Bakteriofag untuk Biokontrol Biofilm dalam Sistem Pangan
Bacteriophages for Biocontrol of Biofilms in Food System

Netty Kusumawati[1]*, Agustin Krisna Wardani[2]

[1]Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Katolik Widya Mandala Surabaya,
Jl. Dinoyo 42-44, Surabaya, 60265, Indonesia
[2] Fakultas Teknologi Pertanian, Universitas Brawijaya, Jl. Veteran, Malang, 65145, Indonesia
*korespondensi penulis:netty@ukwms.ac.id

Diterima: 29 Oktober 2023, Disetujui: 30 November 2023, Diterbitkan: 1 Desember 2023

Abstrak. Biofilm adalah bentuk adaptasi yang sangat umum yang memungkinkan bakteri untuk bertahan dalam lingkungan yang tidak menguntungkan. Beragam mikroorganisme yang dapat membentuk biofilm mampu tumbuh pada matriks makanan dan di sepanjang infrastruktur industri pangan. Biofilm menjadi masalah dalam penggunaan antibiotik dan biosida, disebabkan baik oleh adanya matrik ekstraseluler alami maupun karena keberadaan sel bakteri yang secara metabolik inaktif namun bertahan di dalam biofilm (*persister cells*). Beberapa bahan kimia yang sangat efektif jika digunakan untuk menyerang sel bebas/tidak dalam bentuk biofilm (*planktonic cells*), menjadi tidak efektif jika diaplikasikan pada biofilm. Di sisi lain, bakteriofag memiliki kemampuan yang besar untuk menyerang pertumbuhan bakteri dalam bentuk biofilm tersebut. Adanya sejumlah besar sel bakteri yang bertahan dalam biofilm mendukung aksi bakteriofag pada biofilm sebab sel bakteri adalah inang bagi bakteriofag tersebut sehingga jika inang terdapat dalam jumlah besar menyebabkan multiplikasi bakteriofag yang lebih cepat pula sehingga bakteriofag menginfeksi dengan lebih cepat dan efisien. Bakteriofag juga memiliki sejumlah sifat yang menyebabkan biofilm rentan terhadap serangannya. Bakteriofag diketahui menghasilkan (atau mampu menginduksi) enzim yang mendegradasi matrik ekstraseluler. Bakteriofag juga dapat menginfeksi persister cells, dan memasuki fase dorman dalam sel yang inaktif dalam biofilm, tetapi aktif kembali jika sel bakteri tersebut juga aktif bermetabolisme kembali. Beberapa biofilm bahkan juga mampu mendukung replikasi bakteriofag dengan lebih baik dibandingkan dengan sel bebasnya. Bakteriofag dapat diaplikasikan dalam sistem pangan untuk menghancurkan biofilm dari bakteri patogen sehingga dapat meningkatkan keamanan pangan.

Kata kunci: bakteriofag; biofilm; keamanan pangan

Abstract. Biofilms are a very common form of adaptation that allows bacteria to survive in unfavorable environments. Microorganisms of various types can develop on food matrixes and along food industry infrastructure. This expansion might result in the formation of biofilms. Biofilms produced by pathogenic bacteria in food systems are a problem to food safety. Biofilms are a problem in the use of antibiotics and biocides due to the presence of a natural extracellular matrix and the presence of bacterial cells that are metabolically inactive but survive in the biofilm

(persister cells). Some chemicals that are very effective when used to attack free cells but not in the form of biofilm (planktonic cells) become ineffective when applied to biofilms. On the other hand, bacteriophages can attack bacterial growth in the form of biofilms. The presence of a large number of bacterial cells surviving in the biofilm supports the action of bacteriophages in the biofilm. Bacterial cells are hosts for bacteriophages, so if the host is present in large numbers, it causes bacteriophages to infect more quickly and efficiently because bacteriophage multiplication is faster if more hosts are available. Bacteriophages also have some properties that make biofilms susceptible to attack. Bacteriophages are known to produce (or be able to induce) enzymes that degrade the extracellular matrix. Bacteriophages can also infect persister cells and enter a dormant phase in inactive cells in the biofilm but become active again if the bacterial cells are also metabolically active again. Some biofilms are even able to support bacteriophage replication better than free cells. Bacteriophages can be applied to destroy biofilms of pathogenic bacteria in food systems to improve food safety.

Keywords: bacteriophage, biofilms, food safety

Biofilm

Biofilm secara alami merupakan agregasi sel baik eukariotik atau prokariotik, terdiri dari satu atau lebih spesies bakteri yang melekat ke permukaan dan tertanam dalam matriks polimer ekstraseluler/ extracellular polymeric substances (EPS) yang diproduksi oleh sel-sel di dalam biofilm tersebut. EPS ini terdiri dari polisakarida, protein, asam nukleat dan lipid yang sangat bervariasi bergantung pada mikroba penghasil dan kondisi lingkungan dimana biofilm tersebut dibentuk (Flemming dan Wingender, 2010). Struktur tersebut diproduksi untuk melindungi mikroorganisme dari tekanan lingkungan seperti kekeringan, adanya toksisitas oksigen, kekurangan nutrisi, dan adanya senyawa antimikroba (O'Toole et al, 2000). Biofilm merupakan mekanisme adaptasi yang sangat umum, yang memungkinkan bakteri untuk bertahan pada lingkungan yang tidak menguntungkan. Produksi EPS memiliki banyak fungsi bagi bakteri penghasilnya, antara lain: a) memfasilitasi perlekatan awal bakteri ke permukaan; b) pembentukan dan pemeliharaan koloni dan struktur biofilm; c) meningkatkan ketahanan bakteri dalam biofilm terhadap stres lingkungan dan senyawa anti-mikroba; d) matrix EPS memungkinkan bakteri untuk mengambil nutrisi.

Bakteri dalam biofilm menunjukkan tingkat resistensi yang sangat tinggi terhadap perlakuan mekanis, fisis serta senyawa antimikroba, seperti desinfektan dan antibiotik. Senyawa yang diperlukan untuk menghasilkan efek antibakteri terhadap biofilm dapat 1000 kali lebih besar dari tingkat yang diperlukan untuk bakteri yang hidup bebas (planktonik cell) (Ceri et al, 1999). Pembentukan biofilm menyebabkan banyak masalah dalam industri makanan, karena dapat menyumbat pori-pori membran, menghambat aliran panas di permukaan, meningkatkan ketahanan gesek fluida di permukaan dan meningkatkan laju korosi pada permukaan alat yang berdampak pada pemborosan energi dan kerusakan alat maupun produk hasil olahan. Misalnya, dalam kasus *heat exchanger,* biofilm menyebabkan peningkatan resistensi baik dalam aliran cairan dan perpindahan panas (Criado et al., 1994). Selain kerugian tersebut, biofilm yang dibentuk bakteri pembusuk dan patogen pada permukaan makanan seperti unggas, keju dan makanan lain serta pada permukaan peralatan pengolahan dapat menyebabkan masalah kontaminasi silang dan kontaminasi setelah makanan diolah yang berakibat pada keracunan makanan pada konsumen.

Biofilm dapat dibentuk oleh berbagai jenis bakteri, termasuk bakteri pembusukan dan patogen, pada kondisi yang sesuai. Namun terdapat beberapa bakteri yang memiliki kecenderungan lebih tinggi untuk membentuk biofilm, yaitu *Pseudomonas, Enterobacter, Flavobacterium, Alcaligenes, Staphylococcus* dan *Bacillus* (Genigiorgis, 1995).

Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa sel yang hidup bebas/sel planktonik melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Pada tahap awal pembentukan biofilm, sel-sel planktonik atau sel bebas yang mengambang di medium cair mulai melekat ke permukaan. The Derjaguin and Landau, Verwey dan Overbeek (DLVO) teori menjelaskan bahwa kekuatan interaksi antara permukaan yang bermuatan melalui media cair adalah efek gabungan dari daya tarik Van der Waals dan kekuatan tolakan elektrostatik, dan telah digunakan secara

luas untuk menghitung kondisi pembentukan biofilm dan mikroba yang tertahan dalam biofilm (Russel et al, 1989;. Hermansson, 1999). Permukaan yang bermuatan menarik ion kontra dari larutan dan menolak co-ion untuk membentuk lapisan ganda bermuatan listrik. Interaksi antar lapisan ini diwakili oleh substrat dan bakteri yang menimbulkan dua energi minimal. Pada saat ini pembelahan sel berhenti selama beberapa jam dan pada masa ini terjadi banyak sekali perubahan pada sel planktonik yang menghasilkan transisi sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologik dari sel planktoniknya.

Sejalan dengan pertumbuhannya, sel biofilm menghasilkan EPS yang melekatkan sel pada suatu permukaan dan melekatkan sel satu dengan sel lain untuk membentuk mikrokoloni. Lapisan tunggal (monolayer) ini dikenal juga sebagai *linking film* yaitu substrat yang menjadi tempat sel bakteri melekat dan membentuk mikrokoloni. Jika sel-sel terus melanjutkan pertumbuhannya dan membentuk lapisan yang makin menebal, maka mikroba yang melekat pada lapisan terdalam permukaan mengalami kekurangan zat-zat nutrisi dan terjadi akumulasi metabolit yang bersifat toksik. Untuk mengatasi masalah ini mikrokoloni berkembang menjadi bentuk jamur yang mempunyai saluran atau pori-pori yang dapat dilewati oleh nutrisi atau produk metabolit dari sel.

Dalam perkembangannya sel-sel bakteri dalam matrik akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal ini berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan dalam koordinasi aktivitas biofilm. Aksi dari sinyal ini merupakan suatu proses dari quorum sensing yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan. Komunikasi antarsel penting bagi perkembangan dan pemeliharaan biofilm. Pelekatan suatu sel pada suatu permukaan adalah hasil dari sinyal untuk mengekspresikan gen-gen pembentuk biofilm. Gen-gen ini mengkodekan protein-protein untuk mensitensis sinyal komunikasi antarsel dan memulai pembentukan polisakarida (Sillankorva et al., 2011). Pada bakteri gram negatif seperti *Pseudomonas*

aeruginosa, molekul sinyal yang utama adalah komponen yang disebut homoserin lakton yang berfungsi sebagai agen kemostatik untuk mengumpulkan sel-sel P. aeruginosa yang berdekatan (melalui mekanisme quorum sensing) dan membentuk biofilm (Sillankorva et al., 2011). Ada 5 tahap pembentukan biofilm menurut Monroe, 2007, yaitu:

1. Pelekatan awal: mikroba melekat pada permukaan suatu benda dan dapat diperantarai oleh fili contohnya pada *P.aeruginosa*.
2. Pelekatan permanen: mikrob melekat dengan bantuan eksopolisakarida (EPS).
3. Maturasi I: proses pematangan biofilm tahap awal.
4. Maturasi II: proses pematangan biofilm tahap akhir, mikrob siap untuk menyebar.
5. Dispersi: sebagian bakteri menyebar dan berkolonisasi di tempat lain.

Pemicu pembentukkan biofilm salah satunya adalah kondisi lingkungan yang kurang menguntungkan atau menekan. Contohnya adalah produksi EPS oleh *Escherichia coli* berupa asam dan *P. aeruginosa* saat ketersediaan nutrisi menipis. Selain keterbatasan nutrisi, faktor lain yang memicu pembentukan biofilm adalah quorum sensing, yaitu mekanisme untuk memastikan jumlah sel mencukupi sebelum suatu spesies melakukan respon biologi khusus. Jadi, setiap sel mikroba akan menghasilkan molekul sinyal untuk berkomunikasi dengan sel yang lain, bila jumlah sel mikroba tersebut cukup banyak, maka molekul sinyal tersebut juga cukup banyak untuk memicu pembentukkan biofilm oleh keseluruhan bakteri tersebut. Molekul-molekul sinyal tersebut berbeda untuk tiap jenis mikroba dan memiliki peranannya masing-masing.

Biofilm dalam Sistem Pangan

Dalam industri makanan, kemampuan bakteri untuk menempel pada permukaan yang bersentuhan dengan makanan menjadi sumber kontaminasi bagi patogen yang menimbulkan risiko terhadap kesehatan manusia. Analisis komposisi mikroba biofilm yang terbentuk pada permukaan peralatan pengolahan dalam industri makanan menunjukkan adanya campuran biofilm termasuk bakteri patogen dan pembusuk (Gounadaki et al., 2008; Gutiérrez et al.,

2012a). Mikroorganisme ini dapat mengontaminasi pangan melalui beberapa sumber seperti air, makanan mentah, hewan, dan dapat bertahan di dalam peralatan dalam jangka waktu yang lama. Produk makanan dapat terkontaminasi pada tahap mana pun dalam rantai makanan, meskipun semua protokol pembersihan yang diperlukan telah diterapkan, karena proses desinfeksi dan pembersihan di industri makanan seringkali tidak efektif. Misalnya, beberapa mikroorganisme mampu bertahan hidup setelah prosedur pembersihan pada industri susu (Anand dan Singh, 2013).

Biofilm terutama menyebabkan masalah pada industri susu (Latorre et al., 2010), daging (Giaouris et al., 2014), unggas (Silagyi et al., 2009), makanan laut (Thimothe et al., 2004), dan pengolahan sayuran (Liu et al., 2013). Pada industri makanan laut, bakteri patogen yang paling umum membentuk biofilm adalah *Vibrio* spp., *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella* spp., dan *L. monocytogenes* (Mizan et al., 2015). *Vibrio parahaemolyticus* dapat membentuk biofilm pada berbagai permukaan termasuk kitin tiram, dan proses ini dianggap penting bagi fisiologi mikroorganisme ini (Thompson et al., 2010). Hasil penelitian juga menunjukkan adanya korelasi antara persistensi *Salmonella spp*. dalam industri pengolahan ikan dan kemampuan pembentukan biofilm (Vestby et al., 2009). Bakteri *L. monocytogenes* yang diisolasi dari industri makanan laut dapat membentuk biofilm pada permukaan *stainless steel* (Gudmundsdottir et al., 2006).

Dalam industri produk segar, bakteri seperti *Salmonella, E. coli O157:H7, L. monocytogenes, Shigella, Bacillus cereus, Clostridium perfringens,* dan *Yersinia* masuk ke fasilitas pengolahan dan menempel pada jaringan tanaman serta dapat tumbuh membentuk biofilm (Beuchat, 2002; Da Silva Felicio et al., 2015). Aksesibilitas bahan pembersih terhadap mikroorganisme ini terhambat, tidak hanya oleh keberadaan biofilm, namun juga oleh struktur intrinsik sayuran, sehingga perlu mengoptimalkan metode dekontaminasi untuk memperpanjang umur simpannya (López-Gálvez et al., 2010).

Dalam industri susu, sebagian besar kontaminasi berasal dari pembersihan peralatan yang tidak memadai dan adanya

bakteri patogen seperti *L. monocytogenes* dalam peralatan pemerahan susu ditentukan sebagai penyebab kontaminasi susu dalam tangki curah (Latorre et al., 2010). Selain itu, pembentukan biofilm oleh *L. monocytogenes* dapat didorong oleh kondisi spesifik dalam industri susu seperti yang digunakan dalam pembuatan keju (nilai pH rendah selama fermentasi susu dan peningkatan konsentrasi garam). Beberapa galur menunjukkan peningkatan penempelan terhadap polistiren setelah adaptasi garam, dan paparan asam meningkatkan kelangsungan hidup sel-sel yang menempel pada *stainless steel* (Adriao et al., 2008). Protein susu juga mampu meningkatkan perlekatan *E. coli, L. monocytogenes,* dan *S. aureus* pada *stainless steel* (Barnes et al., 1999). Di sisi lain, anggota genus Bacillus sangat umum ditemukan pada pengolahan susu, dimana pembentukan biofilm dipicu selama lipolisis susu (Pasvolsky et al., 2014).

E. coli O157:H7 merupakan bakteri patogen yang juga terkait dengan kontaminasi pada industry pengolahan daging. Kemampuan bakteri ini untuk menempel pada permukaan yang bersentuhan dengan daging dipengaruhi oleh jenis sisa daging dan suhu. Mikroorganisme ini secara signifikan meningkat jumlahnya selama penyimpanan pada suhu dingin (4°C) (Dourou et al., 2011). *L. monocytogenes* juga diisolasi dari fasilitas pengolahan daging (Peccio et al., 2003; von Laer et al., 2009). Beberapa penelitian menunjukkan kemampuan bakteri ini untuk mengkolonisasi bahan yang digunakan pada permukaan pengolahan makanan (Rodriguez et al., 2008; Hingston et al., 2013), dan bertahan hidup di tempat yang sulit dibersihkan seperti meja dapur dan pisau pemotong (Verran et al., 2008).

Salmonella spp. dan *Campylobacter spp.* merupakan patogen yang paling umum ditemukan di industri pengolahan unggas. Adhesi Salmonella dipengaruhi oleh sifat fisikokimia permukaan yang berbeda. Salmonella mampu tumbuh pada suhu 16°C pada *stainless steel*, sedangkan daya rekatnya terhambat pada kaca (De Oliveira et al., 2014). Hasil penelitian menunjukkan bahwa cairan dari daging ayam meningkatkan pembentukan biofilm *Campylobacter jejuni* pada permukaan kaca, polistiren, dan *stainless steel* (Brown et al.,

2014). Selain itu, kondisi aerobik atau stres (Reuter et al., 2010) dan keberadaan bakteri lain seperti *Enterococcus faecalis* dan *Staphylococcus simulans*, juga ditemukan di lingkungan pengolahan unggas, meningkatkan tingkat pembentukan biofilm yang memungkinkan kelangsungan hidup *C. jejuni* di bawah kondisi lingkungan yang tidak menguntungkan (Teh et al., 2010). Secara keseluruhan, kekhawatiran utama mengenai biofilm adalah resistensinya terhadap disinfektan yang biasa digunakan dalam industri makanan, termasuk senyawa amonium kuaterner seperti benzalkonium klorida (BAC).

Dalam lingkungan pengolahan makanan, terdapat sejumlah kondisi seperti suhu, pH, ketersediaan oksigen dan nutrisi, serta jenis permukaan, yang dapat memodulasi perkembangan biofilm. Sifat permukaan seperti muatan elektrostatik, hidrofobisitas, dan kekasaran mempengaruhi perkembangan biofilm yang dibentuk oleh beberapa spesies bakteri kontaminan pangan. Misalnya, permukaan hidrofilik lebih cepat ditumbuhi koloni *L. monocytogenes* (Chavant et al., 2002), sedangkan *S. aureus* tidak menunjukkan perbedaan pertumbuhan pada permukaan hidrofobik dan hidrofilik (da Silva Meira et al., 2012), sedangkan *Salmonella* memiliki kemampuan yang lebih tinggi untuk melekat pada beberapa bahan yang digunakan pada permukaan yang bersentuhan dengan makanan seperti Teflon, diikuti oleh baja tahan karat, kaca, karet Buna-N, dan poliuretan (Chia et al., 2009). Dalam beberapa kasus, retensi biofilm lebih dipengaruhi oleh kekasaran permukaan dibandingkan komposisi kimianya (Tang et al., 2011). Komponen lain dari lingkungan makanan seperti NaCl juga berkontribusi meningkatkan penempelan *L. monocytogenes* ke permukaan (Jensen et al., 2007), meskipun hal ini juga dipengaruhi oleh suhu dan nutrisi (Moltz dan Martin, 2005), dan bahkan oleh keberadaan bakteri lain di lingkungan pemrosesan makanan (Carpentier dan Chassaing, 2004). Dalam industri pengolahan susu, peralatan sanitasi dan pembersihan yang tidak sesuai dan mikroflora di udara biasanya menjadi sumber utama kontaminan pada susu dan produk olahan susu. Prosedur *Cleaning-in-place* (CIP) umumnya diterapkan pada lini pengolahan susu. Akan tetapi keterbatasan

prosedur CIP adalah adanya akumulasi mikroorganisme pada permukaan peralatan yang menghasilkan pembentukan biofilm. Akumulasi mikroorganisme dalam bentuk biofilm yang sangat persisten dapat menyebabkan kontaminasi *post-processing* mengakibatkan masa simpan produk yang lebih rendah. Perpindahan patogen juga dapat disebabkan dari aerosols yang dihasilkan selama pembersihan permukaan pengolahan pangan. Jika terdapat bakteri patogen maka konsumsi produk yang terkontaminasi sangat beresiko terhadap kesehatan. Akumulasi biofilm juga banyak terdapat di lantai, pipa air limbah, sambungan pipa, lapisan karet, *belt conveyor*, permukaan *stainless steel*, dll. Lapisan Teflon juga berpotensi sebagai tempat untuk pembentukan biofilm.

Pada industri pengolahan makanan dan pengolahan susu, sistem membran UF/RO banyak diterapkan untuk fraksinasi dan pemekatan makanan berwujud cair seperti susu skim dan whey, penjernihan minuman dan jus buah. Dalam proses tersebut permukaan membran yang aktif kontak dengan makanan. Terjadinya adsorpsi meskipun dalam tingkat yang kecil dapat menyumbat pori dan menyebabkan kemacetan filter, fenomena yang demikian disebut fouling, yang mengakibatkan penurunan laju penyerapan cairan dan product yield loss (Cheryan, 1986). Fouling pada membran juga dapat mempengaruhi pembentukan biofilm.

Beberapa hasil penelitian juga telah menunjukkan adanya pelekatan mikroorganisme pada permukaan bahan pangan, misalnya pada permukaan unggas (Notermans and Kampelmacher, 1974; Thomas and McMeekin, 1980; Lillard, 1985, 1986, 1988) dan daging (Butler et al., 1979). Mikroorganisme tersebut tidak hanya terdapat pada saat penyembelihan tetapi juga dapat menyebabkan kontaminasi silang pada karkas yang awalnya tidak terkontaminasi (Anand et al., 1989a). Postmortem aging dari karkas ayam pada suhu 58°C sebelum pembekuan juga mengakibatkan peningkatan jumlah mikroba dengan laju perkembangbiakan yang paling tinggi adalah bakteri koliform dibandingkan dengan *Staphylococcus aureus*, yeast dan kapang (Anand et al., 1989b; Pandey et al., 1989). Penempelan *Listeria monocytogenes* (Chung et al., 1989; Dickson, 1990) and

Pseudomonas fragi (Schwach and Zottola, 1982) juga telah diteliti terjadi pada permukaan daging sapi.

Bakteriofag dan Pengaruhnya pada Biofilm

Bakteriofag adalah virus yang ada secara alami yang menginfeksi bakteri sebagai inang targetnya. Bakteriofag dapat menyatu dengan inangnya dengan menyisipkan materi genetiknya (bakteriofag lisogenik) atau melisis inangnya (bakteriofag litik). Bakteriofag litik memperbanyak diri di dalam inangnya, kemudian melepaskan fag yang baru yang dapat menginfeksi lebih banyak bakteri inangnya. Sering diasumsikan bahwa biofilm resisten terhadap bakteriofag disebabkan oleh impermeabilitas dari matrik biofilm, tetapi meskipun fag berukuran jauh lebih besar daripada senyawa kimia antibiotik, bakteriofag masih jauh lebih kecil daripada bakteri inangnya, dan dapat menginfeksi bakteri di dalam biofilm. Bakteriofag menyerang bakteri dalam biofilm dengan cara yang berbeda dari senyawa kimia antibiotik atau biosida. Destruksi biofilm oleh bakteriofag dapat melalui beberapa tahap sebagai berikut: (Harper et al.,2014)

1. Bakteriofag memperbanyak diri di dalam sel inangnya menyebabkan peningkatan jumlah bakterifag (amplifikasi). Jika sel inang lisis melepaskan bakteriofag turunan yang juga bersifat infektif ke dalam biofilm. Penyebaran bakteriofag dalam biofilm mengurangi bakteri yang memproduksi senyawa EPS, bakteriofag dapat secara progresif menghilangkan biofilm dan menurunkan potensi untuk regenerasi.
2. Bakteriofag dapat membawa atau mengekspresikan enzim depolimerase yang dapat mendegradasi EPS.
3. Bakteriofag dapat menginduksi enzim depolimerase yang mendegradasi EPS dari dalam materi genetik inangnya.

Sel yang persisten dapat diinfeksi oleh bakteriofag, meskipun bakteriofag tidak dapat bereplikasi di dalam sel inangnya, fag dapat tetap berada dalam bakteri tersebut sampai sel tersebut reaktif, selanjutnya menginfeksi sel dan akhirnya menghancurkan sel. Bakteriofag dapat membunuh sel inangnya tanpa bereplikasi, jika terdapat dalam jumlah yang jauh melebihi sel bakteri targetnya, yang disebut dengan "*lysis from without*" (Abedon, 2011),

tetapi hal tersebut jarang terjadi secara alami. Penggunaan bakteriofag dalam jumlah yang lebih rendah dapat membunuh sel inang dengan mereplikasi fag dalam sel inang tersebut yang diikuti dengan lisis selama pelepasan bakteriofag turunan, yang selanjutnya merusak lebih banyak bakteri yang lain. Jika bakteri inang terdapat dalam jumlah yang cukup banyak, sebagai hasil infeksi yang terjadi akibat amplifikasi bakteriofag secara terlokalisir dan menyebabkan infeksi yang berkesinambungan dengan sendirinya, dengan penyebaran lokal dan amplifikasi yang terus berlangsung membentuk suatu siklus. Akan tetapi jika bakteri inang yang ada tidak cukup, maka siklus infeksi tersebut terputus/berhenti. Karena biofilm sangat umum dan terjadi pada tempat dimana jumlah bakteri tinggi, kemungkinan bakteri dalam biofilm dapat menjadi target yang efektif oleh bakteriofag merupakan adaptasi evolusioner untuk menggunakan sumber daya yang kaya tersebut. Untuk mekanisme yang mereka gunakan kemungkinan berdasarkan keperluan fag untuk mengenali polisakarida kapsular bakteri selama infeksi yang normal. Terjadinya penyebaran infeksi di dalam biofilm dengan adanya bakteri yang lisis sebagai unsur kunci, disebut sebagai 'penetrasi aktif' (Abedon et al., 2010). Telah diketahui bahwa materi genetik bakteriofag mengandung gen yang menyandi enzim yang mampu memecah unsur dari matrik biofilm (Sillankorva et al, 2011; Abedon et al., 2011; Yan et al, 2013). Dalam beberapa kasus selain menghasilkan enzim terlarut yang menyerang dinding sel bakteri inang selama terlepas dari sel inang, bakteriofag juga memiliki potensi untuk mendegradasi EPS biofilm ketika lepas dari sel inang yang lisis. Sel-sel tersebut juga melepaskan DNA yang dapat menyumbangkan pada matrik biofilm, tetapi juga dapat melepaskan enzim DNase yang terdapat dalam sel inang sebagai bagian dari replikasi normal. Sebagai tambahan, beberapa bakteriofag seperti T4 dan HK620 yang menyerang *Escherichia coli* memiliki enzim yang terdapat pada ekor dari partikel virus yang membantu menembus dinding sel bakteri. Sementara secara teoritis enzim tersebut berperan dalam mendegradasi matrik biofilm, namun enzim tersebut seringkali tersembunyi sampai ekor dikonfigurasi ulang selama infeksi dan dengan demikian memiliki aktivitas yang

sangat terlokalisir (Abedon et al., 2011; Yan et al, 2013). Persyaratan untuk protein ini sangat akurat karena harus sesuai dan berfungsi di dalam struktur virus. Adanya enzim tersebut di dalam ekor fag, merupakan kelengkapan struktur yang umum terdapat dalam bakteriofag infektif yang berekor (Yan et al. 2013). Pada model bakteriofag tersebut, ekor fag mengenali dan memecah polisakarida kapsul sehingga ekor dapat kontak dengan membran sel inang dan melalui ekor tersebut fag menginjeksikan materi genetiknya.

Protein polisakarida depolimerase merupakan komponen yang umum terdapat pada struktur ekor bakteriofag dan beberapa protein spike pada ekor memiliki aktivitas endoglikosidase, yang menghidrolisa polisakarida reseptornya (Yan et al. 2013). Aktivitas tersebut disandi oleh gen. Bakteriofag dapat menginduksi ekspresi enzim depolimerase dalam bakteri inangnya (Barterl, 1969). Bakteriofag GH4 yang mengekspresikan aktivitas alginase dapat terlihat pada pengujian secara in vitro.

Pada awalnya diduga bahwa alginase disandi dalam materi genetik bakteriofag (Sharp et al, 2006) tetapi dari hasil sekuensing tidak terlihat adanya gen tersebut yang menunjukkan bahwa alginase diinduksi dari dalam sel inang. Diduga bahwa hal tersebut dapat merupakan metode induksi bakteriofag untuk membuat matrik biofilm supaya lebih porus, sehingga membantu bakteriofag turunannya untuk menginfeksi inang, atau merupakan respon dari bakteri yang terinfeksi dalam memfasilitasi diri untuk keluar dari fokus yang terinfeksi di dalam biofilm.

Pearl et al. (2008) melaporkan bahwa bakteriofag yang memiliki kemampuan litik mampu menginfeksi sel yang persisten dan dapat tetap tinggal dalam sel tersebut sampai mereka aktif kembali selanjutnya memulai fase produktif untuk menginfeksi sel. Analisis kuantitatif dari ekspresi gen menyatakan bahwa ekspresi gen litik ditekan pada bakteri yang persisten, akan tetapi jika sel persisten tersebut berubah ke pertumbuhan normal, fag infektif akan menyebabkan proses ekspresi gen yang menyebabkan sel lisis. Mekanisme tersebut merupakan elemen yang signifikan bagi bakteriofag untuk mendestruksi biofilm. Penelitian yang mendukung hal tersebut juga dilakukan pada biakan *Pseudomonas*

aeruginosa yang berada pada fase stasioner, yang dimasukkan dalam matrik kolagen sebagai model biofilm untuk infeksi pada luka. Dalam system tersebut tidak ada bakteri yang terbunuh meskipun inkubasi diperpanjang selama 5 hari, sampai matrik rusak dan bakteri tumbuh kembali baru terjadi pembunuhan sel bakteri oleh bakteriofag (Monk et al, 2009).

Enzim dari Bakteriofag yang Mendepolimerasi EPS Biofilm

Terdapat sejumlah besar enzim yang mampu mendepolimerase komponen EPS biofilm bakteri. Pada bakteriofag enzim-enzim tersebut meliputi enzim yang dihasilkan untuk melepaskan fag dari sel inang (meliputi enzim endopeptidase) dan protein spike pada ekor fag yang membantu dalam proses menginfeksi inang. Meskipun enzim-enzim tersebut terbatas pada aktivitas yang sangat terlokalisir didalam partikel virus, namun enzim tersebut dikeluarkan dari sel yang lisis dalam bentuk aktif yang dapat mempengaruhi matrik biofilm (Cornelisse et al., 2011). Spesies bakteri yang berbeda memproduksi komponen EPS yang berlainan, sehingga aktivitas depolimerase menyerang polisakarida yang dihasilkan oleh satu spesies tidak dapat bekerja pada spesies yang lain. Meskipun aktivitas enzim depolimerase sangat spesifik, akan tetapi jika dibandingkan dengan aktivitas bakteriofag penghasilnya ektivitas enzim tersebut lebih luas sebab keragaman dan kompleksitas EPS masih lebih rendah dibandingkan sel bakteri yang menjadi inang (Son et al., 2010). Jika enzim depolimerase dihasilkan dan dikeluarkan, tampak area bening disekitar plak bakteriofag yang terbentuk pada biakan bakteri yang tumbuh dalam lempeng agar cawan, yang menunjukkan bahwa polisakarida bakteri telah rusak. Gutiérrez et al. (2012) menggunakan pendekatan ini untuk mendeteksi aktivitas enzim pada dua bakteriofag yang menginfeksi *Staphylococcus epidermidis*, dan adanya enzim tersebut dikonfirmasi dari hasil sekuensing yang menunjukkan adanya gen penyandi pektin lyase. Sementara Glonti et al. (2010), mengidentifikasi area bening dalam biakan bakteriofag yang menginfeksi Pseudomonas aeruginosa dan berhasil memurnikan protein depolymerase dari

bakteriofag tersebut menggunakan electrophoresis. Polisakarida depolimerase dari bakteriofag telah diklasifikasi oleh Yan et al., (2013), sebagai endorhamnosidase, alginat lyase, endosialidase dan hyaluronidase (glikosid hidrolase). Selain itu juga ada enzim lain yang berkaitan, misalnya Broudy et al. (2002), mengidentifikasi sekresi enzim DNase yang dihasilkan bakteriofag yang menginfeksi *Streptococcus pyogenes*.

Pertumbuhan Bakteriofag dalam Biofilm

Data hasil penelitian menunjukkan bahwa bakteriofag dapat tumbuh baik dalam biofilm Pseudomonas aeruginosa (Sharp et al., 2003), pada awal tahap pertumbuhan biofilm. Pada penelitian yang menggunakan biofilm yang berumur dua hari, dapat diketahui bahwa 17 galur Pseudomonas aeruginosa yang tidak sensitif terhadap bakteriofag pada uji dengan metode plaque assay (menggunakan bakteri inang dalam keadaan bebas/planktonik), jika diuji dalam model biofilm 8 dari 17 galur tersebut dapat mendukung pertumbuhan bakteriofag dan mendukung aktivitas fag menginfeksi bakteri tersebut. Pseudomonas pada tahap awal pembentukan biofilm seperti yang digunakan dalam penelitian tersebut resisten terhadap antibiotik bahkan pada konsentrasi 100 kali lipat yang umumnya dapat membunuh bakteri tersebut dalam keadaan bebas (sel planktonik). Dari hasil penelitian tersebut tampak bahwa bakteriofag mampu membunuh bakteri yang berada dalam keadaan tidak dapat dibunuh dengan antibiotik (Ceri et al., 1999).

Pada penelitian yang menunjukkan potensi bakteriofag untuk mengontrol biofilm hasil dari penelitian Hanlon et al. (2001), terbukti bahwa bakteriofag *Pseudomonas aeruginosa* dapat menghancurkan bakteri dalam biofilm yang sudah matang (berumur 20 hari) dan dapat berdifusi melalui model biofilm, dengan studi menggunakan gel alginate yang paling pekat (12%), meskipun difusi terjadi lebih lambat dibandingkan dengan gel alginat yang lebih tipis. Dalam penelitian tersebut juga diamati bahwa bakteriofag yang dapat mendegradasi polimer alginat.

Sillankorva et al. (2011) menggunakan bakteriofag yang menginfeksi *Pseudomonas fluorescens* dan *Staphylococcus lentus* dan menunjukkan adanya reduksi yang efektif

terhadap biofilm campuran dari kedua spesies bakteri inang tersebut. Dari data sequencing terhadap kedua bakteriofag tersebut diketahui bahwa tidak ada yang memiliki gen penyandi polisakarida depolimerase (meskipun bakteriofag *Pseudomonas fluorescens* memiliki gen yang menyandi endopeptidase). Hasil penelitian yang sama diperoleh oleh Doolittle et al. (1996) yang menunjukkan bahwa bakteriofag T4 yang menginfeksi *Escherichia coli* dapat menyebar dengan baik melalui biofilm, meskipun tidak memiliki gen yang menyandi polisakarida depolimerase, namun memiliki protein tailspike yang sangat terbatas, yang hanya keluar dari ekor bakteriofag selama menembus sel inang. Akan tetapi dari penelitian tersebut bakteriofag E79 yang menginfeksi *Pseudomonas aeruginosa* kurang efektif dalam menembus biofilm daripada fag T4. Dari penelitian-penelitian tersebut terlihat bahwa bakteriofag secara alami dapat menembus biofilm meskipun tidak menghasilkan enzim polisakarida depolimerase, tetapi tidak semua fag yang demikian dapat menginfeksi dengan efisien dalam biofilm. Tait et al. (2002), melaporkan bahwa campuran dari tiga bakteriofag dapat mengeliminasi dengan sempurna biofilm yang dibentuk spesies tunggal, tetapi jika dalam biofilm tersebut terdapat spesies bakteri yang tidak sensitif maka aktivitasnya menjadi tidak efektif. Hasil penelitan Kay et al. (2011), juga menunjukkan bahwa campuran biofilm dapat menurunkan efisiensi aktivitas bakteriofag. Sillankorva et al. (2011), menunjukkan bahwa biofilm yang sudah matang (berumur tujuh hari) dapat secara efektif dihancurkan oleh bakteriofag. Hal tersebut menunjukkan bahwa bakteriofag dapat dan sering mengekspresikan enzim yang mampu menghancurkan biofilm, tetapi komponen tersebut tidak selalu menjadi faktor utama dalam melakukan infeksi pada biofilm.

Peningkatan Aktivitas Bakteriofag

Pada awalnya, salah satu perhatian utama dalam pengembangan bakteriofag sebagai biokontrol secara komersial adalah adanya opini bahwa tidak mungkin mematenkan bakteriofag alami, namun ternyata hal tersebut tidak benar karena terdapat sejumlah paten yang diberikan pada beberapa kelompok tentang

bakteriofag baik berkaitan dengan novelti maupun aktivitasnya (Sharp et al., 2006; Kay et al., 2011; Sulakvelidze, 2008). Sejumlah perusahaan meningkatkan efek bakteriofag dengan melakukan rekayasa genetika. Salah satunya dengan menambahkan faktor untuk meningkatkan virulensi pada materi genetik bakteriofag. Lu and Collins (2007), menyisipkan gen yang menyandi Dispersin B (glikosida hidrolase yang diketahui memiliki aktivitas merusak biofilm) ke dalam bakteriofag T7 yang menginfeksi Escherichia coli. Penyisipan gen tersebut menghasilkan ekspresi enzim yang tinggi selama infeksi, yang dikeluarkan ke dalam matrik ekstraseluler dari sel yang lisis. Adanya modifikasi genetik tersebut meningkatkan kemampuan bakteriofag dibandingkan fag T7 induknya. Bakteriofag T7 sebenarnya juga hasil rekombinan yang mengandung gen dari bakteriofag T3 untuk memberikan kemampuan bereplikasi dalam biofilm. Bakteriofag T7 secara alami menghasilkan enzim endopeptidase tetapi tidak memproduksi polisakarida depolimerase, oleh karena itu *E. coli* yang memiliki kapsul polisakarida noemalnya resisten terhadap infeksi oleh fag T7, tetapi bakteriofag T4 dapat megninfeksi dan bereplikasi di dalam biofilm *E. coli* dan merusak morfologi biofilm dengan membunuh sel bakteri (Lu and Collins, 2007). Modifikasi tersebut dilakukan dalam pengembangan bakteriofag secara komersial yang ditujukan untuk menghilangkan biofilm dalam proses industrial.

Pendekatan lain yang dilakukan untuk meningkatkan efektivitas penggunaan bakteriofag adalah dengan memadukan bakteriofag dengan agen pendispersi biofilm seperti alginate liase atau enzim DNase (misalnya produk komersial *Pulmozyme*).

Bakteriofag untuk Mengontrol Biofilm

Bakteriofag litik telah digunakan sebagai agen biokontrol terhadap biofilm dari mikroorganisme tertentu, seperti *C. sakazakii* (Endersen et al. 2017), *E. coli* O157:H7 (Sadekuzzaman et al., 2017), *L. monocytogenes* (Soni and Nannapaneni, 2015), *P. aeruginosa* (Shafique et al., 2017), *Salmonella spp*. (Islam et al., 2019; Sadekuzzaman et al., 2018), dan *S. aureus* (Gutiérrez et al., 2015a; Gutiérrez et al., 2015b). Moye et al. (2018) mengulas secara

komprehensif aplikasi bakteriofag untuk produksi dan pengolahan makanan.

Bakteriofag litik KH1 (7,7 log pfu/ml) diteliti aplikasinya pada permukaan *stainless steel* yang mengandung biofilm *E. coli* O157:H7 (2,6 log cfu), setelah pemberian perlakuan selama 4 hari pada suhu 4° C terjadi pengurangan mikro-organisme sebesar 1,2 unit log (Sharma et. al., 2005). Biofilm *E. coli* O157:H7 yang telah dibentuk sebelumnya pada bahan yang biasanya digunakan pada permukaanuntuk pengolahan makanan (*stainless steel*, ubin keramik, dan polietilen densitas tinggi), mengalami penurunan hingga tingkat yang tidak terdeteksi setelah diaplikasikan campuran fag bernama BEC8 pada 23°selama 1 jam (Viazis et al., 2011). Penggunaan campuran fag untuk menghilangkan biofilm yang terbentuk pada pisau yang digunakan untuk memanen bayam juga menyebabkan pengurangan 4,5 unit log sel hidup *E. coli* O157:H7 dicapai setelah 2 jam perlakuan pemberian fag (Patel et al., 2011). Seperti yang dilaporkan sebelumnya, kombinasi bakteriofag T4 dan sefotaksim secara signifikan meningkatkan pemberantasan biofilm *E. coli* bila dibandingkan dengan pengobatan hanya dengan fag (Ryan et al., 2012).

Protein fag litik juga merupakan alternatif untuk menghilangkan biofilm bakteri di lingkungan yang berhubungan dengan makanan. Endolisin dari fag phi11 (10 μg/sumur) mampu menghilangkan biofilm yang dibentuk oleh strain *S. aureus* pada permukaan polistiren setelah 2 jam pada suhu 37°C (Sass dan Bierbaum, 2007). Demikian pula, endolisin SAL-2 dari bakteriofag SAP-2 menghilangkan biofilm *S. aureus* menggunakan 15 μg/sumur (Son et al., 2010). Gutierrez et. al. (2014), menunjukkan bahwa endolysin LysH5 (0,15 μM) mampu menghilangkan biofilm staphylococcus setelah perlakuan selama 12 jam pada suhu 37°C dan bahkan melisiskan sel persisten. Endolisin yang direkayasa dengan penghapusan atau penghilangan domain, juga telah berhasil digunakan sebagai agen anti-biofilm. Misalnya, peptidase CHAPk (31,25 μg/ml), yang berasal dari endolisin staphylococcus LysK, mampu mencegah pembentukan biofilm. Protein ini juga menghilangkan biofilm staphylococcus setelah perlakuan selama 4

jam pada suhu 37°C (Fenton et al., 2013). Protein ini mengandung domain katalitik endolysin Ply187 dan domain pengikat dinding sel lisin phiNM3. Pada biofilm yang dibentuk oleh bakteri Gram-negatif, untuk penghilangan struktur tersebut dengan menggunakan endolisin memerlukan komponen tambahan untuk menghancurkan membran luar. Biofilm dari *S. enterica* serovar Typhimurium yang diberi perlakuan endolisin Lys68 (2 μM), berkurang 1 log unit sel-sel dalam biofilm yang telah dibentuk sebelumnya setelah 2 jam inkubasi dengan adanya permeabilizer membran luar (Oliveira et al., 2014). Telah diteliti dua endolisin termostabil Lys68 dari Salmonella phage phi68 (Oliveira et al., 2014) dan Ph2119 dari bakteriofag Ph2119 yang menginfeksi *Thermus scotoductus* MAT2119 (Plotka et al., 2014). Stabilitas termostabilitas ini mendukung potensi penggunaan enzim turunan fag ini sebagai disinfektan. Selain itu, bakteriofag dapat berguna untuk mengembangkan bahan kemasan antimikroba khusus untuk digunakan dalam industri makanan (Han et al., 2014).

Bakteriofag litik dapat menyebabkan biofilm yang sudah matang lebih mudah untuk diterapi dengan anti biotik. Berdasarkan hal tersebut maka kombinasi atau penggunaan secara berurutan dari antibiotic dan bakteriofag memiliki potensi diaplikasikan pada terapi untuk melawan bakteri. Yilmaz et al. (2013), telah meneliti bahwa terdapat peningkatan efek jika bakteriofag dan antibiotic digunakan secara kombinasi untuk melawan biofilm *Staphylococcus aureus*. Kombinasi lain juga mungkin dilakukan seperti dalam penelitian Sharp et al. (2006), yang mengkombinasikan polisakarida lyase dan enzim DNase untuk mendegradasi matrik biofilm, bersamaan dengan pemberian bakteriofag.

Penggunaan bakteriofag akan lebih efektif jika digunakan sebagai kombinasi dengan prosedur lain. Menurut Sillankorva et al. (2011) meskipun fag dapat menurunkan populasi bakteri dalam biofilm, tetapi jika hanya digunakan agen biologis tersebut tidak cukup efisien diaplikasikan untuk mengontrol industrial biofilm. Umumnya digunakan prosedur pencucian untuk menghilangkan tidak hanya mikroorganisme tetapi juga semua materi

yang tidak dikehendaki (misalnya benda asing, senyawa kimia, tanah, dll), dan bakteriofag tidak dapat menggantikan fungsi tersebut. Akan tetapi fag dapat berfungsi seperti biosida dan sanitizer, dan digunakan setelah proses pencucian mayor untuk membunuh bakteri tertentu pada biofilm yang tertinggal. Gutiérrez et al. (2016) mengulas secara komprehensif tentang bakteriofag untuk menghilangkan biofilm dari bakteri dalam industri pangan.

Hasil penelitian Arachchi et al. (2013), menunjukkan pembersihan biofilm *Listeria monocytogenes* dari permukaan *stainless steel* yang efisien oleh campuran tiga bakteriofag, meskipun jika terdapat kontaminasi dengan protein ikan. Akan tetapi dari penelitian tersebut juga diketahui bahwa proses pembersihan tersebut lebih dipercepat dengan adanya pembersihan secara mekanis, hasil tersebut menunjukkan bahwa fag lebih efektif pada sel biofilm yang sudah terlepas dari permukaan. Oleh karena itu untuk terapi biofilm dengan jangka waktu pendek harus dipertimbangkan adanya perusakan sel biofilm terlebih dahulu sebelum aplikasi bakteriofag. Zhang dan Hu (2013), mengamati adanya efek peningkatan pada filter jika digunakan kombinasi bakteriofag dengan biosida (klorin).

Kesimpulan

Bakteriofag dapat menjadi alternatif solusi untuk menghilangkan biofilm dalam industri pangan. Bakteriofag memiliki sejumlah sifat yang menyebabkan biofilm rentan terhadap serangannya yaitu mampu menghasilkan (atau mampu menginduksi) enzim yang mendegradasi matrik ekstraseluler, dapat menginfeksi sel yang inaktif dalam biofilm tetapi aktif kembali jika sel bakteri tersebut aktif bermetabolisme, dan mampu mendukung replikasi bakteriofag dengan lebih baik dibandingkan dengan sel bebasnya. Bakteriofag dapat diaplikasikan dalam sistem pangan untuk menghancurkan biofilm dari bakteri patogen sehingga dapat meningkatkan keamanan pangan.

DAFTAR PUSTAKA

Abedon ST, Thomas-Abedon C. 2010. Phage therapy pharmacology. Curr. Pharm. Biotechnol. 11: 28–47.

Abedon ST. 2011. Lysis from without. Bacteriophage 1: 46–49.

Adriao, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P. 2008. Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. Int. J. Food Microbiol. 123: 142–150. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.016

Anand S, Singh D. 2013. Resistance of the constitutive microflora of biofilms formed on whey reverse-osmosis membranes to individual cleaning steps of a typical clean-in-place protocol. J. Dairy Sci. 96, 6213–6222. doi: 10.3168/jds.2013-7012

Arachchi GJG, Cridge AG, Dias-Wanigasekera BM, Cruz CD, McIntyre L, Liu R, Flint SH, Mutukumira AN. 2013. Effectiveness of phages in the decontamination of *Listeria monocytogenes* adhered to clean stainless steel, stainless steel coated with fish protein, and as a biofilm. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 40: 1105–1116.

Barnes LM, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AH. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. Appl. Environ. Microbiol. 65; 4543–4548

Bartell PF, Orr TE. 1969. Origin of polysaccharide depolymerase associated with bacteriophage infection. J. Virol. 3: 290–296.

Beuchat LR. 2002. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Microbes Infect. 4; 413–423. doi: 10.1016/S1286-4579(02)01555-1

Broudy TA, Pancholi V, Fischetti VA. 2002. The in vitro Interaction of *Streptococcus pyogenes* with human pharyngeal cells induces a phage-encoded extracellular DNase. Infect. Immun. 70: 2805–2811.

Brown HL, Reuter M, Salt LJ, Cross KL, Betts RP, van Vliet AH. 2014. Chicken juice enhances surface attachment and biofilm formation of *Campylobacter jejuni*. Appl. Environ. Microbiol. 80: 7053–7060. doi: 10.1128/AEM.02614-14

Carpentier B, Chassaing D.2004. Interactions in biofilms between *Listeria monocytogenes* and resident microorganisms from food industry premises. Int. J. Food Microbiol. 97: 111–122.

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Buret A. 1999. The Calgary biofilm device: New technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. J. Clin. Microbiol. 37: 1771–1776.

Chavant P, Martinie B, Meylheuc T, Bellon-Fontaine MN, Hebraud M. 2002. *Listeria monocytogenes* LO28: surface physicochemical properties and ability to form biofilms at different temperatures and growth phases. Appl. Environ. Microbiol. 68: 728–737.

Chia TW, Goulter RM, McMeekin T, Dykes GA, Fegan N. 2009. Attachment of different Salmonella serovars to materials commonly used in a poultry processing plant. Food Microbiol. 26: 853–859.

Cornelissen A, Ceyssens PJ, T'Syen J, van Praet H, Noben JP, Shaburova OV, Krylov VN, Volckaert G, Lavigne R. 2011. The T7-related *Pseudomonas putida* phage f15 displays virion-associated biofilm degradation properties. PLoS One 6: e18597.

Criado MT, Suarez B, Ferreiros CM. 1994. The importance of bacterial adhesion in the dairy industry. Food Technol. 48: 123–126.

da Silva Meira QG, de Medeiros Barbosa I, Alves Aguiar Athayde AJ, de Siqueira-Júnior JP, de Souza EL. 2012. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by Staphylococcus aureus from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. Food Control. 25: 469–475.

da Silva Felicio MT, Hald T, Liebana E, Allende A, Hugas M, Nguyen-The C, et al. 2015. Risk ranking of pathogens in ready-to-eat unprocessed foods of non-animal origin (FoNAO) in the EU: initial evaluation using outbreak data (2007-2011). Int. J. Food Microbiol. 195: 9–19. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.11.005De Oliveira et al., 2014.

Doolittle MM, Cooney JJ, Caldwell DE. 1996. Tracing the interaction of bacteriophage with bacterial biofilms using fluorescent and chromogenic probes. J. Ind. Microbiol. 16: 331–341.

Dourou D, Beauchamp CS, Yoon Y, Geornaras I, Belk KE, Smith GC, et al. 2011. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. Int. J. Food Microbiol. 149: 262–268. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004

Endersen L, Buttimer C, Nevin E, Coffey A, Neve H, Oliveira H, Lavigne R, O'Mahony J. 2017. Investigating the Biocontrol and Anti-Biofilm Potential of a Three Phage Cocktail Against *Cronobacter sakazakii* in Different Brands of Infant Formula. Int. J. Food Microbiol. 253: 1–11.

Fenton M, Keary R, McAuliffe O, Ross RP, O'Mahony J, Coffey A. 2013. Bacteriophage-derived peptidase CHAP(K) eliminates and prevents staphylococcal biofilms. Int. J. Microbiol. 2013: 625341. doi: 10.1155/2013/625341

Flemming HC. 2008. Biofilms. In The Encyclopedia of Life Sciences; John Wiley and Sons: Chichester, UK.

Genigeorgis C. 1995. Biofilm: Their signifince to cleaning in the meat sector. In: BURT,S.A.AND BAUER, F. (Eds), New Challenges in Meat Hygiene: Specific problems in cleaning and disinfection, Ecceamst, European Consortium for Continuing Education in Advanced Meat Science and Technology. pp. 29-47.

Giaouris E, Heir E, Hebraud M, Chorianopoulos N, Langsrud S, Moretro T, et al. 2014. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. Meat Sci. 97: 298–309. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.05.023

Glonti T, Chanishvili N, Taylor PW. 2010. Bacteriophage-derived enzyme that depolymerizes the alginic acid capsule associated with cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Microbiol. 108: 695–702.

Gounadaki AS, Skandamis PN, Drosinos EH, Nychas GJ. 2008. Microbial ecology of food contact surfaces and products of small-scale facilities producing traditional sausages.

Food Microbiol. 25: 313–323. doi: 10.1016/j.fm.2007.10.001

Gudmundsdottir S, Gudbjornsdottir B, Einarsson H, Kristinsson KG, Kristjansson M. 2006. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. J. Food Prot. 69: 1304–1311.

Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, García P. 2012. Genomic characterization of two *Staphylococcus epidermidis* bacteriophages with anti-biofilm potential. BMC Genomics 13: e228.

Gutiérrez D, Ruas-Madiedo P, Martínez B, Rodríguez A, García P. 2014. Effective removal of staphylococcal biofilms by the endolysin LysH5. PLoS ONE 9:e107307. doi: 10.1371/journal.pone.0107307

Gutiérrez D, Briers Y, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, et al. 2015a. Role of the pre-neck appendage protein (Dpo7) from phage vB_SepiS-phiIPLA7 as an anti-biofilm agent in staphylococcal Species. Front. Microbiol. 6:1315. doi: 10.3389/fmicb.2015.01315

Gutiérrez D, Vandenheuvel D, Martínez B, Rodríguez A, Lavigne R, García P. 2015b. Two phages, phiIPLA-RODI and phiIPLA-C1C, lyse mono and dual-species Staphylococcal biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 81: 3336–3348. doi: 10.1128/AEM.03560-14

Gutiérrez D, Rodríguez-Rubio L, Martínez B, Rodríguez A, García P. 2016. Bacteriophages as Weapons Against Bacterial Biofilms in the Food Industry. Front. Microbiol., vol. 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00825

Han JH, Wang MS, Das J, Sudheendra L, Vonasek E, Nitin N, et al. 2014. Capture and detection of T7 bacteriophages on a nanostructured interface. ACS Appl. Mater Interf. 6: 4758–4765. doi: 10.1021/am500655r

Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2746–2753.

Harper DR, Parracho HMRT, Walker J, Sharp R, Hughes G, Werthén M, Lehman M, Morales S. 2014. Bacteriophages and Biofilms. Antibiotics 3: 270-284.

Hingston PA, Stea EC, Knochel S, Hansen T. 2013. Role of initial contamination levels, biofilm maturity and presence of salt and fat on desiccation survival of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces. Food Microbiol. 36: 46–56. doi: 10.1016/j.fm.2013.04.011

Islam MZ, Fokine A, Mahalingam M, Zhang Z, Garcia-Doval C, van Raaij MJ., et al. 2019. Molecular anatomy of the receptor binding module of a bacteriophage long tail fiber. PLoS Pathog. 15:e1008193. doi: 10.1371/journal.ppat.1008193

Kay MK, Erwin TC, McLean RJ, Aron GM. 2011. Bacteriophage ecology in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* mixed-biofilm communities. Appl. Environ. Microbiol. 77: 821–829.

Jensen A, Larsen MH, Ingmer H, Vogel BF, Gram L. 2007. Sodium chloride enhances adherence and aggregation and strain variation influences invasiveness of *Listeria*

monocytogenes strains. J. Food Prot. 70: 592–599.

Latorre AA, Van Kessel JS, Karns JS, Zurakowski MJ, Pradhan AK, Boor KJ, et al. 2010. Biofilm in milking equipment on a dairy farm as a potential source of bulk tank milk contamination with *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Sci. 93: 2792–2802. doi: 10.3168/jds.2009-2717

Leiman PG, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Mesyanzhinov VV, Rossman MG. 2004. Three-dimensional rearrangement of proteins in the tail of bacteriophage T4 on infection of its host. Cell 118: 419–429.

Liu NT, Lefcourt AM, Nou X, Shelton DR, Zhang G, Lo YM. 2013. Native microflora in fresh-cut produce processing plants and their potentials for biofilm formation. J. Food Prot. 76: 827–832. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-433

López-Gálvez F, Gil MI, Truchado P, Selma MV, Allende A. 2010. Cross-contamination of fresh-cut lettuce after a short-term exposure during pre-washing cannot be controlled after subsequent washing with chlorine dioxide or sodium hypochlorite. Food Microbiol. 27: 199–204. doi: 10.1016/j.fm.2009.09.009

Lu TK, Collins JJ. 2007. Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. Proc. Natl. Acad. Sci. 27: 11197–11202.

Mizan MF, Jahid IK, Ha SD. 2015. Microbial biofilms in seafood: a food-hygiene challenge. Food Microbiol. 49: 41–55. doi: 10.1016/j.fm.2015.01.009

Moltz AG, Martin SE. 2005. Formation of biofilms by Listeria monocytogenes under various growth conditions. J. Food Prot. 68: 92–97.

Monk A, Parracho H, Cass J, McConville M, Harper D, Werthén M, Erikson K. 2009. Bacteriophages and biofilms: A waiting game? In Proceedings of the 18th Biennial Evergreen International Phage Biology Meeting, Olympia, WA, USA, 9–14 August 2009.

Moye ZD, Woolston J, Sulakvelidze A. 2018. Bacteriophage Applications for Food Production and Processing. Viruses. 10(4):205.

Oliveira H, Thiagarajan V, Walmagh M, Sillankorva S, Lavigne R, Neves-Petersen MT, et al. 2014. A thermostable Salmonella phage endolysin, Lys68, with broad bactericidal properties against gram-negative pathogens in presence of weak acids. PLoS ONE 9:e108376. doi: 10.1371/journal.pone.0108376

O'Toole GA, Kotler R. 1998. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas flourescences WCS 365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways: a genetic analysis. Molecular Microbiology. 28(3): 449-461.

O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Review on Microbiology 54: 49-79.

Pasvolsky R, Zakin V, Ostrova I, Shemesh M. 2014. Butyric acid released during milk lipolysis triggers biofilm formation of Bacillus species. Int. J. Food Microbiol. 181: 19–27. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.013

Patel J, Sharma M, Millner P, Calaway T, Singh M. 2011. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 attached to spinach harvester blade using bacteriophage. Foodborne

Pathog. Dis. 8: 541–546. doi: 10.1089/fpd.2010.0734

Pearl S, Gabay C, Kishony R, Oppenheim A, Balaban NQ. 2008. Nongenetic Individuality in the host-phage interaction. PLoS Biol. 5: e120.

Peccio A, Autio T, Korkeala H, Rosmini R, Trevisani M. 2003. *Listeria monocytogenes* occurrence and characterization in meat-producing plants. Lett. Appl. Microbiol. 37: 234–238. doi: 10.1046/j.1472-765X.2003.01384.x.

Plotka M, Kaczorowska AK, Stefanska A, Morzywolek A, Fridjonsson OH, Dunin-Horkawicz S., et al. 2014. Novel highly thermostable endolysin from *Thermus scotoductus* MAT2119 bacteriophage Ph2119 with amino acid sequence similarity to eukaryotic peptidoglycan recognition proteins. Appl. Environ. Microbiol. 80: 886–895. doi: 10.1128/AEM.03074-13

Reuter M, Mallett, A, Pearson BM, van Vliet AH. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. Appl. Environ. Microbiol. 76: 2122–2128. doi: 10.1128/AEM.01878-09

Rodriguez A, Autio WR, McLandsborough LA. 2008. Effect of surface roughness and stainless steel finish on *Listeria monocytogenes* attachment and biofilm formation. J. Food Prot. 71: 170–175.

Ryan EM, Alkawareek MY, Donnelly RF, Gilmore BF. 2012. Synergistic phage-antibiotic combinations for the control of *Escherichia coli* biofilms in vitro. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 65: 395–398. doi: 10.1111/j.1574-695X.2012.00977.xSilagyi K, Kim SH, Lo YM, Wei CI. 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. Food Microbiol. 26: 514–519. doi: 10.1016/j.fm.2009.03.004

Sadekuzzaman M, Yang S, Mizan MFR. 2017. Reduction of Escherichia coli O157:H7 in Biofilms Using Bacteriophage BPECO 19. J. Food Sci. 82(6).

Sass P, Bierbaum G. 2007. Lytic activity of recombinant bacteriophage ϕ11 and ϕ12 endolysins on whole cells and biofilms of *Staphylococcus aureus*. Appl. Environ. Microbiol. 73: 347–352. doi: 10.1128/AEM.01616-06

Sharma M, Ryu JH, Beuchat LR. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in biofilm on stainless steel by treatment with an alkaline cleaner and a bacteriophage. J. Appl. Microbiol: 99, 449–459. doi: 10.1111/j.1365-2672.2005.02659.x

Sharp R, Walker JT, Riley P, Budge C, West K, Hughes G. 2003. Bacteriophage therapy to control biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patient with cystic fibrosis. In Biofilm Communities—Order from Chaos; McBain, A., Allison, D., Brading, M., Rickard, A. Verran, J., Walker, J., Eds.; Bioline: Cardiff, UK, pp. 237–245.

Sharp R, Hughes G, Hart A, Walker JT. 2006. Bacteriophage for the treatment of bacterial biofilms. U.S. Patent 7758856 B2,

Sillankorva S, Neubauer P, Azaredo J. 2011. Use of Bacteriophages to Control Biofilms; LAP Lambert Academic Publishing: Saarbrücken, Germany.

Son JS, Lee SJ, Jun SY, Yoon SJ, Kang SH, Paik HR, Kang JO, Choi, YJ. 2010. Antibacterial and biofilm removal activity of a podoviridae *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP-2 and a derived recombinant cell-wall-degrading enzyme. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86: 1439–1449.

Soni, K. A., and Nannapaneni, R. 2010. Removal of *Listeria monocytogenes* biofilms with bacteriophage P100. J. Food Prot. 73: 1519–1524.

Soothill JS, Hawkins C, Harper DR. 2011. Bacteriophage-containing therapeutic agents. U.S. Patent 8105579 B2.

Sulakvelidze A, Pasternack GR. 2008. *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage and uses thereof. U.S. Patent 7622293 B2,

Tait K, Skillman LC, Sutherland IW. 2002. The efficacy of bacteriophage as a method of biofilm eradication. Biofouling 18: 305–311.

Tang L, Pillai S, Revsbech NP, Schramm A, Bischoff C, Meyer RL. 2011. Biofilm retention on surfaces with variable roughness and hydrophobicity. Biofouling. 27: 111–121.

Teh KH, Flint S, French N. 2010. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* in controlled mixed-microbial populations. Int. J. Food Microbiol. 143: 118–124. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.037

Thimothe J, Nightingale KK, Gall K, Scott VN, Wiedmann M. 2004. Tracking of *Listeria monocytogenes* in smoked fish processing plants. J. Food Prot. 67, 328–341.

Thompson FL, Thompson CC, Vicente AC, Klose KE. 2010. Vibrio 2009: the third international conference on the biology of Vibrios. Mol. Microbiol. 77: 1065–1071. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07286.x

Verran J, Airey P, Packer A, Whitehead KA. 2008. Microbial retention on open food contact surfaces and implications for food contamination. Adv. Appl. Microbiol. 64:223–246. doi: 10.1016/S0065-2164(08)00408-5

Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC Vet Res. 5:20. doi: 10.1186/1746-6148-5-20

Viazis S, Akhtar M, Feirtag J, Diez-Gonzalez F 2011. Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 viability on hard surfaces by treatment with a bacteriophage mixture. Int. J. Food Microbiol. 145: 37–42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.11.021

von Laer AE, de Lima AS, Trindade Pdos S, Andriguetto C, Destro MT, da Silva WP. 2009. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from a fresh mixed sausage processing line in Pelotas-RS by PFGE. Braz. J. Microbiol. 40: 574–582. doi: 10.1590/S1517-838220090003000021

Yan J, Mao J, Xie J. 2013. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications. BioDrugs 28: 265–274.

Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, Ersoz G, Kutateladze M, Gozlugol M. 2013. Bacteriophage therapy in implant-related infections: An experimental study. J. Bone Jt. Surg. Am. 95: 117–125.

Zhang Y, Hu Z. 2013. Combined treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with

bacteriophages and chlorine. Biotechnol. Bioeng. 110: 286–295.