۸۷ جدایه بر اساس تنوع شکل و اندازه کلونی‌ها برای بررسی تولید رنگ‌دانه، الگوی حرکت و قدرت تولید بیوفیلم انتخاب شدند (جدول ۲).

جدول ۲)- فراوانی و محل *سودوموناس*‌های جدا شده

محل نمونه برداری	تعداد نمونه	تعداد (درصد) نمونه مثبت	تعداد (درصد) نمونه با بیش از یک جدایه	تعداد (درصد) جدایه
سواب سینه مرغ زنده	۱۲	٤ (۳/۷۰)	۱ (۰/۰۱)	٥ (۳/٦۰)
آب مورد استفاده برای لاشه	۱۲	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)	۰ (۰/۰۰)
میز	۱۲	۸ (۷/٤۱)	٤ (۳/۷۰)	۱۷ (۱۲/۳۰)
کف سالن	۱۲	۹ (۸/۳۳)	٦ (٥/٥٦)	۳۰ (۲۱/٥۸)
آب اسکالدر	۱۲	٤ (۳/۷۰)	۱ (۱/۰۱)	٦ (٤/۳۲)
محوطه شکم لاشه	۱۲	۹ (۸/۳۳)	٦ (٥/٥٦)	۲٥ (۱۷/۹۹)
آب چیلر ۱	۱۲	۹ (۸/۳۳)	۲ (۱/۸٥)	۱۱ (۷/۹۱)
آب چیلر ۲	۱۲	۹ (۸/۳۳)	۷ (٦/٤۸)	۲٤ (۱۷/۲۷)
خونابه مرغ بسته‌بندی شده	۱۲	۸ (۷/٤۱)	٦ (٥/٥٦)	۲۱ (۱٥/۱۱)
جمع	۱۰۸	٦۰ (٥٥/٥٦)	۳۳ (۳۰/٥٦)	۱۳۹ (۱۰۰)

- الگوی حرکتی جدایه‌ها

میانگین نتایج مربوط به قابلیت الگوی حرکتی جدایه‌ها در جدول (۳) نشان داده شده است. در حرکت نوع Swimming میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ٤/٨٩ ± ١٧/١٥ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۲۵ میلی‌متر در ٤ جدایه مشاهده شد و چهار جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند. در حرکت نوع Swarmin میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ۲/۳ ± ٦/٧٧ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۱۳ میلی‌متر در ۲ جدایه مشاهده شد و ٦ جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند. در حرکت نوع Twiching نیز میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ١/٤٦ ± ٥/٥٧ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۹ میلی‌متر در ٤ جدایه مشاهده شد و یک جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند.

- قابلیت تولید رنگدانه توسط جدایه‌ها

نتایج مربوط به تولید رنگ‌دانه توسط جدایه‌ها در جدول (٤) نشان داده شده است. در تولید رنگ‌دانه، رنگ غالب رنگ سبز بود که توسط ٦٨ جدایه (حدود ۷۸ درصد جدایه‌ها) تولید شد و رنگ‌دانه زرد در ۱۳ مورد (حدود ۱۵ درصد) از جدایه‌ها مشاهده گردید. تعداد ٦ مورد (۷ درصد) از جدایه‌ها نیز هر دو رنگ‌دانه سبز و زرد را به‌طور مشترک ایجاد کردند و تعداد ۱۲ مورد (حدود ١٤ درصد) از جدایه هیچ‌کدام از رنگ‌دانه‌ها را تولید نکردند. بین تولید رنگ‌دانه سبز و زرد و قدرت تشکیل بیوفیلم رابطه‌ای مشاهد نشد.

- ارزیابی توانایی تولید بیوفیلم توسط جدایه‌ها

مطالعه جدایه‌ها بر اساس جذب نوری نشان داد ۲ مورد از جدایه‌ها (حدود ۲/۳ درصد) دارای قدرت تشکیل بیوفیلم قوی، ٢٤ مورد از جدایه‌ها (حدود ۲۸ درصد) دارای قدرت تشکیل بیوفیلم متوسط، ۵۸ مورد از جدایه‌ها (حدود ٦٧ درصد) دارای قدرت تشکیل بیوفیلم ضعیف بودند. در ضمن ۳ جدایه قادر به تشکیل بیوفیلم نبودند (جدول ۵).

جدول ۳)- الگوی حرکتی و قطر هاله رشد (میلی‌متر) جدایه‌های سودوموناس حاصله از نمونه‌های مختلف*

محل نمونه‌گیری	نوع و مقدار حرکت			محل نمونه‌گیری	نوع و مقدار حرکت			محل نمونه‌گیری	نوع و مقدار حرکت		
	Swi	Swa	Twi		Swi	Swa	Twi		Swi	Swa	Twi
سواب	۲۱	۸	۵	کف	۱۱	۱۰	۵	آب چیلر ۲	۲۳	۳	۵
	۱۳	٤	۵		۱۸	۸	۵		۱۳	۸	۳
میز	۰	۰	۰		۲۱	۰	۷		۱۰	۱۰	۸
	۲۱	٦	٦		۲۵	٦	٤		۱۹	۱۰	۷
	۱۳	٦	٤		۱۷	۰	۷		۱٤	۰	٦
	۱٦	۸	٤	آب اسکالدر	۲۳	۰	۸		۰	۰	۰
	۲٤	۱۱	۹		۱٤	۳	٤		۹	٦	٤
	۲٤	٦	۵	محوطه	۱۹	۸	٦		۲۱	۱۰	۹
	۱۰	۵	۹		۱۷	۵	٤		۲٤	۸	٤
	۱٦	٦	۷		۱۹	٤	۵		۱۳	٦	۵
	۱۹	۵	۵		۱۱	۳	۵		۱٦	۵	۵
کف	۲۱	۵	۵		۱۵	٦	٤		۲۰	۸	۵
	۱۸	٦	۷		۱٤	۵	۵		۱۳	۵	۵
	۲۱	٦	۵		۱۲	۹	۵		۱۹	۵	٤
	۲۵	٦	٤		۲٤	٦	۵	خونابه	۲۲	۷	۵
	۱٦	۰	۹		۲۳	٤	۵		۳	۵	٦
	۲۱	۸	۵		۲۳	۸	۳		۲٤	۱۳	۵
	۱۳	۹	۵		۲۲	۳	٦		۱۳	۱۰	٦
	۱۰	۸	٤		۱۷	۸	٦		۰	۱۱	۹
	۲۵	۸	۵		۱۷	۵	۷		۱۹	۵	٤
	۱۵	۱۰	۸		۱٤	٦	۷		۱۳	٦	۸
	۱۹	۱۰	۷		۱۸	۷	٤		٦	٦	۵
	۱۳	۵	۸		۲۰	۸	۵		۱۵	۱۳	۵
	۱٦	۵	۵	آب چیلر۱	۱٤	۸	٦		۱۷	۵	۵
	۱۵	۵	۵		۲۰	٦	۸		۱۱	٦	٦
	۱۹	۷	٤		۱۷	۱۲	۷		۱٤	۹	۵
	٦	۰	٦		۲۱	۵	٦		۲۱	۹	٤
	۱۵	۵	٦		۲۳	٤	٦		۲۵	۵	٤
	۱۹	٦	۵		۱۱	٤	۵		۱۹	٦	۵

* میانگین سه تکرار (برای اجتناب از شلوغی جدول از آوردن اعداد اعشاری و انحراف معیار اجتناب شده است)؛ کف: کف سالن، محوطه: محوطه شکم لاشه، سواب: سواب سینه، Swi:Swimming; Swa:Swarmming; Twi:Twiching

جدول ٤)- نتایج تولید رنگدانه توسط هرکدام از جدایه‌های حاصله از قسمت‌های مختلف نمونه‌برداری شده در کشتارگاه‌ها

محل نمونه‌گیری	رنگدانه			محل نمونه‌گیری	رنگدانه			محل نمونه‌گیری	رنگدانه		
	سبز	زرد	سفید		سبز	زرد	سفید		سبز	زرد	سفید
سواب	+	-	-	کف	+	-	-	آب چیلر ۲	+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
میز	+	+	-		–	-	-		+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	+	–
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	-	-	آب اسکالدر	+	-	-		+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	-	-	محوطه	+	-	-		+	-	-
	+	+	-		+	-	-		+	-	-
	-	+	-		–	-	-		–	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
کف	+	-	-		–	-	-		+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	+	-		+	-	-		+	+	-
	+	-	-		+	-	-	خونابه	+	-	-
	-	-	-		–	+	-		+	-	-
	+	+	-		+	-	-		+	-	-
	-	-	-		+	-	-		+	-	-
	-	-	-		+	-	-		+	-	-
	-	+	-		+	-	-		–	+	-
	+	-	-		+	-	-		+	–	-
	+	-	-		+	-	-		+	+	-
	-	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	-	-	آب چیلر۱	–	-	-		+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	-	-		+	-	-		+	-	-
	+	-	-		-	-	-		–	+	-
	+	-	-		-	-	-		+	-	-
	+	+	-		+	-	-		–	-	-

+: تولید رنگدانه، -: عدم تولید رنگدانه، کف: کف سالن، محوطه: محوطه شکم لاشه، سواب: سواب سینه

جدول ۵)- نتایج قدرت تولید بیوفیلم توسط هرکدام از جدایه‌های حاصله از قسمت‌های مختلف نمونه‌برداری شده در کشتارگاه‌ها

محل	قدرت تولید بیوفیلم				محل	قدرت تولید بیوفیلم				محل	قدرت تولید بیوفیلم			
نمونه‌گیری	منفی	ضعیف	متوسط	قوی	نمونه‌گیری	منفی	ضعیف	متوسط	قوی	نمونه‌گیری	منفی	ضعیف	متوسط	قوی
سواب			+		کف		+			آب چیلر ۲		+		
				+			+					+		
میز		+					+							+
		+						+				+		
		+					+					+		
		+			آب اسکالدر				+			+		
		+					+					+		
		+			محوطه		+					+		
		+						+						+
		+						+						+
			+					+						+
کف			+				+				+			
	+						+							+
			+				+					+		
		+						+		خونابه		+		
		+					+							+
		+					+							+
		+					+							+
		+					+							+
		+					+							+
		+						+						+
		+					+							+
		+					+							+
			+		آب چیلر۱		+							+
		+					+							+
		+					+							+
		+						+						+
		+					+							+
		+					+							+

کف: کف سالن، محوطه: محوطه شکم لاشه، سواب: سواب سینه

بحث و نتیجه گیری

بیشترین آلودگی به‌ترتیب در نمونه‌های مربوط به کف سالن، محوطه شکم لاشه و خونابه مرغ بسته‌بندی و کمترین آلودگی به‌ترتیب در نمونه‌های آب مصرفی، سواب سینه مرغ زنده و اسکالدر مشاهده شد. آب مصرفی در هر سه کشتارگاه فاقد آلودگی تشخیص داده شد و خونابه مرغ‌های بسته‌بندی در نمونه‌های هر سه کشتارگاه آلوده به *سودوموناس* بودند (جدول ۲). با توجه به این که سواب سینه‌مرغ زنده کمترین آلودگی را داشته و آب مورد استفاده عاری از سودموناس بود می‌توان نتیجه گرفت که قسمت عمده آلودگی به این باکتری از طریق قسمت‌های مختلف خط کشتار و تجهیزات و محیط کشتارگاه اتفاق می‌افتد. حضور و بقای سویه‌های *سودوموناس* در محیط، به‌دلایل زیادی

از جمله روش‌های بهداشتی نامناسب، ایجاد مقاومت در برابر بیوسیدها یا توانایی تشکیل بیوفیلم گزارش شده است (Martin *et al.*, 2011; Carrascosa *et al.*, 2015; Nucera *et al.*, 2016; Del Olmo *et al.*, 2018; Carminati *et al* 2019). در تحقیقی در مصر روی *سودوموناس*‌های لاشه‌های مرغ و ماهی عرضه شده در بازار، گزارش شد که ۸۰ درصد لاشه‌های مرغ و ۱۰۰ درصد ماهی‌ها به سویه‌های *سودوموناس* آلوده بودند و میانگین تعداد سودموناس‌ها در گوشت مرغ $۲/٦ \times ۱۰^{٤}$ cfu/g بود (Abd El Azız, 2015). در مطالعه مشابهی میانگین تعداد باکتری‌های سرمادوست در گوشت مرغ و ماهی به‌ترتیب $۱/۵ \times ۱۰^{٤}$ cfu/g و $۵/۳ \times ۱۰^{٤}$ cfu/g گزارش شده است (Keskin and Ekmekci, 2008). مطالعات مختلف نشان داده که رابطه مستقیم بین تعداد اولیه *سودوموناس*‌ها و طول عمر ماندگاری فرآورده‌های گوشتی در شرایط نگهداری وجود دارد و فساد زمانی اتفاق می‌افتد که تعداد *سودوموناس*‌ها به حدود $۱۰^{۸}$ cfu/g تا $۱۰^{۷}$ برسد. برای دست‌یابی به حداکثر زمان ماندگاری و ویژگی‌های حسی بهینه در فرآورده‌های گوشتی تعداد اولیه *سودوموناس*‌ها باید کم‌تر از ۱۰۰ cfu/g در شرایط یخچالی باشد (Bremner, 2002; Mead, 2005). نشان داده شده است که *سودوموناس*‌ها در یخچال و در شرایط هوازی مقدار زیادی آنزیم‌های پروتئولیتیک تولید می‌کنند که حضور این آنزیم‌ها می‌توانند به‌عنوان شاخصی برای پیش‌بینی ماندگاری گوشت مورد استفاده قرار گیرند (Jay *et al.*, 2005).

در حرکت نوع Swimming میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ۱۷/۱۵ ± ٤/۸۹ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۲۵ میلی‌متر در ٤ جدایه مشاهده شد و چهار جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند. در حرکت نوع Swarmming میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ۲/۳ ± ٦/۷۷ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۱۳ میلی‌متر در ۲ جدایه مشاهده شد و ٦ جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند. در حرکت نوع Twitching نیز میانگین قطر هاله رشد مربوط به مجموع جدایه‌ها برابر ۵/۵۷ ± ۱/٤٦ میلی‌متر بود. بیشترین مقدار این نوع حرکت برابر ۹ میلی‌متر در ٤ جدایه مشاهده شد و یک جدایه نیز فاقد این نوع حرکت بودند (جدول ۳). میانگین حرکت نوع Swimming به‌طور معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۰۱$) بیشتر از دو نوع حرکت دیگر و میانگین حرکت نوع Swimming به‌طور معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۰۱$) بیشتر از نوع حرکت Twitching بود. در مطالعه مشابه روی ۷٤ جدایه حاصله از تجهیزات موجود در کارخانه صنایع شیر و فرآورده‌های شیری گزارش شد که دامنه حرکت نوع Swimming جدایه‌ها ۵ تا ۳۰ میلی‌متر و دامنه حرکت نوع Swarming و Twitching آن‌ها کمتر از ۱۰ میلی‌متر بود. طبق نتایج این مطالعه همه جدایه‌ها در دمای ۳۰ درجه سلسیوس دارای هر سه نوع حرکت بودند و میزان حرکت وابسته به سویه جدایه و دمای گرمخانه‌گذاری بود و میزان حرکت به‌ویژه حرکت نوع Swimming در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشتر از ۱۰ درجه سلسیوس گزارش شد (Rossi *et al.*,2018) و این امر شاید به این دلیل باشد که تولید فلاژل در باکتری‌ها یک امر وابسته به دما است (Horshey, 2003). در مطالعه دیگری ٤۵ درصد از سویه‌های *سودوموناس* آئروژینوزا حرکت Twitching را در دامنه ۱۰ تا ۳۱ میلی‌متر نشان دادند؛ در حالی‌که هیچ‌کدام از

سایر گونه‌های *سودوموناس* مورد مطالعه قادر به ایجاد این نوع حرکت نبودند. چون تنها عامل این نوع حرکت پیلی IV است، لذا عدم وجود این نوع حرکت به‌دلیل نبود این نوع پیلی و یا غیرفعال بودن آن توجیه شد. در این خصوص دلایل مختلف شامل نبود ژن مربوط به پیلی، عدم بیان ژن و یا ایجاد جهش در ژن می‌تواند مطرح شود (Muner Otten *et al.*, 2017). در مطالعه اخیر ٥٦ درصد از سویه‌های *سودوموناس* آئروژینوزا حرکت Swarming را در دامنه ۲۵ تا ۸۰ میلی‌متر و ۲۵ درصد از سویه‌های غیر آئروژینوزا این حرکت را در دامنه ۱۷ تا ٤٥ میلی‌متر انجام دادند و هر دو گروه از نظر این نوع حرکت که با مشارکت فلاژل و پیلی IV انجام می‌شود مشابه عمل نمودند (Muner Otten *et al.*, 2017).

در تولید رنگ‌دانه، رنگ غالب رنگ سبز بود که توسط ٦٨ جدایه (حدود ۷۸ درصد جدایه‌ها) تولید شد و رنگ‌دانه زرد در ۱۳ مورد (حدود ۱۵ درصد) از جدایه‌ها مشاهده گردید. تعداد ٦ مورد (۷ درصد) از جدایه‌ها نیز هر دو رنگ‌دانه سبز و زرد را ایجاد کردند و تعداد ۱۲ مورد (حدود ١٤ درصد) از جدایه هیچکدام از رنگ‌دانه‌ها را تولید نکردند (جدول ٤). در تحقیقی نشان داده شد که میزان تولید رنگ‌دانه در جدایه‌های *سودوموناس* وابسته به سویه و گونه باکتری، دمای گرمخانه‌گذاری و نیز تا حدودی محیط کشت مورد استفاده می‌باشد. طبق نتایج این تحقیق حدود ۳۰ درصد از جدایه‌های *سودوموناس فلوروسنس* در دمای ۱۰ درجه سلسیوس قادر به تولید رنگدانه آبی و ٤ درصد از آن‌ها نیز قادر به تولید رنگدانه خاکستری بودند. این در حالی بود که هیچ‌کدام از سایر گونه‌های غیر *سودوموناس فلوروسنس* و نیز جدایه‌های *سودوموناس فلوروسنس* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس قادر به تولید رنگ‌دانه نبودند (Rossi *et al.*, 2018). در مطالعه دیگری گزارش شده که ۸۰ درصد از جدایه‌های *سودوموناس فلوروسنس* قادر به تولید رنگ‌دانه آبی بودند در حالی‌که در شرایط مشابه *سودوموناس تولاسای* (*P. tolaasii*) و *سودوموناس سینزانتا* (*P. synxantha*) قادر به تولید رنگ‌دانه نبودند (Martin *et al.*, 2011). در تحقیق دیگری از بین گونه‌های مختلف جداشده از خط تولید پنیر موزارلا تنها گونه *سودوموناس کورنسیس* (*P. koreensis*) از تمام مراحل تولید و محصول جدا گردید و قادر به تولید رنگ‌دانه بود (Chiesa *et al.*, 2014). در مطالعه شناسایی گروه *سودوموناس فلورسنس* به‌عنوان مسئول رنگ‌دانه آبی در پنیر تازه، *سودوموناس فلورسنس* و *سودوموناس آئروژینوزا* گزارش شد که هر دو جدایه در محیط کشت و هم‌چنین در پنیر تازه و آب پنیر موزارلا رنگ‌دانه سبز تولید می‌کنند. اما رنگ‌دانه آبی در آب پنیر موزارلا مربوط به *سودوموناس فلورسنس* بود (Carrascosa *et al.*, 2020).

طبق نتایج تحقیق حاضر بین تولید رنگ‌دانه سبز و زرد و قدرت تشکیل بیوفیلم رابطه آماری مشاهد نشد. در تحقیقی بین تولید رنگ‌دانه آبی و قدرت تشکیل بیوفیلم توسط سویه‌های *سودوموناس فلورسنس* رابطه گزارش شده است (Rossi *et al.*, 2018). در مطالعه دیگری تولید رنگ‌دانه آبی با افزایش بیماری‌زایی و مقاومت *E. chrysanthemi* در شرایط استرس اکسیداتیو مرتبط معرفی شده است (Reverchon *et al.*, 2002). هم‌چنین نقش این رنگ‌دانه در Swimming و قدرت

اتصال باکتری نشان داده شده است (Cude *et al.*, 2012). ممکن است رنگ‌دانه آبی در بقای باکتری در محیط بیوفیلم در طول استرس محیطی نقش ایفا کند.

بر اساس نتایج ۲ مورد (۲/۳ درصد) از جدایه‌ها دارای قدرت قوی، ٢٤ مورد (۲۷/۵۹ درصد) از جدایه‌ها دارای قدرت متوسط و ۵۸ مورد (٦٦/٦٧ درصد) از جدایه‌ها دارای قدرت ضعیف در تشکیل بیوفیلم و در ضمن ۳ مورد (۳/٤٥ درصد) از جدایه‌ها فاقد توانایی ایجاد بیوفیلم بودند (جدول ۵). در تحقیقی نشان داده شده است که قدرت تولید بیوفیلم در *سودوموناس*‌ها علاوه بر گونه و سویه جدایه‌ها به دما و مدت زمان گرمخانه‌گذاری نیز وابسته می‌باشد. در مطالعه اخیر گزارش شده که در طول ٤٨ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ۱۹ درصد از جدایه‌ها دارای قدرت قوی، ١٦ درصد از جدایه‌ها دارای قدرت متوسط و ٤٢ درصد از جدایه‌ها دارای قدرت ضعیف در تشکیل بیوفیلم و در ضمن ۲۳ درصد از جدایه‌ها فاقد توانایی ایجاد بیوفیلم بودند (Rossi *et al.*, 2016). در مطالعه دیگری روی *سودوموناس*‌های آئروژینوزای جدا شده از بیماران سوختگی و محیط بیمارستان گزارش شده که ٤٩ درصد از جدایه‌ها دارای قدرت قوی و ۳۹ درصد از جدایه‌ها دارای قدرت متوسط در تشکیل بیوفیلم بودند و در ضمن ۱۲ درصد از جدایه‌ها فاقد توانایی ایجاد بیوفیلم بودند (Alhamdani and Al-Luaibi., 2020). بیوفیلم‌های تولید شده توسط *سودوموناس*‌ها می‌توانند به مدت ٤ ماه روی سطوح باقی مانده و باعث بقای باکتری حتی در صورت اجرای شست‌وشو و ضدعفونی گردند (Carrascosa *et al.*, 2015). براساس نتایج این مطالعه بین میزان حرکت Swimming جدایه‌ها و قدرت تشکیل بیوفیلم در آن‌ها رابطه معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۵$) مشاهده شد ولی این رابطه در مورد حرکت نوع Swarming و Twitching وجود نداشت. مشابه با یافته‌های تحقیق حاضر، برخی سویه‌های *سودوموناس* دارای حرکت Switching و Swarming، توانایی تشکیل بیوفیلم نداشتند (Muner Otten *et al.*, 2017).

در تحقیق حاضر اکثر جدایه‌ها هر سه نوع حرکت را داشتند و میانگین حرکت نوع Swimming به‌طور معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۰۱$) بیشتر از دو نوع حرکت دیگر بود. تولید رنگ‌دانه سبز بیشتر از رنگ‌دانه زرد مشاهده شد. اکثر جدایه‌ها قادر به تشکیل بیوفیلم بودند و حدود ۳۰ درصد از آن‌ها در این ویژگی قوی و یا متوسط ظاهر شدند. بین میزان Swimming و قدرت تشکیل بیوفیلم در جدایه‌ها رابطه معنی‌دار ($p \leq ۰/۰۵$) مشاهده شد. سواب سینه‌مرغ زنده کمترین آلودگی و آب مورد استفاده عاری از سودوموناس بود. لذا می‌توان نتیجه گرفت که عمده آلودگی به این سودوموناس از طریق خط کشتار و تجهیزات و محیط کشتارگاه اتفاق می‌افتد و از آن‌جایی که *سودوموناس* به خودی‌خود یا با تولید بیوفیلم‌ها از مشکلات اصلی بروز فساد و کاهش ماندگاری لاشه طیور در یخچال است، لذا شستشو و ضدعفونی مناسب و مؤثر قسمت‌های مختلف باید تحت نظارت بیشتری صورت گیرد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abd El-Aziz, D.M. (2015). Detection of *Pseudomonas* spp. in chicken and fish sold in markets of Assiut City, Egypt. Journal of Food Quality and Hazards Control, 2: 86-89.
- Al-Dughaym, A.M. (2000). Recovery and antibiogram studies of *A. hydrophila* and *P. fluorescens* from naturally and experimentally infected Tilapia fishes. Pakistan Journal of Biological Sciences, 3(12): 2185-2187.
- Alhamdani, R.J.M. and Al-Luaibi, Y.Y.Y. (2020). Detection of *exoa Nan1* genes, the biofilm production with the effect of oyster shell and two plant extracts on *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patient and their surrounding environment. Systematic Reviews in Pharmacy,11(12): 1483-1493.
- Anand, S., Singh, D., Avadhanula, M., Marka, S. (2014). Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. Comprehensive Reviews in Food Sciense Food Safety, 13(1): 18-33.
- Bremner H.A. (2002). Safety and quality issues in fish processing. Woodhead Publishing Limited, Boca Raton. URL: https://www.elsevier.com/books/safety-and-quality-issues-in-fish-processing/bremner/978-1-85573-552-1.
- Bryers, J.D. (2000). Biofilms2:Process analysis and applications. ISBN: 978-0-471-29656-0.
- Burrows, L.L. (2012) *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. Annual Reviews in Microbiology, 66: 493–520.
- Buzby, J.C., Wells, H.F. and Hyman, J. (2014). The estimated amount, value, and calories of postharvest food losses at the retail and consumer levels in the United States. In Economic Information Bulletin, 121: 1-33.
- Caldera, L., Franzetti, L., Van Coillie, E., De Vos, P., Stragier, P., De Block, J. *et al.*, (2016). Dentification, enzymatic spoilage characterization and proteolytic activity quantification of *Pseudomonas* spp. Isolated from different foods. Food Microbiology, 54: 142-153.
- Carminati, D., Bonvini, B., Rossetti, L., Zago, M., Tidona, F. and Giraffa, G. (2019). Investigation on the presence of blue pigment-producing *Pseudomonas* strains along a production line of fresh mozzarella cheese Journal article: Food Control, Vol. 100, 321-328 ref. 34.
- Carrascosa, C., Millán, R., Jaber, J.R., Lupiola, P., del Rosario-Quintana, C., Mauricio, C. *et al.*, (2015). Blue pigment in fresh cheese produced by *Pseudomonas fluorescens*. Food Control, 54: 95-102.
- Carrascosa, C., Martínez, R., Esther Sanjuán, E., Rafael Millán, R., Rosario-Quintana, C., Acosta, F. *et al.*, (2020). Identification of the *Pseudomonas fluorescens* group as being responsible for blue pigment on fresh cheese. Journal of Dairy Science, 104(6):6548–6558.
- Chen, S.H., Fegan, N., Kocharunchitt, C., Bowman, J.P., Duffy, L.L. (2020). Changes of the bacterial community diversity on chicken carcasses through an Australian poultry processing line. Food Microbiology, 86:103-350.
- Chiesa, F., Lomonaco, S., Nucera, D., Garoglio, D., Dalmasso, A. and Civera, T. (2014). Distribution of *Pseudomonas* species in a dairy plant affected by occasional blue discoloration. Italian Journal of Food Safety, 3(4): 1722.
- Costerton, J.W. (2001). Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. Trends in Microbiology, 9(2): 50-52.
- Cude, W.N., Mooney, J., Tavanaei, A.A., Hadden, M.K., Frank, A.M., Gulvik, C.A *et al.*, (2012). Production of the antimicrobial secondary metabolite indigoidine contributesto435 competitive surface colonization by the marine roseobacter *Phaeobacter* sp. strain Y4I. Applied and Environmental Microbiology, 78;4771-4780.

- Darzins, A. (1993). The *pilG* gene product, required for *Pseudomonas aeruginosa* pilus production and twitching motility, is homologous to the enteric single-domain response regulator CheY. Journal of Bacteriology, 175: 5934–5944.
- Del Olmo, A., Calzada, J., Nuñez, M. (2018). The blue discoloration of fresh cheeses: A worldwide defect associated to specific contamination by *Pseudomonas fluorescens*. Food Control, 86, 359-366.
- Déziel, E., Comeau, Y., Villemur, R. (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. Journal of Bacteriology, 183(4): 1195-1204.
- Djordjevic, D., Wiedmann, M., Mclandsborough, L. (2002). Microtiter plate assay for assessment of listeria monocytogens biofilm formation. Applied and Environmental Microbiology, 68(6): 2950-2958.
- Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical Microbiology Review, 15(2): 167-193.
- Günseren, F., Mamıkoğlu, L., Öztürk, S., Yücesoy, M., Biberoğlu, K., Yuluğ, N *et al.*, (1999). A surveillance study of antimicrobial resistance of gram-negative bacteria isolated from intensive care units in eight hospitals in Turkey. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 43(3): 373-378.
- Handley, J.A., Park, S.H., Kim, S.A., Ricke, S. (2018). Microbiome profiles of commercial broilers through evisceration and immersion chilling during poultry slaughter and the identification of potential indicator microorganisms. Frontiers in Microbiology, 9: 1-11.
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005). Modern Food Microbiology. 7th edition. Springer Science, USA.
- Keskin, D. and Ekmekçi, S. (2007). Investigation of the incidence of *Pseudomonas* spp. in foods., Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 35 (3): 181-186.
- Martin, N.H., Murphy, S.C., Ralyea, R.D., Wiedmann, M., Boor, K.J. (2011). When cheese gets the blues: *Pseudomonas fluorescens* as the causative agent of cheese spoilage. Journal of Dairy Science, 94(6): 3176-3183.
- Mead G.C. (2005). Food safety control in the poultry industry. Woodhead Publishing Limited, USA. https://www.elsevier.com/books/food-safety-control-in-the-poultry-industry/mead/978-1-85573-954-3.
- Muner Otton, L., da Silva Campos, M., Meneghetti, K.L., Corção, G. (2017). Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. Archives of Microbiology, 199: 677-682.
- Nucera, D.M., Lomonaco, S., Morra, P., Ortoffi, M.F., Giaccone, D., Grassi, M.A. (2016). Dissemination and persistence of *Pseudomonas* spp. in small-scale dairy farms. Italian Journal of Food Safety, 5(2), 91-94.
- Rashid, M. H. and Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 97(9): 4885–4890.
- Reverchon, S., Rouanet, C., Expert, D. and Nasser, W. (2002). Characterization of indigoidine biosynthetic genes in erwinia chrysanthemi and role of this blue pigment in pathogenicity. Journal of Bacteriology, 184(3): 654–665.
- Rossi, C., Serio, A., Chaves-Lopez, C., Anniballi, F., Auricchio, B., Goffredo, E. *et al.*, (2018). Biofilm formation, pigment production and motility in *Pseudomonas* spp. isolated from the dairy industry. Food Control, 86; 241-248.

- Rossi, Ch., Chaves-López, C., Serio, A., Goffredo, E., Goga, B.T.C. and Paparella, A. (2016). Influence of incubation conditions on biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* isolated from dairy products and dairy manufacturing plants. Italian Journal of Food Safety, 5: 154-157.
- Stanborough, T., Fegan, N., Powell, S.M., Singh, T., Tamplin, M. and Chandry, P.S. (2018). Genomic and metabolic characterization of spoilage-associated *Pseudomonas* species. International Journal of Food Microbiology, 268: 61-72.
- ́Toole G.A. and Kolter R. (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple con-vergent signaling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology, 28: 449–461.
- Vithanage, N.R., Dissanayake, M., Bolge, G., Palombo, E.A., Yeager, T.R., Datta, N. (2016). Biodiversity of culturable psychrotrophic microbiota in raw milk attributable to refrigeration conditions, seasonality and their spoilage potential. International Dairy Journal, 57: 80-90.