

Contamination rate of *Brucella* in raw sheep milk and the effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* on its biofilm production

Parandakhteh, M.¹, Neyriz Naghadehi, M.^{2*}

1. Graduated Doctor of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Branch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

2. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Urmia Bbranch, Islamic Azad University, Urmia, Iran

*Corresponding author: mnn.uiau@yahoo.com

(Received: 2022/8/24 Accepted: 2022/10/17)

Abstract

Brucellosis is one of the most important zoonotic bacterial diseases in humans and vertebrate animals. Lactic acid bacteria (LAB) and their production compounds have been proposed as potential biocontrol agents in biofilm formation. The present research aimed to determine the effects of cell-free supernatant (CFS) from *Lactobacillus acidophilus* on the biofilm production of *Brucella* isolates from raw sheep milk of Mahabad city (Iran). In this study, 100 sheep milk samples were randomly collected from different urban and rural areas of Mahabad. To isolate *Brucella*, the samples were cultured in *Brucella* broth and then streaked on *Brucella* agar with the selective supplement, and to identify the species of *Brucella*, related metabolic tests were performed. The biofilm production capability of the isolates, as well as the antibiofilm activity of the CFS, were evaluated by the microplate assay method. The results showed that out of 100 milk samples, 3 samples (3%) are contaminated with *Brucella melitensis*. Also, all three isolates were biofilm-formers. Two isolates were recognized as moderate and one isolate as a strong biofilm-former. Different concentrations of CFS reduced the biofilm production of isolates significantly ($P < 0.01$). Also, the concentration of 10% of CSF showed the highest antibiofilm activity. From the findings, it can be concluded that *Brucella* contamination in raw sheep milk in the Mahabad region is relatively high. There is a need for a full performance of Brucellosis screening and vaccination programs in livestock herds of the region. It can also be concluded that the CFS of *L. acidophilus* can remove *Brucella* biofilm. Therefore, *L. acidophilus* CFS as an antibiofilm compound can be proposed to control the growth of *Brucella*.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: *Brucella*, Raw sheep milk, Mahabad city (Iran), Biofilm, Cell-free supernatant (CFS), *Lactobacillus acidophilus*

DOI:10.30495/JFH.2022.1966210.1371

«مقاله پژوهشی»

بررسی میزان آلودگی بروسلا در شیرهای خام گوسفندی و اثر پالیده عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی تولید بیوفیلم آن

مسعود پرانداخته^۱ مسلم نیریز نقدهی^{۲*}

۱. دانش‌آموخته دکتری عمومی دامپزشکی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

۲. استادیار گروه بهداشت مواد غذایی، واحد ارومیه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: mnn.uiiau@yahoo.com

(دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۶/۲ پذیرش نهایی: ۱۴۰۱/۷/۲۵)

چکیده

بروسلوز از بیماری‌های باکتریایی زئونوتیک مهم در انسان و حیوانات مهره‌دار است. باکتری‌های اسیدلاکتیک و ترکیبات تولیدی آن‌ها به‌عنوان عوامل کنترل‌زیستی بالقوه در تشکیل بیوفیلم مطرح شده‌اند. تحقیق حاضر با هدف تعیین اثرات پالیده عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس روی تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا از شیرهای خام گوسفندی شهرستان مهاباد انجام شد. در این تحقیق، ۱۰۰ نمونه شیر گوسفندی به‌صورت تصادفی از مناطق مختلف شهری و روستایی شهرستان مهاباد جمع‌آوری شدند. برای جداسازی بروسلا، ابتدا نمونه‌ها در آبگوشت بروسلا و سپس در آگار بروسلا با مکمل انتخابی کشت داده شدند؛ و برای شناسایی گونه‌های بروسلا، آزمایش‌های متابولیکی مرتبط انجام گردید. قابلیت تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا و نیز فعالیت ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به روش سنجش میکروپلیت ارزیابی شد. یافته‌ها نشان داد که از مجموع ۱۰۰ نمونه شیر، تعداد ۳ نمونه (۳ درصد) آلوده به بروسلا ملی‌تنسیس بودند. هم‌چنین هر سه جدایه دارای توانایی تشکیل بیوفیلم تشخیص داده شدند. دو جدایه، تولیدکننده متوسط بیوفیلم و یک جدایه، مولد قوی بیوفیلم بودند. غلظت‌های مختلف CFS، به‌صورت معنی‌داری ($p < 0.01$) تولید بیوفیلم جدایه‌ها را کاهش دادند. هم‌چنین غلظت ۱۰ درصد CSF، بیشترین فعالیت ضدبیوفیلم را نشان داد. از یافته‌ها می‌توان استنباط نمود که آلودگی بروسلا در شیرهای خام گوسفندی منطقه مهاباد نسبتاً بالاست. اجرای کامل برنامه‌های غربالگری و مایه‌کوبی بروسلوز در گله‌های دامی منطقه ضروری است. هم‌چنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس دارای قابلیت حذف بیوفیلم بروسلا می‌باشد. بنابراین، CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به‌عنوان یک ترکیب ضد بیوفیلم می‌تواند در کنترل رشد بروسلا مطرح گردد.

واژه‌های کلیدی: بروسلا، شیرخام گوسفند، مهاباد (ایران)، بیوفیلم، پالیده عاری از سلول (CFS)، لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس

مقدمه

می یابد و در انسان با علائم تب مواج، درد مفاصل، درد عضلات، تعریق، ضعف و بی‌اشتهایی ظاهر می‌شود. حتی ممکن است بیماری در انسان پیچیده شده و با عوارض اسکلتی، تناسلی، عصبی و قلبی همراه گردد. میزان مرگ و میر در انسان در موارد درمان نشده کمتر از ۲ درصد است. اما در عفونت با بروسلا ملی‌تنسیس این میزان بیشتر است. تخمین زده می‌شود که موارد بروسلا در انسان، ۵۰۰۰۰۰ مورد در سال باشد ولی به احتمال زیاد، این آمار کمتر از تخمین واقعی است. تشخیص دام‌های آلوده به روش‌های ایمنی شناسی و مایه‌کوبی گله‌های دامی از روش‌های موثر ریشه‌کنی و پیشگیری بیماری می‌باشند (Theron and Thantsha, 2014).

پستان و گره‌های لنفی فوق‌پستانی جایگاه اصلی بروسلا است. این گره‌های لنفاوی در ۶۰ تا ۹۳ درصد حیوانات مبتلا، عفونی هستند. بنابراین میزان آلودگی به بروسلا در شیر گله‌های دامی که مایه‌کوبی نشده‌اند، بالا است (Karim and Farkhondeh, 1984). از طرفی، آلودگی شیر به باکتری‌های بیماری‌زا با توانایی چسبیدن به سطوح، آلودگی باکتریایی و تشکیل بیوفیلیم در تجهیزات شيردوخی، مخازن نگهداری شیرخام و دستگاه‌های فرآوری‌کننده را افزایش داده و مشکلات امنیت بهداشتی ایجاد می‌کند (Khelissa et al., 2017).

تشکیل بیوفیلیم یک مکانیسم حیاتی برای بقای باکتری‌ها در محیط است (Burmølle et al., 2010). بیوفیلیم، یک اجتماع از میکروارگانیسم‌هاست که در آن سلول‌ها به سطوح تماس غذا و غیرغذا می‌چسبند و مواد پلیمری خارج سلولی تولید می‌کنند که عمدتاً از پلی‌ساکاریدها بوده ولی پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک را نیز شامل می‌شود. این نوع تجمع میکروبی،

بروسلاها کوکوباسیل‌های داخل سلولی اختیاری، کاپنوفیل (رشد در غلظت بالای دی‌اکسیدکربن)، گرم منفی، کوچک، غیرمتحرک، بدون اسپور و بدون کپسول هستند که موجب بیماری در بسیاری از گونه‌های حیوانی و انسان‌ها می‌شوند. هفت گونه بروسلا در خشکی شناخته شده است: بروسلا آبورتوس (*B. abortus*)، بروسلا کانیس (*B. canis*)، بروسلا اوویس (*B. ovis*)، بروسلا سوئیس (*B. suis*)، بروسلا نئوتومه (*B. neotome*) و بروسلا میکروتی (*B. microti*). بروسلا آبورتوس عمدتاً گاوها را آلوده می‌کند اما می‌تواند به گاو میش، شتر، آهو، سگ، اسب، گوسفند و انسان هم منتقل شود. اگرچه بروسلا ملی‌تنسیس می‌تواند باعث ابتلای گاوها شود ولی این گونه عمدتاً در گوسفند و بز ایجاد بیماری می‌کند و برای انسان هم بسیار عفونی است. با وجود این که بروسلاها در شرایط نگهداری سرد و انجماد زنده می‌مانند ولی به سرعت با دماهای بالا نظیر دمای پاستوریزاسیون و پخت از بین می‌روند. عفونت با بروسلا می‌تواند منجر به بیماری بروسلازیس شود که یک بیماری مزمن مشترک بین انسان و حیوانات مهره‌دار است (Halling and Young, 2001). مخزن آلودگی حیوانات مبتلا است و انسان‌ها به این بیماری به صورت مستقیم از طریق تماس با حیوانات آلوده و ترشحات آنها یا به صورت غیرمستقیم از طریق مصرف محصولات دامی آلوده مانند شیرخام و فرآورده‌های شیر غیرپاستوریزه مبتلا می‌شوند. این بیماری در گله‌های دامی به صورت سقط‌جنین تظاهر

Goderfoid *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Almiron *et al.*, 2013; Tang *et al.*, 2020).

با توجه به ماهیت پیچیده و مقاوم بیوفیلیم‌ها و نیز اهمیت آن‌ها در عفونت‌های مزمن و آلودگی میکروبی تجهیزات کارخانه‌های مواد غذایی، یافتن راه‌های جایگزین برای پاک‌سازی بیوفیلیم‌ها مورد نظر محققین مختلف قرار گرفته است. در این راستا، باکتری‌های پروبیوتیکی و ترکیبات پست‌بیوتیکی (Postbiotics) به‌عنوان عوامل کنترل‌زیستی بالقوه در تشکیل بیوفیلیم مطرح شده‌اند. در میان باکتری‌های اسیدلاکتیک (Lactic acid bacteria: LAB)، لاکتوباسیلوس‌ها بزرگ‌ترین جنس و پرمصرف‌ترین گونه‌های پروبیوتیکی را شامل می‌شوند و از نظر مقررات غذایی، ایمن (Generally recognized as safe: GRAS) شناخته می‌شوند (Giordani *et al.*, 2021). لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس از باکتری‌های پروبیوتیکی مشهور است که به‌طور گسترده در فرآورده‌های شیر تخمیری استفاده می‌گردد (Ait Quali *et al.*, 2014). پست‌بیوتیک‌ها به محصولات محلول یا متابولیت‌های ترشحی باکتری‌های پروبیوتیکی گفته می‌شوند (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018). سوپرناتانت یا پالیده بدون سلول (Cell-free supernatant: CFS) لاکتوباسیلوس از ترکیبات پست‌بیوتیکی محسوب می‌شوند که متابولیت‌های با وزن مولکولی پایین (اسیدهای آلی، پراکسید هیدروژن و روترین) و بالا (باکتریوسین‌ها و پلی‌پپتیدهای شبه باکتریوسین) را شامل می‌گردند (Aguilar-Toalá *et al.*, 2018; Nataraj *et al.*, 2020). در کنار LAB که با توسعه بیوفیلیم باکتریایی در سطوح تداخل می‌کنند (Jalilsood *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2016)؛ پالیده

نسبت به تنش‌های محیطی و ترکیبات ضد میکروبی بسیار مقاوم هستند. بیوفیلیم‌ها منبع مهم گسترش عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا و عامل فساد به غذا شناخته می‌شوند (Shunmugaperumal, 2010; Mendez-Vilas, 2013). در عفونت‌های مزمن، باکتری‌ها در قالب میکروکلنی‌ها یا توده‌های محصور در ماتریکس سازمان‌دهی می‌کنند که تحت عنوان بیوفیلیم شناخته می‌شوند (Dang *et al.*, 2015; Wu *et al.*, 2015). سیستم ایمنی میزبان نه‌تنها در از بین بردن کامل بیوفیلیم بالغ بی‌اثر است، بلکه وجود آنتی‌بادی‌ها در محیط اطراف می‌تواند به آسیب بافت کمک کند. علاوه بر این، سلول‌های بیوفیلیم میکروبی تا ۱۰۰۰ برابر بیشتر از سلول‌های حالت پلانکتونی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها مقاوم هستند که عمدتاً به دلیل دشواری آنتی‌بیوتیک‌ها با وزن مولکولی بالا برای نفوذ در ماتریکس چسبناک و رسیدن به لایه‌های عمیق‌تر بیوفیلیم است (Giordani *et al.*, 2021). هم‌چنین تغییر بیان ژن و پروتئین در بیوفیلیم‌ها مسئول حدت سلولی، چسبندگی و مقاومت دارویی است (Parsek and Singh, 2003; Wang *et al.*, 2012). از سویی، میکروارگانیسم‌های رشدیافته در بیوفیلیم به‌طور ذاتی نسبت به آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت ندارند (Kumon *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2018). باکتری‌هایی که در سطوح تشکیل کلنی داده و به میزبان‌های حساس حمله و عفونت‌های مزمن ایجاد می‌کنند، عمدتاً در بیوفیلیم‌ها رشد می‌کنند (Almiron *et al.*, 2013). در تعدادی از مطالعات، تولید بیوفیلیم بروسلا ملی تنسیس و بروسلا آبورتوس در شرایط آزمایشگاهی گزارش شده است (Uzureu *et al.*, 2007);

نالیدیکسیک اسید (۲/۵ mg) و ونکومایسین (۱۰ mg) (Himedia, Mumbai, India)، کشت خطی داده شدند. پلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ تا ۵ روز در انکوباتور هوازی و انکوباتور بی‌هوازی با ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن گرمخانه‌گذاری شدند. پرگنه‌های بروسلا به قطر ۱ تا ۲ میلی‌متر، سفید تا خاکستری، محدب، صاف یا خشن، شفاف و غیرموکوییدی پس از خالص‌سازی، برای شناسایی گونه‌های بروسلا تحت آزمون‌های گرم (کوکوباسیل‌های گرم منفی)، کاتالاز (مثبت)، تولید اندول (منفی)، اکسیداز (اوویس منفی و ملی‌تنسیس و آبورتوس مثبت)، تولید H_2S (ملی‌تنسیس منفی و آبورتوس به‌استثنای بیووار ۵ مثبت)، اوره‌آز (ملی‌تنسیس متغیر و آبورتوس مثبت) و رشد در حضور ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن (ملی‌تنسیس منفی و آبورتوس بسته به نوع بیووار متغیر) قرار گرفت (Quinn et al., 1994; ISIRI 19153/2020).

- سنجش توانایی تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا
ارزیابی تشکیل بیوفیلم جدایه‌های بروسلا به روش سنجش میکروپلیت انجام شد (Koohestani et al., 2018; Tang et al., 2020). برای این منظور، از میکروپلیت‌های سترون ۲۴ چاهکی با کف صاف و درب دار از جنس پلی‌استیرن استفاده گردید. برای تهیه تلقیح باکتریایی، ابتدا جدایه‌ها در آبگوشت بروسلا در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند؛ سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری سوسپانسیون باکتریایی روی ۰/۱ تنظیم و تعداد تقریبی 10^7 CFU/ml به دست آمد. در مرحله بعد، به هر یک از چاهک‌ها ۱/۸

LAB هم در برابر عوامل بیماری‌زای منتقله از غذا، فعالیت حذف بیوفیلم نشان می‌دهند (Wang et al., 2013; Ait Quali et al., 2014; Aminnezhad et al., 2014; Khiralla et al., 2015).

تحقیق حاضر با هدف بررسی میزان آلودگی بروسلا در شیرهای خام گوسفندی شهرستان مهاباد و اثر پالیده‌عاری از سلول لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس روی تولید بیوفیلم آن انجام شد.

مواد و روش‌ها

- جداسازی و شناسایی بروسلا از شیر

تعداد ۱۰۰ نمونه شیر خام گوسفند به صورت تصادفی از مناطق شهری و روستایی شهرستان مهاباد با رعایت شرایط سترون جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها در مجاورت یخ به آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی منتقل شد. به دلیل ماهیت زئونوتیک بروسلا، آزمایش‌ها با رعایت الزامات ایمنی‌زیستی سطح دو انجام شدند (ISIRI, 9899/2016). ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر نمونه، با رعایت شرایط سترون به بطری‌های محتوی ۹۰ میلی‌لیتر آبگوشت بروسلا (Quelab, Canada) افزوده شد. بطری‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲ تا ۵ روز در انکوباتور هوازی و انکوباتور بی‌هوازی با ۱۰ درصد دی‌اکسیدکربن غنی‌سازی شدند. در مرحله بعد، بطری‌ها از انکوباتور خارج و پس از همگن‌سازی، روی آگار بروسلا (Quelab, Canada) محتوی ۵ درصد خون دفیبرینه گوسفندی و مکمل انتخابی بروسلا FD005 محتوی پلی‌میکسین B (۲۵۰۰ IU)، باسیتراسین (۱۲۵۰۰ IU)، نیستاتین (۵۰۰۰۰ IU)، سیکلوهگزیمید (۵۰ mg)،

رنگ‌آمیزی به مدت ۳۰ دقیقه ادامه یافت. سپس رنگ اضافی چاهک‌ها با آب مقطر شستشو و در دمای محیط خشک شدند. در ادامه، برای شستن بیوفیلم رنگ‌آمیزی شده، به چاهک‌ها ۲ میلی‌لیتر اتانول مطلق افزوده شد. سپس جذب نوری بیوفیلم در طول موج ۵۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. شاخص تشکیل بیوفیلم (Specific biofilm formation: SBF) هر جدایه با فرمول زیر محاسبه و با استفاده از جدول (۱) تفسیر شدند (Naves *et al.*, 2008). آزمایش‌ها بر روی جدایه‌ها و نیز شاهد منفی در سه تکرار انجام شدند.

میلی‌لیتر آبگوشت بروسلا و ۰/۲ میلی‌لیتر از تلقیح باکتریایی افزوده شد. از طرفی، به‌عنوان شاهد منفی به یکی از چاهک‌ها آبگوشت سترون ریخته شد. میکروپلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. در ادامه، سوسپانسیون درون چاهک‌ها تخلیه و جذب نوری فاز پلانکتونی (رشد) در طول موج ۶۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. سپس چاهک‌ها با محلول بافر فسفات سالین (Phosphate buffered saline: PBS) سه بار شستشو و در دمای محیط خشک شدند. در مرحله بعد، ۲ میلی‌لیتر محلول یک درصد کریستال ویوله (Crystal violet) به چاهک‌ها افزوده و

$$SBN = \frac{AB - CW}{G}$$

AB: جذب نوری بیوفیلم رنگ‌آمیزی شده

CW: جذب نوری شاهد منفی

G: جذب نوری فاز پلانکتونی

جدول (۱) - تفسیر شاخص تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم	منفی	ضعیف	متوسط	قوی
شاخص SBF	> ۰/۳۵	۰/۳۵-۰/۶۹	۰/۷۰-۱/۰۹	≥ ۱/۱

۱۰۰ درصد در آبگوشت سترون تهیه شدند (Koohestani *et al.*, 2018).

- ارزیابی فعالیت حذف بیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس

این آزمایش، به روش سنجش میکروپلیت انجام شد. ابتدا به مقدار ۱/۸ میلی‌لیتر از آبگوشت بروسلا و سپس به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از تلقیح باکتریایی به چاهک‌ها افزوده شدند. میکروپلیت‌ها در ۳۷ درجه سلسیوس و ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سوسپانسیون باکتریایی چاهک‌ها تخلیه و با محلول

- تهیه پالیده عاری از سلول (CFS) لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس

لاکتوباسیلوس /اسیدوفیلوس ATCC 1643 در آبگوشت MRS (Merck, Germany) و در انکوباتور بی‌هواری در ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. سوسپانسیون باکتریایی با ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. فاز رویی جداسازی و با فیلتر سرنگی با قطر منافذ ۰/۲ میکرومتر صاف شد. سپس غلظت‌های ۱ درصد، ۱۰ درصد و

بیوفیلم رنگ آمیزی شده چاهک‌ها با ۲ میلی لیتر اتانول مطلق شستشو و جذب نوری آن در طول موج ۵۴۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه گیری شد. چاهک‌های حاوی آبگوشت بروسلا، تلقیح باکتریایی و بدون CFS به عنوان گروه شاهد و چاهک‌های حاوی آبگوشت بروسلا به عنوان گروه شاهد منفی طراحی شدند (Koohestani et al., 2018). آزمایش‌ها روی جدایه‌ها، شاهد منفی و نیز شاهد در سه تکرار انجام شدند.

PBS شستشو و در دمای محیط خشک شدند. سپس غلظت‌های ۱ درصد، ۱۰ درصد و ۱۰۰ درصد CFS لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به مقدار ۲ میلی لیتر در چاهک‌ها افزوده و در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شدند. در مرحله بعد، CFS از چاهک‌ها تخلیه و با محلول PBS شستشو و در دمای محیط خشک شدند. چاهک‌ها با ۲ میلی لیتر محلول یک درصد کریستال ویوله به مدت ۳۰ دقیقه رنگ آمیزی و رنگ اضافی چاهک‌ها با آب مقطر شستشو و خشک شد.

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

C: جذب نوری چاهک‌های شاهد

B: جذب نوری چاهک‌های شاهد منفی

T: جذب نوری چاهک‌های تیمار شده

غیرآلوده به بروسلا بودند. گونه بروسلا در نمونه‌های مثبت، ملی‌تنسیس شناسایی شد. هر سه جدایه دارای قابلیت تولید بیوفیلم بودند. دو جدایه تولید کننده متوسط بیوفیلم و یک جدایه، مولد قوی بیوفیلم تشخیص داده شد. میانگین \pm انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا متأثر از غلظت‌های ۱ درصد، ۱۰ درصد و ۱۰۰ درصد CFS لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس به ترتیب $1/67 \pm 1/80$ ، $31/40 \pm 2/37$ و $12/43 \pm 2/37$ بودند. تجزیه واریانس یک طرفه نشان داد که غلظت‌های مختلف CFS تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا را به صورت معنی داری ($p < 0/01$) کاهش می‌دهند. هم‌چنین نتایج آزمون تکمیلی توکی نشان داد بین درصدهای مختلف کاهش تولید بیوفیلم جدایه‌ها متأثر از غلظت‌های مختلف CSF، اختلاف آماری معنی دار وجود دارد ($p < 0/05$). از طرفی،

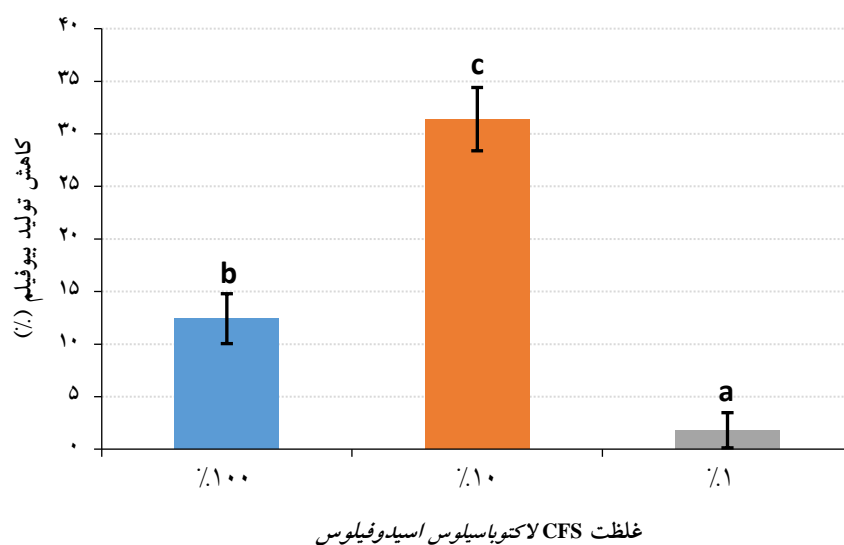
- روش تجزیه آماری داده‌ها

تجزیه آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۵ انجام گرفت. یافته‌های توصیفی شامل میانگین، انحراف معیار، فراوانی مطلق و نسبی محاسبه و گزارش گردید. با آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون تعقیبی توکی اختلاف میانگین درصد کاهش تولید بیوفیلم جدایه‌های بروسلا متأثر از غلظت‌های مختلف CFS لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس بررسی شد. در تمامی مراحل تجزیه و تحلیل داده‌ها، خطای مجاز برای رد فرض صفر (H_0)، ۵ درصد در نظر گرفته شد. ترسم نمودارها با نرم‌افزار اکسل ۲۰۱۹ صورت گرفت.

یافته‌ها

از ۱۰۰ نمونه شیر مورد آزمایش، تعداد ۳ نمونه (۳ درصد) آلوده به بروسلا و تعداد ۹۷ نمونه (۹۷ درصد)

در بین غلظت‌های مختلف CSF، غلظت ۱۰ درصد، بیشترین کاهش تولید بیوفیلیم را نشان داد (نمودار ۱).



نمودار (۱) - میانگین \pm انحراف معیار درصد کاهش تولید بیوفیلیم جدایه‌های بروسلا متأثر از غلظت‌های مختلف CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس؛ a, b, c: حروف نامشابه نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح $p < 0.05$ بین غلظت‌هاست.

بحث و نتیجه‌گیری

طبق نتایج، میزان آلودگی بروسلا در شیرهای خام گوسفندی شهرستان مهاباد ایران به‌روش کشت میکروبی ۳ درصد به‌دست آمد که هر سه جدایه گونه ملی‌تنسیس بودند. میزان شیوع بروسلا در فرآورده‌های شیر به‌طور گسترده‌ای بستگی به وضعیت بیماری بروسلاز در جمعیت‌های دامی مناطق جغرافیایی مختلف دارد. در بسیاری از کشورهای توسعه‌یافته نظیر اکثر کشورهای شمال اروپا، کانادا، استرالیا و نیوزلند به‌دلیل اجرای دقیق و منظم برنامه‌های متداول غربالگری و مایه‌کوبی، بروسلاز با موفقیت در جمعیت‌های دامی ریشه‌کن شده است. در حالی‌که شیوع بیماری در سایر

کشورها، به‌دلایل بومی بودن، سیستم‌های مدیریت متفاوت، گونه‌های دامی مختلف درگیر و برنامه‌های دامپزشکی و پزشکی منطقه‌ای یا ملی خاص، بسیار متغیر است (Lopes et al., 2010; Dadar et al., 2019). در یک بررسی مروری بالاترین و پایین‌ترین میزان شیوع بروسلا در فرآورده‌های شیر منطقه خاورمیانه به‌ترتیب در کشورهای کویت (۶۲ درصد) و مصر (۱۵ درصد) مشاهده شد (Abedi et al., 2019). در ایران تحقیقات متعددی شیوع بروسلا در شیر خام و فرآورده‌های شیر را در مناطق مختلف بررسی کرده‌اند. در مطالعه‌ای، از ۳۰۰ نمونه شیر خام گوسفند و ۴۰۰ نمونه شیر خام بز مورد آزمایش در جنوب شرق ایران

ایران به دلایل مختلف هنوز مایه کوبی نشده‌اند؛ در نتیجه شیوع بروسلا همچنان بالاست (Ebrahimi and Zoghi., 2017). از طرفی، میزان شیوع بروسلا در فرآورده‌های شیر بسته به روش مورد استفاده جهت تشخیص (کشت میکروبی یا PCR) نیز متفاوت است. در مطالعاتی که از روش‌های مولکولی جهت تشخیص بروسلا استفاده کرده‌اند نسبت به روش کشت میکروبی، شیوع‌های بالاتری به دست آمده است که این تفاوت، به خطای روش‌های مولکولی در شناسایی ژنوم باکتری‌های مرده از زنده نسبت داده می‌شود (Marouf et al., 2021). به طور کلی، مهم‌ترین دلایل تفاوت در شیوع گونه‌های بروسلا در محصولات شیر مصرفی در نقاط مختلف جهان را می‌توان به تنوع مناطق جغرافیایی، نوع بررسی، حساسیت آزمایش‌ها، نوع و تعداد نمونه‌های گرفته شده، عوامل میزبانی، مایه کوبی بروسلا در حیوانات و روش‌های مورد استفاده برای تولید فرآورده‌های شیر نسبت داد (Esmaeili et al., 2012). هم‌چنین نتایج مطالعات نشان داد که بروسلا ملی‌تنسیس بیوتیپ ۱، گونه و بیوتیپ غالب و بومی در گوسفند و بز و انسان در ایران است (Esmaeili et al., 2012; Ashrafganjooyi et al., 2017; Dadar et al., 2019). با این وجود، در بعضی از بررسی‌ها، بروسلا آبورتوس نیز از شیر گوسفند جدا شده است که به دلیل نگهداری نزدیک گله‌های گاو و گوسفند، امکان آلودگی با گونه‌های باکتریایی غیرترجیحی فراهم شده است (Shafeie et al., 2012).

در بررسی حاضر، جدایه‌های بروسلا ملی‌تنسیس قابلیت تولید بیوفیلم با میزان متفاوت، از متوسط تا قوی را نشان دادند. در مطالعه‌ای، تجمع و تشکیل بیوفیلم در

به روش کشت میکروبی و با تایید مولکولی، به ترتیب ۳ نمونه (۱ درصد) و ۶ نمونه (۱/۵ درصد) آلوده به بروسلا ملی‌تنسیس بیوتیپ ۱ بودند (Ashrafganjooyi et al., 2017). در مطالعه‌ای دیگری، از ۲۱۴ نمونه شیرخام گوسفند مورد آزمایش در استان آذربایجان شرقی، ۸ نمونه (۳/۷۳ درصد) در روش کشت میکروبی و ۳۷ نمونه (۱۷/۲۹ درصد) در روش qPCR (Real-time quantitative PCR) مثبت تشخیص داده شدند (Marouf et al., 2021). هم‌چنین از مجموع ۳۳ نمونه شیرخام گوسفند و ۳۳ نمونه شیرخام بز مورد آزمایش در استان تهران به روش Real-time PCR به ترتیب ۹ نمونه (۲۷/۳ درصد) و ۱۵ نمونه (۴۵/۵ درصد) آلوده به ژن گونه‌های بروسلا بودند (Moslemi et al., 2018). در بررسی دیگری، از ۱۲۵ نمونه شیر گوسفند و ۱۰۰ نمونه شیر بز مورد آزمایش در مناطق اصفهان و شهرکرد به روش PCR، به ترتیب ۱۲ نمونه (۹/۶ درصد) و ۱۸ نمونه (۱۸ درصد) آلوده به ژنوم بروسلا ملی‌تنسیس بودند (Shakerian et al., 2015). همان‌گونه که ملاحظه می‌گردد شیوع بروسلا در شیرخام گوسفند و بز در مناطق مختلف کشور متفاوت است. در ایران همانند بسیاری از کشورها، مایه کوبی راهبرد اصلی کنترل بروسلاز در گله‌های گوسفند و بز است. تحقیقات نشان داده‌اند که بین مایه کوبی دام‌ها و شیوع بروسلاز در انسان ضریب همبستگی معکوس وجود دارد (Esmaeili et al., 2013). به نظر می‌رسد در مناطقی از کشور که برنامه‌های متداول غربالگری و مایه کوبی در جمعیت‌های دامی به صورت دقیق و منظم اجرا می‌گردد؛ شیوع بروسلاز پایین‌تر باشد. با این حال، حدود ۳۰ تا ۴۰ درصد از جمعیت گوسفندان و بزها در

نشان داده شده است. در مطالعه‌ای، سوسپانسیون سلولی و مایع فیلترشده بدون سلول (CFF) لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس به صورت وابسته به غلظت، تولید بیوفیلم سودوموناس آیروجینوزا را کاهش دادند. نشان داده شد که اثرات ضدبیوفیلم CFF لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس صرفاً به دلیل اسیدیته آن نیست؛ بلکه یک ترکیب پروتئینی درشت مولکول هم تا حدودی در اثرات ضدبیوفیلم آن دخالت دارد (Wilson et al., 2021). در مطالعه‌ای دیگری، CFS لاکتوباسیلوس پلانتراروم تولید بیوفیلم جدایه‌های استافیلوکوکوس اورئوس، اشریشیا کولای و سودوموناس آیروجینوزا با مقاومت دارویی چندگانه (Multiple-drug resistant: MDR) را کاهش داد. هم‌چنین نشان داده شد که اثرات ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس پلانتراروم در pH های ۸ و ۱۰، گرمخانه‌گذاری در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه و در حضور آنزیم‌های پروتئیناز K و پپسین به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (Zamani et al., 2017). در مطالعه‌ای دیگر، اثرات ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس فرمتوم گزارش شد. نشان دادند که اثرات ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس فرمتوم به باکتریوسین مرتبط نبوده و اسیدهای آلی (اسید لاکتیک، اسید استیک و اسید فورمیک) نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Shokri et al., 2018). از طرفی، اثرات ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس‌ها، بستگی به گونه باکتریایی دارد. در یک مطالعه، CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس LA5، فعالیت ضدباکتریایی و ضدبیوفیلم بیشتری نسبت به CFS لاکتوباسیلوس کازئی ۴۳۱ نشان داد (Koohestani et al., 2018). به‌رغم این‌که در مطالعات متعدد اثرات

نوع وحشی بروسلا آبورتوس در شرایط تقلیل اکسیژن و کمبود مواد مغذی گزارش شد (Almiron et al., 2013). هم‌چنین در مطالعه دیگری، تغییر بیان تعدادی از ژن‌ها و پروتئین‌ها در بیوفیلم بروسلا آبورتوس در مقایسه با حالت پلانکتونی مشاهده شد. پیشنهاد شد که تفاوت در بیان ژن‌ها و پروتئین‌ها در بیوفیلم بروسلا آبورتوس ممکن است نقش مهمی در دفاع باکتریایی، تشکیل کلنی، تهاجم و بیماری‌زایی ایفا کند (Tang et al., 2020). از طرفی، در تعدادی از مطالعات، توانایی تولید بیوفیلم در موتانت‌های VjbR، MG210 و virB بروسلا ملی‌تنسیس گزارش شده است (Uzureu et al., 2007; Goderfoid et al., 2010; Wang et al., 2010). در این مطالعات، تجمع یا توده‌ای شدن (Clumping) سلول‌ها و وجود آگزوبلی ساکارید (EPS) به‌عنوان عوامل اصلی در تشکیل بیوفیلم بروسلا ملی‌تنسیس شناخته شده‌اند. با این وجود، ممکن است ساختارهای غیر از EPS از قبیل پروتئین‌های غشای خارجی (Omps)، چسبندگی و DNA نیز در تولید بیوفیلم بروسلا ملی‌تنسیس نخیل باشند (Uzureu et al., 2007).

در تحقیق حاضر، CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس فعالیت ضدبیوفیلم در برابر جدایه‌های بروسلا ملی‌تنسیس را نشان داد. در چند مطالعه، اثرات ضدباکتریایی CFS لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس و لاکتوباسیلوس کازئی گزارش شده است. در این مطالعات، اثرات ضدباکتریایی CFS به اسیدهای آلی نسبت داده شدند (Mirnegad et al., 2013; Koohestani et al., 2018). هم‌چنین در تعدادی از مطالعات، فعالیت ضدبیوفیلم CFS لاکتوباسیلوس‌ها

تولید بیوفیلم است که می‌تواند در پیچیدگی درمان، عود بیماری و نیز در آلودگی میکروبی تجهیزات کارخانه‌های شیر نقش مهم ایفا کند. از سوی، CFS/لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس دارای فعالیت حذف بیوفیلم روی جدایه‌های بروسلا در شرایط آزمایشگاهی است. بنابراین، CFS/این باکتری به‌عنوان ضدبیوفیلم، می‌تواند در کنترل رشد بروسلا مطرح گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ‌گونه تعارض منافع ندارند.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از تلاش‌ها و کمک‌های مسئول محترم آزمایشگاه کنترل کیفی و بهداشتی مواد غذایی دانشکده دامپزشکی جناب آقای مهندس باقری تشکر و قدردانی می‌نمایند.

ضدبیوفیلم CFS/لاکتوباسیلوس‌ها وابسته به غلظت گزارش شده است (Vuotto *et al.*, 2014; Koohestani *et al.*, 2018; Wilsons *et al.*, 2021)؛ ولی در تحقیق حاضر غلظت ۱۰ درصد CFS/لاکتوباسیلوس/اسیدوفیلوس، بیشترین فعالیت ضدبیوفیلم را در برابر جدایه‌های بروسلا ملی‌تنسیس نشان داد. به‌نظر می‌رسد که در غلظت ۱۰ درصد، ترکیبات ضدبیوفیلم موجود در CFS (اسیدهای آلی و باکتریوسین‌ها)، اثر هم‌افزا (سینرژیست) در حذف بیوفیلم را نشان می‌دهند. می‌توان نتیجه‌گیری نمود که آلودگی به بروسلا در شیرهای خام گوسفندی شهرستان مهاباد نسبتاً بالاست. اجرای کامل و دقیق برنامه‌های متداول غربالگری و مایه‌کوبی بروسلاز در گله‌های دامی، نظارت کامل بر حمل و نقل دام‌ها در مناطق مرزی، ارائه آموزش‌های لازم به عشایر و روستائیان منطقه در زمینه مخاطرات بروسلاز و راه‌های سرایت آن به انسان و دام پیشنهاد می‌گردد. بروسلا ملی‌تنسیس یک باکتری با توانایی

منابع

- Abedi, A.S., Hashempour-Baltork, F., Alizadeh, A.M., Beikzadeh, S., Hosseini, H., Bashiry, M., *et al.* (2020). The prevalence of *Brucella* spp. in dairy products in the Middle East region: a systematic review and meta-analysis. *Acta Tropica*, 202: 105241.
- Aguilar-Toalá, J.E, Garcia-Varela, R., Garcia, H.S., Mata-Haro, V., GonzálezCórdova, A.F., Vallejo-Cordoba, B., *et al.* (2018). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science and Technology*, 75: 105–14.
- Ait Ouali, F., Al Kassaa, I., Cudennec, B., Abdallah, M., Bendali, F., Sadoun, D., *et al.* (2014). Identification of *lactobacilli* with inhibitory effect on biofilm formation by pathogenic bacteria on stainless steel surfaces. *International Journal of Food Microbiology*, 191: 116-124.
- Almirón, M.A., Roset, M.S. and Sanjuan, N. (2013). The aggregation of *Brucella abortus* occurs under microaerobic conditions and promotes desiccation tolerance and biofilm formation. *Open Microbiology Journal*, 7: 87–91.
- Aminnezhad, S. and Kasra-Kermanshahi R. (2014). Antibiofilm activity of cell-free supernatant from *Lactobacillus casei* in *Pseudomonas aeruginosa*. *Feyz (Journal of Kashan University of Medical Sciences)*, 18(1): 30-37. [In Persian]
- Ashrafganjooyi, S.H., Saedadeli, N., Alamian, S., Khalili, M. and Shirazi, Z. (2017). Isolation and biotyping of *Brucella* spp. from sheep and goats raw milk in southeastern Iran. *Tropical Biomedicine*, 34(3): 507–511.
- Burmølle, M., Thomsen, T.R., Fazli, M., Dige, I., Christensen, L., Homøe, P., *et al.* (2010). Biofilms in chronic infections a matter of opportunity monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59: 324-336.
- Dadar, M., Alamian, S., Behrozikhah, A.M., Yazdani, F., Kalantari, A., Etemadi, A., *et al.* (2019). Molecular identification of *Brucella* species and biovars associated with animal and human infection in Iran. *Veterinary Research Forum*, 10 (4): 315-321.
- Dadar, M., Shahalia, Y. and Whatmore, AM. (2019). Human brucellosis caused by raw dairy products: A review on the occurrence, major risk factors and prevention. *International Journal of Food Microbiology*, 292: 39-47.
- Dang, H. and Lovell, C.R. (2015). Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80: 91-138.
- Ebrahimi, M. and Zoghi, E., (2017). A review of the use of reduced-dose vaccine of *B. melitensis* Rev1 strain in adult sheep. *Veterinary Journal*, 115: 2-9. [In Persian]
- Esmaeili, H., Ekhtiyarzadeh. H., Ebrahimzadeh, H., Partovi, R., Marhamati Khameneh, B., Hamed, M., *et al.* (2012). Evaluation of the national sheep and goat brucellosis control program in Iran. *Arak Medical University Journal*, 14(6, Suppl 3): 9-20. [In Persian]
- Esmaeili, H., Esmaeili, H. and Amiri, K., 2013. The effects of brucellosis vaccination in domestic animal on human brucellosis in Iran. *Razi Journal of Medical Sciences*, 20: 80-86. [In Persian]
- Giordani, B., Parolin, C. and Vitali, B. (2021). *Lactobacilli* as anti-biofilm strategy in oral infectious diseases: a mini-review. *Frontiers in Medical Technology*, 3: 769172.
- Godefroid, M., Svensson, M.V., Cambier, P., Uzureau, S., Mirabella, A., De Bolle, X., *et al.* (2010). *Brucella melitensis* 16M produces a mannan and other extracellular matrix components typical of a biofilm. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 59: 364–377.
- Gomez, N.C., Ramiro, J.M., Quecan, B.X.V. and De Melo Franco, B.D.G. (2016). Use of potential probiotic lactic acid bacteria (lab) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *Escherichia coli* O157:H7 biofilms formation. *Frontiers in Microbiology*, 7: 863.

- Halling, S.M., and Young, E.J. (2001). *Brucella*, In: Hu, Y. H., Pierson, M.D., and Gorham, J.R. (Editors), Foodborne Disease Handbook Volume 1: Bacterial Pathogens. Marcel Dekker, Inc. pp. 77-82.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2016). Microbiology of food and animal feeding stuffs –General requirements and guidance for microbiological examinations. 1st edition, ISIRI No. 9899. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2020). Microbiology of Food Chain- Complete Method for Isolation and Identification of *Brucella* spp. 1st edition, ISIRI No. 19153. [In Persian].
- Jalilsood, T., Baradaran, A., Song, A.A.L., Ling Foo, H., Mustafa, S., Saad, W.Z., *et al.* (2015). Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilmforming *Lactobacillus* isolate: A potential host for the expression of heterologous proteins. *Microbial Cell Factories*, 14: 96.
- Karim, G. and Farkhondeh, A. (1984). *Milk and Public Health*. 1st Edition, Markaz Nashr Daneshgahi, pp. 36-44. [In Persian].
- Khelissa, S.O., Abdallah, M., Jama, C., Faille, C. and Chihib, N-E. (2017). Bacterial contamination and biofilm formation on abiotic surfaces and strategies to overcome their persistence. *Journal of Materials and Environmental Sciences*, 8(9): 3326-3346.
- Khiralla, G.M., Mohamad, E.A.H., Farag, A.G. and Elhariry, H. (2015). Antibiofilm effect of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* cell-free supernatants against some bacterial pathogens. *Journal of Biotechnology Research*, 6: 86-95.
- Koohestani, M., Moradi, M., Tajik, H. and Badali, A. (2018). Effects of cell-free supernatant of *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Lactobacillus casei* 431 against planktonic form and biofilm of *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Research Forum*, 9(1): 301-306.
- Kumon, H., Ono, N., Iida, M. and Nickel, J.C. (1995). Combination effect of fosfomycin and ofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* growing in a biofilm. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (5):1038-1044.
- Lopes, L.B., Nicolino, R. and Haddad, J.P.A. (2017). Brucellosis - Risk Factors and Prevalence: A Review. *The Open Veterinary Science Journal*, 4: 72-84.
- Marouf, A.S Hanifian, S. and Shayegh, J. (2021). Prevalence of *Brucella* spp. in raw milk and artisanal cheese tested via real-time qPCR and culture assay. *International Journal of Food Microbiology*, 347: 109192.
- Méndez-Vilas A. (2013). *Microbial Pathogens and Strategies for Combating them: Science, Technology and Education*. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 42-51.
- Mirnejad, R., Vahdati, A.R., Rashidani, J., Erfani, M. and Piranfar, V. (2013). The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella Sonnei* and *Shigella Flexneri* in vitro. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 5(2): 122-6.
- Moslemi, E., Soltandalal, M.M., Beheshtizadeh, M.R., Taghavi, A., Kheiri Manjili., H.R, Mahmoudi Lamouki, R., *et al.* (2018). Detection of *Brucella* spp. in dairy products by real-time PCR. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 13(1): e12673.
- Nataraj, B.H., Ali, S.A., Behare, P. V. and Yadav, H. (2020). Postbiotics-parabiotics: the new horizons in microbial biotherapy and functional foods. *Microbial Cell Factories*, 19:168.
- Naves, P., Del Prado, G., Huelves1, L., Gracia1, M., Ruiz1, V., Blanco, J., *et al.* (2008). Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *Journal of Applied Microbiology*, 105:585-590.

- Parsek, M.R. and Singh, P.K. (2003). Bacterial biofilms: An emerging link to disease pathogenesis. Annual review of Microbiology, 57: 677-701.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B. and Carter, G.R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. Elsevier Limited, pp. 261-268.
- Shafeie, B., Ahmadi, M. and Dastmalchi Saei, H. (2012). Diagnosis of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in the milk of cattle and sheep in Kordestan province by polymerase chain reaction. Journal of Veterinary Microbiology. 8(2): 127-135. [In Persian]
- Shakerian, A., Deo, P., Rahimi, E Shahjavan, A-R. and Khamesipour, F. (2015). Molecular detection of *Brucella melitensis* in sheep and goat milk in Iran. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15 (5): 913-918.
- Shokri, D., Khorasgani, M.R., Mohkam, M., Fatemi, S.M., Ghasemi, Y. and Taheri-Kafrani, A. (2018). The inhibition effect of *lactobacilli* against growth and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Probiotics and Antimicrobial Proteins, 10:34-42.
- Shunmugaperumal, T. (2010). Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections. Hoboken, USA: John Wiley & Sons, pp. 3-36.
- Tang, T., Chen, G., Guo, A., Xu, Y., Zhao, L., Wang, M., et al. (2020). Comparative proteomic and genomic analyses of *Brucella abortus* biofilm and planktonic cells. Molecular Medicine Reports, 21(2): 731-743.
- Theron, J. and Thantsha, M.S. (2014). In: Batt, C.A. and Tortorello, L.M. (Editors), Encyclopedia of Food Microbiology. Academic press, pp. 332-336.
- Uzureau, S., Godefroid, M., Deschamps, C., Lemaire, J., De Bolle, K. and Letesson, J-J. (2007). Mutations of the quorum sensing-dependent regulator VjbR lead to drastic surface modifications in *Brucella melitensis*. Journal of Bacteriology, 189(16): 6035-6047.
- Vuotto C, Barbanti F, Mastrantonio P. and Donelli, G. (2014). *Lactobacillus brevis* CD2 inhibits *Prevotella melaninogenica* biofilm. Oral Disease, 20(7): 668-674.
- Wang, H.H., Ye, K.P., Zhang, Q.Q. and Dong, Y. (2013). Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. Food Control, 32(2): 650-658.
- Wang, L., Li, Y., Wang, L., Zhu, M., Zhu, X., Qian, C. and Li, W. (2018). Responses of biofilm microorganisms from moving bed biofilm reactor to antibiotics exposure: Protective role of extracellular polymeric substances. Bioresource Technology, 254: 268-277.
- Wang, Y., Chen, Z., Qiao, F., Zhong, Z., Xu, J., Wang, Z., et al. (2010). The type IV secretion system affects the expression of Omp25/Omp31 and the outer membrane properties of *Brucella melitensis*. FEMS Microbiology Letters, 303: 92-100.
- Wang, Y., Yi, L., Wu, Z., Shao, J., Liu, G., Fan, H., Zhang, W. and Lu, C. (2012). Comparative proteomic analysis of *Streptococcus suis* biofilms and planktonic cells that identified biofilm infection-related immunogenic proteins. PLoS One, 7(4): e33371.
- Wilson, A.M., Walker, J.M. and Yin, K. (2021). Different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* cell free filtrate have differing anti-Biofilm and Immunomodulatory effects. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 11: 737392.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H.Z., Høiby, N. and Song, Z.J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. International Journal of Oral Science, 7: 1-7.
- Zamani, H., Rahbar, S., Garakoui, S.R., Afsah Sahebi, A. and Jafari, H. (2017). Antibiofilm potential of *Lactobacillus plantarum* spp. cell free supernatant (CFS) against multidrug resistant bacterial pathogens. Pharmaceutical and Biomedical Research, 3(2): 39-44.