مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره پنجم، شماره هجدهم - بهار ۱۳۹۴

Research Article
مقاله تحقیقی

بررسی و مقایسه فاکتور های استرس ORS و pH بر تشکیل بیوفیلم و فرم پلانکتونی E.coli O157:H7

حمید تبیانیان*[۱،] و بهجت یوسفی ثابت مژده[۲]

۱. دانشجوی دکتری، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران.
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد لاهیجان، دانشگاه آزاد اسلامی، لاهیجان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: باکتری E.coli O157:H7 از خانواده انتروباکتریاسه باسیل گرم منفی می باشد که منجر به بیماری های گوارشی شدید اسهال، کولیت هموراژیک، سندرم اورمی همولیتیک می شود. هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه فاکتور های استرس ORS و pH بر تشکیل بیوفیلم و فرم پلانکتونی E.coli O157:H7 در هر دو حالت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد می باشد و بررسی شکل باکتری مذکور در شرایط استرس های، pH و پودر ORS در حالت میکروسکوپی(شکل باکتری) و ماکروسکوپی (شکل کلنی باکتری در محیط کشت نوترینت آگار) می باشد.
مواد و روش ها: سویه باکتری E.coli O157:H7 از موسسه واکسن و سرم سازی رازی به شماره ۲۳۲۳ (RITCC) خریداری شد. باکتری در شرایط استرس در محیط نوترینت براث مایع قرار داده شد و بعد از آن برای دیدن شکل کلنی به محیط نوترینت آگار در پلیت برده شد و شکل کلنی و همچنین شکل باکتری با رنگ آمیزی گرم مورد بررسی قرار گرفت. تعداد باکتری های زنده در استرس با روش پور پلیت با تهیه رقت انجام شد. برای تعیین قدرت تشکیل بیوفیلم در استرس ها از روش مورد تأیید میکروتیتر پلیت استفاده گردید و با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد.
یافته ها: شکل باکتری در حالت استرس تحت تأثیر قرار گرفت. در شرایط استرس مورفولوژی کلنی و شکل باکتری تغییر محسوسی پیدا می کند و شکل باکتری در استرس تمایل به سمت کوکسی شدن و باسیل دارد تا بتواند بقا بیشتری داشته باشد. بقای باکتری در شرایط استرس در حالت بیوفیلم خیلی بیشتر از حالت پلانکتونی می باشد.
نتیجه گیری: این تغییرات ارتباط مستقیمی با بقا بیشتر باکتری در دستگاه گوارش داشته و مانع اثر ترکیبات آنتی باکتریال مختلف طبیعی دستگاه گوارش به باکتری شده و مقاوت باکتری در شرایط بیوفیلم بیشتر از حالت پلانکتونی است.

کلمات کلیدی : پلانکتونی، بیوفیلم، اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷

مقدمه

در میان کلاسهای طبقه بندی شده اشرشیاکلی نیز عوارض تهدید کننده ای مثل HUC با شدت بیماریزایی آن در ارتباط است(۱). گاو منبع اصلی، اولیه و طبیعی E.coli O157:H7 می باشد و تعدادی از حیوانات مانند گوسفند، بز و... بعنوان ناقل در نظر گرفته می شوند.

آدرس نویسنده مسئول : دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج)، تهران، ایران
پست الکترونیکی : tebyan.hamid@yahoo.com
تاریخ دریافت مقاله : ۱۳۹۲/۱۲/۲۳
تاریخ پذیرش مقاله : ۱۳۹۴/۴/۲۳

باکتری E.coli O157:H7 در روده بزرگ و رکتوم گاو ساکن می شود و بطور تخمینی ساکن روده بزگ و رکتوم در ٪۱۰-۸ گاوها است. جالب این است که باکتری در گاو بدون علامت و بیماری است اما در موارد نادر، گوساله های جوان ممکن است اسهال اولیه داشته باشند و پس از آن بدون علامت شوند. این حالت بدون علامت بودن و عدم وجود عوارض در گاو را می توان به علت فقدان گیرنده مهم در سطح سلول های اندوتلیال اشاره کرد (در انسان به دلیل داشتن گیرنده و ساکن شدن می تواند بیماریزا باشد)(۱۶). بر خلاف اغلب سویه های اشرشیاکلی، این سروتایپ توانایی رشد در محیط اسیدی را دارد. در

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

یک آزمایش این باکتری به مدت پنج تا هفت هفته در دمای ۵ درجه سانتی گراد و یک تا سه هفته در دمای۲۰ درجه سانتی گراد با pH ۹/۳-۶/۳ زنده باقی مانده است. تفاوت دیگر این سروتایپ در مقایسه با سایر سویه های اشرشیاکلی، مقاومت به آنتی بیوتیک ها است. این باکتری به بسیاری از آنتی بیوتیک های خاص باکتریهای گرم منفی حساس بوده ولی به دلیل مصرف زیاد و بی رویه، در حال حاضر به آنتی بیوتیک های گوناگون مانند استرپتومایسین، تریمتوپریم سولفومتوکسازول و تتراسیکلین مقاومت نشان داده است(۱۴،۶،۲). تشکیل بیوفیلم یک فرایند فعال است و شامل اتصال اولیه، تشکیل میکروکلنی، تولید ماده پلیمریک خارج سلول (EPS)، به دنبال آن رشد و بلوغ و در نهایت کنده شدن و رهایی سلول ها از بیوفیلم می باشد. بیوفیلم ها میتوانند از یک گونه خاص و یا از چند گونه متنوع تشکیل شده باشند. بیوفیلم های چند گونه ای به دلیل ضخامت بیشتر و اندازه بزرگتر بسیار پایدارتر می باشند. انتقال باکتری ها از حالت آزاد به حالت متصل با علائم محیطی شروع می شود. در اکوسیستم های طبیعی مواد غذایی در دسترس کم است و تشکیل بیوفیلم، سازگاری مهمی برای بقای میکروارگانیسم ها و محافظت در چنین شرایطی می باشد. بنابراین اصول تشکیل بیوفیلم مشاهده شده در طبیعت نمی تواند برای محیط های صنایع غذایی با محتوای غذایی بکار رود. در صنایع غذایی مراحل تشکیل بیوفیلم به صورت زیر می باشد. انتقال مواد غذایی به سطح، تشکیل لایه های تشکیل دهنده بیوفیلم، رشد و متابولیسم و در نهایت کنده شدن می باشد(۱۳،۱۲،۹،۴). بیوفیلم بیشتر در باکتری های گرم منفی که با دام سروکار دارند دیده شده است مثل باکتری E.coli O157:H7 که در معده گاو یافت می شود(۸،۳). هدف از این مطالعه بررسی و مقایسه فاکتور های استرس ORS و pH بر تشکیل بیوفیلم و فرم پلانکتونی E.coli O157:H7 می باشد.

روش کار

آماده سازی باکتری و نحوه استرس دهی

یک ویال سویه لیوفیلیزه باکتری اشرشیاکلی O۱۵۷:H۷ از موسسه واکسن و سرم سازی رازی به شماره RICTC ۲۳۲۳ (شماره اصلی: دانشگاه ابردین انگلیس(NCTC ۱۲۹۰۰) خریداری شد. ۲ میلی لیتر از سوسپانسیون تهیه شده باکتری با غلظت ۵/۰ مک فارلند داخل لوله ریخته شد و استرس را در سوسپانسیون به طریق زیراعمال شد(۳بار تکرار در هر آزمایش). برای اعمال درصد pH (۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰) و پودر ضد اسهال (ORS) (٪۰،۱،۲،۳/۵،۵،۵/۵،۷،۸) غلظت های مورد نیاز با توجه به درصد وزن حجمی در سوسپانسیون در نظر گرفته شد. برای ایجاد شرایط اسیدی و بازی از HCL و NaoH پنج نرمال استفاده شد و دستگاه pH متر الکترود برای خواندن دقیق pH استفاده شد. برای اعمال گرما و سرما از بن ماری، انکوباتور و یخچال(درجه سانتی گراد) استفاده شد. باکتری به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت در شرایط استرس قرار داده شد(در محیط نوترینت براث). سپس برای دیدن شکل باکتری به محیط نوترینت اگار منتقل شد. در نهایت شکل کلنی (عکس گرفتن با دوربین) و شکل باکتری (تهیه لام ورنگ امیزی گرم و دیدن زیر میکروسکوپ نوری دوربین دار) بررسی شد. برای شمارش باکتری های زنده با تهیه رقت نیز با روش پور پلیت انجام شد. (در پورپلیت باکتریهای زنده را می شماریم ولی در اسپکتوفتومتری کل باکتری ها اعم از زنده و مرده را می شماریم) (۹،۷،۲).

میانگین تعداد کلنی در سه پلیت × عکس ضریب رقت × ۱۰ = $CFU\ ml^{-1}$

تولید بیوفیلم و بررسی اثر استرس ها

از سویه مورد نظر بر روی محیط TSA+۲٪ glu (۲٪ glucose + Trtyptic Soy Agar)کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرماگذاری شد. از تک کلنی های رشد یافته روی محیط TSA+۲٪ glu به محیط TSB+۲٪ glu(۲٪ glucose + Trtyptic Soy Broth)تلقیح شد تا سوسپانسیونی با جذب نوری معادل ۱/۰ در طول موج ۶۲۵ نانومتر به دست آید. با نسبت ۱ به ۱۰۰ رقیق شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون، به هر چاه پلیت میکروتیتر ۹۶ خانه ای اضافه شد. به چاهک کنترل منفی ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت TSB+۲٪ glu اضافه شد. به چاهک کنترل مثبت ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون محیط کشت و باکتری اضافه شد. به منظور جلوگیری از تبخیر، پلیت های میکروتیتر در پلاستیک قرار داده شد(دمای ۳۰درجه برای ۲۴ ساعت). ۱۰۰میکرولیتر غلظت عوامل بیوساید به هر چاهک میکروتیتر پلیت اضافه شد. به منظور جداشدن باکتریهای متصل نشده،۲۰۰ میکرولیتر بافر PBS (فسفات بافر سالین) و سپس ۲۰۰ میکرولیتر سرم فیزیولوژی استریل به هر چاهک اضافه و مجددا آسپیره شد. در این مرحله ۱۵۰ میکرولیتر متانول مطلق به هر چاهک اضافه شد (به منظور باکتری های چسبیده) و پس از ۱۰ دقیقه متانول هر چاهک آسپیره شد. سپس به هر چاهک ۲۰۰ میکرولیتر کریستال ویوله ٪۱ اضافه شد. پس از ۲۰ دقیقه رنگ اضافی آسپیره شد و پلیت در زیر جریان آب کم شسته شد(۳ بار). پس از خشک شدن پلیت در مجاورت هوا، به هر چاهک ۱۵۰ میکرولیتر اسید استیک گلاسیال ٪۳۳ افزوده شد. با افزودن این ماده قادر به اندازه گیری غیرمستقیم باکتریهای متصل شده به کف و دیواره چاهک شدیم. (اسید استیک نیز رنگ متصل شده به سلولهای چسبیده به دیواره کف چاهک را به خوبی حل می کند و باعث دقت در تعیین بیوفیلم ایجاد شده می گردد). سپس اثر استرس ها بر روی بیوفیلم سنجیده شد(۱۵،۱۴،۱۱).

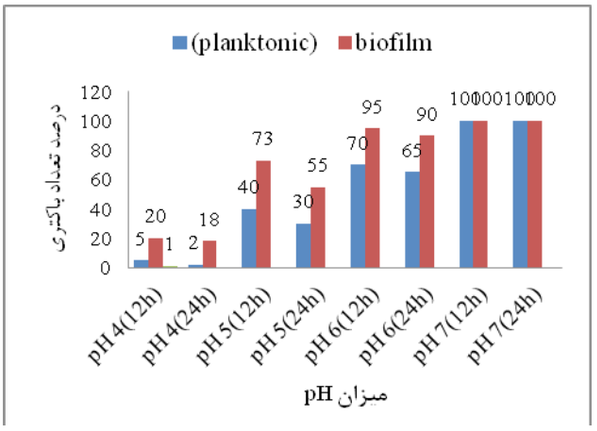
[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

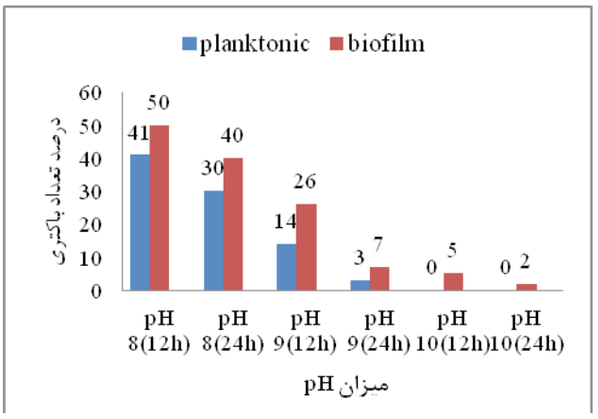
[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

نتایج

با گذشت زمان، درصد باکتری های باقی مانده در حالت بیوفیلم بیشتر از حالت پلانکتونی در استرس ها نیز بوده است و همچنین مقاومت بیوفیلم با گذشت زمان زیاد می شد.

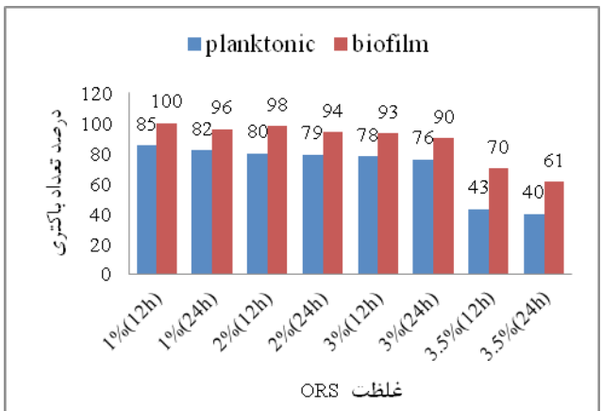
pH: بیشترین مقاومت سلول های باقیمانده در شرایط بیوفیلم نسبت به حالت پلانکتونی در ۴ pH و در ۲۴ ساعت، ۹ برابر است. کمترین مقاومت سلول های باقیمانده در شرایط بیوفیلم نسبت به حالت پلانکتونی در ۸ =pH برابر ۲۱/۱ در ۱۲ ساعت می باشد. نتایج بر حسب درصد در نمودار ۱ آمده است و ۷pH= بهترین شرایط برای رشد باکتری می باشد و ۴،۱۰ =pH واجد کمترین رشد باکتری می باشد.

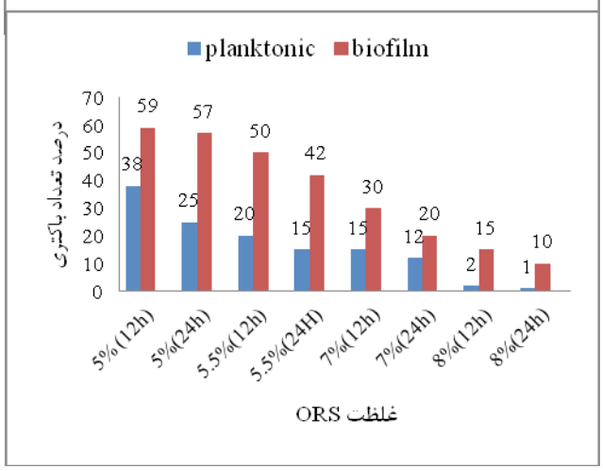




نمودار (۱) : استرس pH (۴،۵،۶،۷،۸،۹،۱۰) در دو حالت پلاکتون و بیوفیلمی در دو زمان مشخص (۱۲ و ۲۴ ساعت)

ORS: بیشترین مقاومت سلول های باقیمانده در شرایط بیوفیلم نسبت به حالت پلانکتونی در ORS ۸ درصد و در ۲۴ ساعت نیز ۱۰ برابر است. کمترین مقاومت سلول های باقیمانده در شرایط بیوفیلم نسبت به حالت پلانکتونی در ۱ درصد ORS برابر ۲۱/۱ در ۲۴ ساعت می باشد. نتایج بر حسب درصد در نمودار۲ آمده است و میزان رشد باکتری با افزایش میزان درصد ORS نیز کاهش می یابد. با میزان ۸ درصد از ORS نیز به کمترین مقدار خود در هر دو حالت می کند.





نمودار(۲): استرس ORS (۸،۷،۵/۵،۵،۵/۳،۱،۲،۳٪) در دو حالت پلاکتون و بیوفیلمی در دو زمان مشخص (۱۲ و ۲۴ ساعت)

شکل کلنی در پلیت (ماکروسکوپی) در شرایط استرس فیزیکوشیمیایی

pH: در مورد حجم کلنی در ۷ pH که در شرایط کنترل است نیز کلونی ها بزرگ هستند و در شرایط اسیدی، کلنی ها کوچک و در شرایط بازی کلنی ها سوزنی هستند. رنگ همه کلنی ها سفید براق گزارش شدند. بافت همه کلنی ها به صورت مرطوب نرم و همچنین در شرایط اسیدی کلنی ها به صورت محدب و ارتفاع همه کلنی ها برآمده گزارش شدند. کلیه صفات در جدول ۱ آمده است.

pH	شکل کلنی(پرگنه) در pH
۴	کوچک - سفید - مرطوب نرم - گرد - برآمده
۵	کوچک - سفید- مرطوب نرم - محدب - برآمده
۶	کوچک - سفید- مرطوب نرم - گرد - برآمده
۷	بزرگ - سفید- مرطوب نرم - گرد - برآمده
۸	سوزنی - سفید- مرطوب نرم - گرد - برآمده
۹	سوزنی - سفید- مرطوب نرم - گرد - برآمده
۱۰	سوزنی - سفید- مرطوب نرم - گرد - برآمده

جدول(۱):کلیه صفات باکتری E.coli O157:H7 در pH ۴،۱۰

ORS: حجم کلنی از غلظت کم به زیاد به سمت کوچکتر شدن میل

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

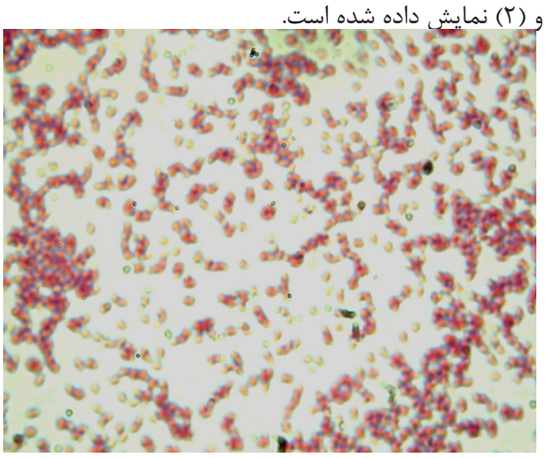
می کند (کلنی سوزنی مشاهده نمی کنیم). در غلظت ۱ درصد ORS کلنی ها سفید می شوند و هر چه غلظت از ۱ درصد بیشتر شوند کلنی ها شیری رنگ می شوند. از لحاظ بافت همه کلنی ها مرطوب چسبناک گزارش شدند. در مورد شکل نیز کلنی ها گرد گزارش شدند. از لحاظ ارتفاع نیز کلنی ها در۱ درصد ORS مسطح گزارش شدند و در غلظت های بیشتر نیز کلنی ها کمی برآمده گزارش شدند. کلیه صفات در جدول۲ آمده است.

جدول(۲):کلیه صفات باکتری E.coli O157:H7 درORS (۸،۷،۵/۵،۵،۵/۳،۱،۲،۳٪)

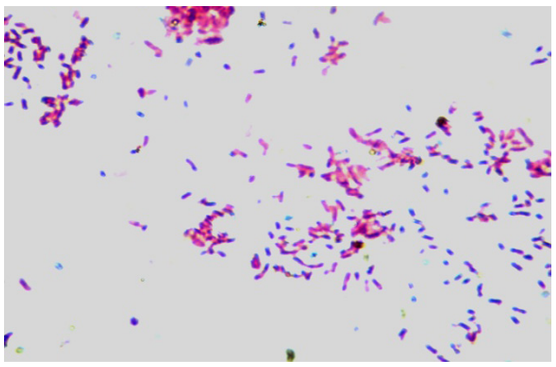
٪ORS	شکل کلنی(پرگنه) در ORS
۱	بزرگ - سفید - مرطوب چسبناک - گرد- مسطح
۲	متوسط - شیری- مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۳	متوسط- شیری- مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۳/۵	متوسط - شیری - مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۵	کوچک - شیری - مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۵/۵	کوچک - شیری - مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۷	کوچک - شیری - مرطوب چسبناک - گرد- برآمده
۸	کوچک - شیری - مرطوب چسبناک - گرد- برآمده

شکل باکتری در زیر میکروسکوپ

در مورد شکل باکتری در تنش های ORS ۷ و ۸ درصد باکتری نسبت به حالت شاهد درازتر و باسیل تر می شوند. در تنش ORS نیز رنگ آمیزی باکتری در شرایط یکسان همه باکتری ها به طور یکسان رنگ نمی پذیرند. در مورد شکل باکتری در تنش pH باکتری در حالت pH ۴ تمایل به کوکسی و گرد شدن می شود. شکل های مربوطه در تصاویر (۱) و (۲) نمایش داده شده است.



تصویر(۱): باکتری در تنش pH ۴ که تمایل به کوکسی شدن دارند.



تصویر (۲): باکتری در استرس ۷،۸٪ ORS تمایل به درازتر شدن(باسیل) دارد.

بحث

هووس و همکاران در سال ۲۰۰۷ ثابت نمودند که فاکتورهای ویرولانس، چسبندگی، تولید سم شیگا توکسین و تحرک با شرایط اسیدی که باکتری *E. coli O*۱۵۷: *H*۷ در آن قرار می گیرد در ارتباط است(۱۰). چین و همکاران در سال ۲۰۰۴ ثابت کردند که باکتری *E. coli O*۱۵۷: *H*۷ در شرایط نامساعد از جمله اسید استیک ۵/۱ ٪ می تواند برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ °C را تحمل کند. همچنین این باکتری در شراب سیب در دمای ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۱۴ روز و در دمای ۶۲ درجه در گوشت گوزن و آهو بمدت ۱۰ ساعت زنده مانده است. تحمل شرایط نامطلوب باکتری به تشکیل exopolysaccharide colanic acid برمی گردد(۲). در سال ۲۰۱۱، دیویا و همکاران در مورد باکتری *E. coli O*۱۵۷: *H*۷ نشان دادند که بیوفیلم در حداقل مواد غذایی و یا سطح بی اثر (سطح کیتین) نیز می تواند تشکیل شود و ثابت کردند که اولا پایداری بیوفیلم از حالت پلانکتونی بیشتر است و ثانیا کاهش سلولهای پلانکتونی به تدریج از حالت بیوفیلم بیشتر است. سلول های بیوفیلم در شرایط فیزیولوژیکی خاص خود به آنتی بیوتیک ها مقاوم هستند که این مقاوم بودن در اکثر آزمایش ها و از جمله این تحقیق ثابت شده است. بیوفیلم یک استراتژی مهم در زنده ماندن بیشتر باکتری در شرایط نا مطلوب است(۴). دلامانی در سال ۲۰۰۸ شرایط بقای باکتری *E. coli O*۱۵۷: *H*۷ را در شرایط اسیدی در شیر بررسی کرد و به نتایج جدیدی دست یافت که این باکتری شرایط اسیدی(pH= ۴.۵) و همچنین شرایط بسیار اسیدی۲.۵(pH=)رابرای مدت ۴ ساعت می تواند تحمل کند. این باکتری می تواند ۷ درجه سانتی گراد را برای مدت ۲ روز می تواند تحمل کند(۵). در این تحقیق نیز با مقایسه شکل مورفولوژی کلنی در دو استرس pH و ORS می توان گفت که هرچه غلظت ORS بیشتر شود کلنی به سمت کوچک تر شدن میل می کند، در حالی که در شرایط اسیدی کلنی کوچک و در شرایط بازی کلنی سوزنی می شود. در شرایط اسیدی و بازی رنگ کلنی ها

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

سفید و در شرایط ORS شیری رنگ مشاهده می شوند. بافت کلنی در هر دو مورد مرطوب است که در شرایط اسیدی و بازی، مرطوب نرم و در ORS، مرطوب چسبناک گزارش شده اند. شکل کلنی ها در همه موارد گرد است ولی در شرایط اسیدی تمایل به محدب بودن دارد و همین طور حالت بیوفیلمی در سطوح مختلف استرس های pH و ORS بسیار مقاوم تر از حالت پلانکتونی در طی دو زمان مشخص (۱۲ و ۲۴ ساعت) می باشد و بهترین شرایط برای باکتری نیز در pH ۷ و ۱٪ ORS می باشد.

نتیجه گیری

برای جلوگیری از عفونت زایی این باکتری می بایست شرایط مطلوبی که برای رشد این باکتری در این گزارش آمده است برای باکتری محیا نشود، تا از ایجاد عفونت و بیماری در موجودات جلوگیری به عمل آید.

سپاسگزاری

از حمایت و پشتیبانی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا...(عج) تشکر و قدردانی می شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

منابع

1. Bhekisisa CD, *Acid Adaptation of Escherichia coli O*157:*H*7 *in Fermented Goat Milk*. Faculty of Natural and Agricultural Science.University of Pretoria. 2008. 10-75.

2. Chen J, Lee SM, Mao Y. Protective effect of exopolysaccharide colanic acid of Escherichia coli O157:H7 to osmotic and oxidative stress. Int J Food Microbiol. 2004; 93(3):281-286.

3. Conner DE. Temperature and NaCl affect growth and survival of Escherichia coli O157:H7 in poultry-based and laboratory media. J. Food Sci. 1992; 57(7):532- 533.

4. Divya S, Masilamani Selvam M. Invitro Biofilm Production of *Escherichia coli O*157:*H*7 strain. Int J Environ. Microbiol. 2011; 2 (1):290-294.

5. Dlamani BC. Acid daptation of *Escherichia coli O*157:*H*7 in fermented goat milk. food Sci and Technol. 2008; 5(2):11-6.

6. Ferens WA, Carolyn J. Hovde CJ. *Escherichia coli O*157:*H*7. Animal reservoir and sources of Human Infection. Food Path and Dise. 2011; 8(4):465-88.

7. Gabriel AA, Nakano H. Influences of simultaneous physicochemical stress exposures on injury and subsequent responses of E.coli O157:H7 to resuscitative and inactivative challenges. J Food Microbiol. 2010; 139(3):182-192.

8. Glass KA, Loeffelholz JM, Ford JP, Doyle MP. Fate of E.coli O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented sausage. App. Environ. Microbiol. 1992; 58(11):2513- 2516.

9. Hiraga S, Niki H, Ogura T, Ichinose C, Mori H, Ezaki B, Jaffe A. Chromosome partitioning in Escherichia coli: novel mutants producing anucleate cells. J. Bacteriol. 1989; 171(11):1931-1939.

10. House B, Kus JV, Prayitno N, Mair R, Que L, Chingcuanco F, Gannon V, Cvitkovitch D G, Barnett Foster D. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli O*157:*H*7 virulence. J. Microbial. 2009; 15(3):2907-18.

11. Kawarai T, Furukawa S, Narisawa N, Hagiwara C, Ogihara H, Yamasaki M. Biofilm formation by Escherichia coli in hypertonic sucrose media. J Biosci Bioeng. 2009; 107(6):630-635.

12. Kermanshahi Kasra R, Beheshti Maal K, Mobini Dehkordi M. Cellular and Molecular Biology of Bacterial Structure. Isfahan University. 2008.115-123 [In Persian].

13. Mohammadi Mehr M, Abdi Ali A. study of biofilm formation by *pseudomonas aeruginosa* using modified

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

microtitre plate and scaning electron microscope. Army J Med Scie. 2004; 2(5):12-9.

14. Narisawa N,Furukawa S,Ogihara H,Yamasaki M. Estimation of the biofilm formation of Escherichia coli K-12 by the cell number. J Biosci Bioeng. 2005; 99(1):78-80.

15. Otoole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways:a genetic analysis. Mol. Microbiol. 1998; 42(5): 449-461.

16. Rogerie F,Marecat A,Gambade S,Dupond F,Beaubois P,Lange M. Characterization of Shiga toxin producing E. coli and O157 serotype E. coli isolated in France from healthy domestic cattle. Int J Food Microbiol. 2001; 63(3):217-223.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2024-04-19]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1394.5.18.3.3]